

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5100901号
(P5100901)

(45) 発行日 平成24年12月19日 (2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日 (2012.10.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 23 外国語出願 (全 138 頁)

(21) 出願番号	特願2012-49810 (P2012-49810)	(73) 特許権者	511293663
(22) 出願日	平成24年3月6日 (2012.3.6)		ユニバーシティー オブ アイオワ リサ
(62) 分割の表示	特願2007-555366 (P2007-555366)		ーチ ファウンデーション
原出願日	平成18年2月14日 (2006.2.14)		アメリカ合衆国 アイオワ 52242,
(65) 公開番号	特開2012-139228 (P2012-139228A)		アイオワ シティ, 200 サウス キ
(43) 公開日	平成24年7月26日 (2012.7.26)		ャピトル ストリート, ユニバーシティ
審査請求日	平成24年3月6日 (2012.3.6)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/653, 078		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成17年2月14日 (2005.2.14)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/715, 503	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成17年9月9日 (2005.9.9)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 加齢性黄斑変性を処置および診断するための方法および試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における加齢性黄斑変性 (AMD) の発症に対する感受性の指標として、該被験体のゲノムが、AMD の発症に対する感受性の減少と関連した補体 H 因子 (CFH) 遺伝子におけるハプロタイプをコードするか否かを使用する方法であって、該方法は、

CFH タンパク質の 62 位にイソロイシンをコードする配列が、該被験体のゲノムの多型部位 rs800292 (配列番号 12) に存在するか否かを決定する工程を包含し、ここで、

該ハプロタイプの存在は、該被験体が、AMD の発症に対して減少した感受性を有することを示す、方法。

【請求項 2】

前記被験体の生物学的サンプルに由来する DNA において、配列番号 12 の 21 位にアデニンが存在することを検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記被験体由来の生物学的サンプルにおいて、CFH タンパク質の 62 位にイソロイシンを含む CFH タンパク質を検出する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生物学的サンプルが血清サンプルである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記被験体の前記ゲノムにおいて H 因子遺伝子内の 2 つの多型部位における前記配列を

決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法であって、ここで、第 1 の多型部位は r s 8 0 0 2 9 2 であり、そして第 2 の多型部位は r s 1 0 6 1 1 7 0 (配列番号 1 6) である、方法。

【請求項 6】

(i) 前記被験体由来の核酸サンプルと、配列番号 1 2 またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能である第 1 のポリヌクレオチドプローブおよび配列番号 1 6 またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能である第 2 のポリヌクレオチドプローブとを合わせる工程、ならびに (i i) 各々のプローブについて、ハイブリダイゼーションの存在または不在を検出する工程を包含する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記プローブが、増幅反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) A M D を発症するリスクを評価するために、前記被験体から家族歴が以前に取得されたか、または (b) A M D を発症するリスクを評価するために、該被験体に対して眼科的検査が以前に実行された、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法が、A M D の特定のサブタイプのさらなる指標を使用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記サブタイプが、初期 A M D 、地図状萎縮症または滲出性 A M D (C N V) である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記生物学的サンプルが細胞を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 2】

配列番号 1 2 を含む C F H 遺伝子のセグメントを増幅する工程を包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 のポリヌクレオチドプローブが、C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする配列番号 1 2 に選択的にハイブリダイズする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記 C F H タンパク質が免疫学的アッセイを使用して検出される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記生物学的サンプルが細胞を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

被験体における加齢性黄斑変性 (A M D) の発症に対する感受性の指標として、C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする配列が、該被験体のゲノムの多型部位 r s 8 0 0 2 9 2 (配列番号 1 2) に存在するか否かを使用する方法であって、該方法は、C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする該配列が、該被験体のゲノムの多型部位 r s 8 0 0 2 9 2 (配列番号 1 2) に存在するか否かを決定する工程を包含し、ここで、

6 2 位にイソロイシンをコードする配列の存在は、該被験体が、A M D の発症に対して減少した感受性を有することを示す、方法。

【請求項 1 7】

(a) A M D を発症するリスクを評価するために、前記被験体から家族歴が以前に取得されたか、または (b) A M D を発症するリスクを評価するために、該被験体に対して眼科的検査が以前に実行された、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記被験体のゲノムの少なくとも一部を配列決定する工程を包含する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記被験体由来の生物学的サンプルにおいて、C F H タンパク質をコードする D N A または R N A において 6 2 位にイソロイシンをコードする配列の存在を検出する工程、あるいは C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンを含む C F H タンパク質を検出する工程を包含する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記被験体由来の核酸サンプルと、C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする配列番号 1 2 またはその相補鎖に選択的にハイブリダイズ可能であるポリヌクレオチドプローブとを合わせる工程、およびハイブリダイゼーションの存在または不在を検出する工程を包含する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記プローブが、増幅反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

第 1 の被験体が、第 2 の被験体よりも A M D を発症するリスクが低いことの指標としての、配列番号 2 にしたがってナンバリングされた C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする配列を含む、補体 H 因子 (C F H) 遺伝子の存在を使用するための方法であって、該方法は：

該第 1 の被験体において、配列番号 2 にしたがってナンバリングされた C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする該配列を含む、補体 H 因子 (C F H) 遺伝子の存在を検出する工程であって、ここで、6 2 位にイソロイシンをコードする配列の存在は、該被験体が、A M D の発症に対して減少した感受性を有することを示す、工程；ならびに

該第 2 の被験体において、C F H 遺伝子に、C F H タンパク質の 6 2 位にイソロイシンをコードする該配列を含む配列が存在しないことを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 2 3】

前記第 2 の被験体において、C F H 遺伝子において、C F H タンパク質の 4 0 2 位にヒスチジンをコードする配列の存在を検出する工程を包含する、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願への相互参照)

本願は、米国仮出願第 6 0 / 6 5 0 , 0 7 8 号 (2 0 0 5 年 2 月 1 4 日出願)、同第 6 0 / 7 1 7 , 8 6 1 号 (2 0 0 5 年 9 月 1 6 日出願)、同第 6 0 / 7 1 5 , 5 0 3 号 (2 0 0 5 年 9 月 9 日出願)、および同第 6 0 / 7 3 5 , 6 9 7 号 (2 0 0 5 年 1 1 月 9 日出願) の利益を主張し、これら全体の内容は、参考として本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

(連邦政府によって資金提供された研究開発の下でなされた発明についての権利に関する申し立て)

本願に記載される研究は、N I H 眼研究所 (E y e I n s t i t u t e) 補助金 E Y 1 1 5 1 5 によって部分的に援助された。米国政府は本発明において特定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0 0 0 3】

(発明の背景)

加齢性黄斑変性 (A M D) は、6 0 歳を超えた個人のほぼ 1 5 % に罹患する、先進国における不可逆的な失明の主要な原因である (概説としては、非特許文献 1、非特許文献 2；非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5；非特許文献 6 を参照のこと)。この年齢

10

20

30

40

50

層には6億人の個人が見積もられている。AMDの有病率は年齢とともに増加し；軽度のまたは初期の型は、75歳以上の人口のほぼ30%、進行型は約7%に発生する（Kleinら、1992；Vingerlingら、1995a, 1995b）。臨床的には、AMDは、神経網膜の特殊な領域である網膜黄斑およびその下にある組織で発生する変性的変化に起因する中心視の進行性の喪失によって特徴付けられる。この疾患の最も重篤なまたは滲出性の型において、脈絡膜血管に由来する新生血管葉状体（frond）が、ブルーフ膜および網膜色素上皮（RPE）を突き破り、典型的には、網膜の剥離および引き続く変性に至る。

【0004】

遅発性複合障害であるAMDは、遺伝因子および環境因子の組み合わせによって発生および/または調節されるようである（SeddonおよびChen、2004；Tuoräら、2004；KleinおよびFrancis、2003）。家族集積性研究は、遺伝要素がこの障害の25%にも主として関与すると見積もった（Klaverら、1998a）。広く行き渡っている仮説に従うと、AMDの症例の大部分は、複数の単一遺伝子障害の蓄積ではなく、定量的表現型、複数の感受性遺伝子座の相互作用の発現を表す。関与する遺伝子座の数、付与される起因し得るリスク、および種々の遺伝子座間の相互作用は不明瞭なままである。

【0005】

連鎖および候補遺伝子スクリーニング分析は、AMDの遺伝学に限られた洞察を提供してきた。AMDについてのリスクの増加を伴う1つの遺伝子、ABCA4（Allikmetsら、1997）およびリスクの減少を伴う1つの遺伝子、ApoE4（Klaverら、1998b、Souiedら、1998）の信頼できる関連性が報告されてきた。加えて、いくつかのグループが、ゲノム規模での連鎖分析の結果を報告している（Tuoräら、2004；Weeksら、2004において概説されている）。特定の染色体領域、1q25-q31（ARMD1）に対するAMD表現型を有する1つの家族の連鎖が実証されている（Kleinら、1998）。HEMICENTIN-1は原因遺伝子であることが示唆されてきたが（Schultzら、2003）、その役割は確実には確認されていない。いくつかの研究における染色体1q上の重複する遺伝子座の同定（Weeksら、2001；Iyengarら、2003；Weeksら、2004）は、この遺伝子座がAMD関連遺伝子を保有し得ることを示唆する。

【0006】

AMDの発症と関連する特徴的な眼の病変であるドルーゼンの最近の研究は、AMDの初期型および後期型の機序において、炎症および他の免疫媒介性プロセス、特に補体活性化についての役割を関連付けてきた（Hagemanら、1999, 2001；Mullinsら、2000, 2001；Russellら、2000；Andersonら、2002, 2004；Johnsonら、2000, 2001；Crabbら、2002；非特許文献4；Penfoldら、2001；Espinoza-Heidmanら、2003）。これらの研究は、終末経路の補体成分（C5、C6、C7、C8およびC9）および終末経路の活性化特異的補体タンパク質フラグメント（C3b、iC3b、C3dgおよびC5b-9）ならびに種々の補体経路調節因子および阻害因子（H因子、I因子、D因子、CD55およびCD59を含む）が、ドルーゼンの中、ブルーフ膜（RPEおよび脈絡膜を隔てる、エラスチンおよびコラーゲンから構成される細胞外層）に沿って、およびドルーゼンを重層するRPE細胞の中にあることを明らかにしている（Johnsonら、2000, 2001；Mullinsら、2000, 2001；Crabbら、2002）。これらのドルーゼン関連分子の多くは、以前には肝臓によって主として合成されていると考えられていた、循環血漿タンパク質である。興味深いことに、多くはまた、RPEおよび/または脈絡膜細胞によって局所的に合成されるように見える。

【0007】

補体系の活性化は、通常の宿主の防御および損傷に対する応答において主要な役割を果たす（Kinoshita、1991）。しばしば、特異的補体関連遺伝子における変異

10

20

30

40

50

によって引き起こされるこの系の不適切な活性化および/または制御は、アテローム性動脈硬化症 (Torzewskiら、1997; Niculescuら、1999)、アルツハイマー病 (Akiyamaら、2000) および糸球体腎炎 (Schwertzら、2001) において示されたのと同様に、自己免疫続発症および局所的組織破壊に寄与し得る (Hollers、2003; Liszewski および Atkinson、1991; Morgan および Walport、1991; Shen および Meri、2003)。

【0008】

II型膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN II) は、補体カスケードの代替経路の制御されない全身的な活性化と関連するまれな疾患である。この疾患は、腎糸球体基底膜中の補体の代替経路に関与するタンパク質であるC3およびC3cを含む異常に電子密度の高い物質の沈着によって特徴付けられ、これは最終的には腎不全を引き起こす。興味深いことに、MPGN IIを有する多くの患者は、黄斑ドローゼン、RPE剥離および脈絡膜新生血管膜を発症し、これらは、臨床的および組成的にAMDにおいて形成するものと区別できないが、これらはしばしば、10歳代に検出される (Mullinsら、2001; O'Brienら、1993; Huangら、2003; Colvilleら、2003; Duvall-Youngら、1989a, 1989b; Rainesら、1989; Leysら、1990; McAvoy および Silvestri、2004; Bennettら、1989; Orth および Ritz、1998; Habibら、1975)。

【0009】

MPGN IIを有する大部分の患者において、補体カスケードを調節することができないことは、C3bBbに対して指向された自己抗体によって媒介される。しかし、他のMPGN II患者は、代替補体経路の主要な阻害因子であるH因子 (非特許文献7; 非特許文献8) における変異を保有する。H因子における点変異 (I1166R) は、ヨークシャーピッグにおいてMPGN IIを引き起こし (非特許文献9)、H因子欠損マウスは重篤な糸球体腎炎を発症する (非特許文献10)。さらに、関連する障害であるMPGN IIIを有するいくつかの大家族の中での罹患した個体は、AMDについてのゲノム規模の連鎖研究において同定された遺伝子座に重なる領域である染色体1q31-32 (非特許文献11) への連鎖を示す (上記を参照のこと)。この特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化の調節因子 (RCA) 遺伝子クラスターと呼ばれるこれらの遺伝子の1つのグループは、H因子、5つのH因子関連遺伝子 (CFHR1、CFHR2、CFHR3、CFHR4およびCFHR5)、および第XIII凝固因子のサブユニットをコードする遺伝子を含む。C4BPA、C4BPB、C4BPAL2、DAF (CD55) CR1、CR2、CR1LおよびMCP (CD46) を含む、補体経路関連遺伝子の第2のクラスターは、1q25-31遺伝子座に直接隣接して存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Zarbin、Eur J Ophthalmol (1998) 8: 199~206

【非特許文献2】Zarbin、Arch Ophthalmol (2004) 122 (4): 598~614

【非特許文献3】Kleinら、Am J Ophthalmol (2004) 137 (3): 504~510

【非特許文献4】Ambatiら、Surv J Ophthalmol (2003) 48 (3): 257~293

【非特許文献5】de Jong、Ophthalmologia (2004) 218 補遺1: 5~16

【非特許文献6】van Leeuwenら、Eur J Epidemiol (2003) 18 (9): 845~854

10

20

30

40

50

【非特許文献7】Aultら、J Biol Chem (1997) 272:25168 ~ 25175

【非特許文献8】Dragon-Dureyら、J Am Soc Nephrol (2004) 15:787~795

【非特許文献9】Jansenら、Kidney Int (1998) 53(2)331 ~ 349

【非特許文献10】Pickeringら、Nat Genet (2002) 31;424 ~ 428

【非特許文献11】Nearryら、J Am Soc Nephrol (2002) 13:2052~2057

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、加齢性黄斑変性 (AMD) および II 型膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN II) の発症と関連する補体 H 因子における多型およびハプロタイプに関する。本発明はまた、AMD および MPGN II の発症と関連する補体 H 遺伝子関連 5 (CFHR5) 遺伝子における多型およびハプロタイプに関する。本発明は、これらおよび他の疾患を診断、モニター、および治療する方法を提供する。

【0012】

20

1つの局面において、本発明は、H 因子遺伝子の1つまたは複数の多型部位における1つまたは複数の変異の存在または非存在を検出する工程を包含する、加齢性黄斑変性 (AMD) を発症する被験体の性向を決定するための診断方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、個体のH 因子遺伝子における多型の存在または非存在を検出する工程を包含する、AMD を発症する感受性の増加を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からDNAを入手する工程、およびDNAがH 因子遺伝子中に多型を含むか否かを決定するために個体からのDNAを分析する工程を包含してもよい。特定の多型は、個体が、対照集団と比較して、AMD を発症する感受性の増加を有することを示す。特定の多型は、個体がAMD を発症する可能性の減少を有することを示す。特定の多型は、個体がAMD を発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

30

【0013】

1つの実施形態において、被験体における加齢性黄斑変性 (AMD) を発症する性向を診断する方法は、被験体からDNAのサンプルを入手する工程、ならびに、AMD の発症と関連する多型の存在または非存在、被験体がAMD を発症する性向の増加を有することの指標である多型の存在、および被験体がAMD を発症する性向の減少を有することの指標である多型の非存在を患者のDNA中で検出する工程を包含する。

【0014】

関連する局面において、本発明は、個体のH 因子ハプロタイプを決定する工程を包含する、AMD を発症する感受性を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からDNAを入手する工程、およびそれらのH 因子ハプロタイプを決定するために個体のDNAを分析する工程を包含する。特定のハプロタイプ (リスクハプロタイプ) は、個体がAMD を発症する感受性の増加を有することを示す。特定のハプロタイプ (防御的ハプロタイプ) は、個体がAMD を発症する感受性の減少を有することを示す。特定のハプロタイプ (中性ハプロタイプ) は、個体がAMD を発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

40

【0015】

関連する実施形態において、H 因子遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在は、この遺伝子によってコードされるRNAまたはH 因子タンパク質 (例えば、タンパク質アイソフォーム) などの遺伝子産物の分析によって決定される。変異体タンパク質の発現はH 因子遺伝子の変異の指標であり、AMD を発症する性向の増加または減少を示すこ

50

とができる。タンパク質は、イムノアッセイおよび他の方法を使用して検出することができる。

【 0 0 1 6 】

別の関連する局面において、本発明は、個体の生物学的サンプル中の変異体H因子ポリペプチドを検出することによって、AMDまたは他の疾患を発症する感受性を診断する方法を提供する。1つの実施形態において、抗体に基づくアッセイは、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプルを抗体と接触させること、および変異体H因子ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体におけるAMDまたは他の疾患を診断するために使用される。1つの実施形態において、抗体が、変異体H因子ポリペプチドに特異的な（すなわち、野生型H因子ポリペプチドにおいては見られない）エピトープと特異的に相互作用する。1つの実施形態において、分離に基づくアッセイ（例えば、PAGE）が、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプル中の変異体H因子ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体中のAMDまたは他の疾患を診断するために使用される。

10

【 0 0 1 7 】

1つの局面において、本発明は、全身レベルおよび/または眼レベルのH因子の型および/または量を調節することによって、AMDを有する個体（例えば、症候性AMDを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体H因子遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。H因子ポリペプチドは、野生型H因子ポリペプチドまたは変異体H因子ポリペプチドであってもよい。H因子ポリペプチドは、リスクハプロタイプと関連するアレルよりもむしろ、中性または防御的アレルによってコードされる配列を有するH因子ポリペプチドであってもよい。1つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を減少させるための有効量でH因子ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を発症する性向を減少させ、かつ疾患の発症または進行を遅延させるための有効量で、H因子ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、H因子を含む血液を投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、H因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、導入遺伝子）を投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、H因子ポリペプチドを発現する細胞を投与する工程を包含する。

20

30

【 0 0 1 8 】

1つの局面において、本発明は、AMDを有する個体（例えば、症候性AMDを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体）または変異体H因子遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、患者における疾患の徴候を減少するための有効量で、変異体H因子またはH因子をコードしている遺伝子の発現の量を減少させる薬剤を患者に投与する工程を包含する。関連する実施形態において、個体における変異体H因子ポリペプチドの阻害因子（すなわち、不活性化因子）の治療量が投与される。

【 0 0 1 9 】

1つの実施形態において、個体における阻害核酸（例えば、変異体H因子ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的であるRNA）が投与される。1つの実施形態において、変異体H因子ポリペプチドをコードするRNAに相補的である精製されたアンチセンスRNAが投与される。

40

【 0 0 2 0 】

別の実施形態において、個体において変異体H因子ポリペプチドを部分的に不活性化するために十分である抗CFH抗体の治療量が投与される。

【 0 0 2 1 】

別の実施形態において、個体は、血液から有害型H因子を除去するために処理される（例えば、血漿分離交換法（plasmapheresis）、抗体指向性血漿分離交換法、またはH因子結合部分、例えば、ヘパリンとの複合体化による）。

50

【 0 0 2 2 】

1つの局面において、本発明は、変異体H因子ポリペプチドをコードする精製されたDNA、変異体H因子ポリペプチドをコードする精製されたRNA、変異体H因子ポリペプチドをコードするRNAに相補的な精製されたアンチセンスRNA、および精製された変異体H因子ポリペプチドを提供する。関連する局面において、本発明は、野生型または変異体H因子ポリペプチド、またはH因子の生物学的に活性なフラグメントを発現するための核酸を提供する。

【 0 0 2 3 】

1つの局面において、本発明は、H因子ポリペプチドをコードする核酸を含む遺伝子治療ベクターを提供する。このベクターは、複数の細胞型において、H因子遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。もしくは、このベクターは、特定の細胞型においてのみ、例えば、網膜の細胞においてまたは腎臓の細胞においてのみ、H因子遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。1つの局面において、H因子タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物が提供され、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。1つの実施形態において、コードされるH因子ポリペプチドは防御的変異体である。

【 0 0 2 4 】

1つの局面において、本発明は、組換えまたは精製されたH因子ポリペプチドを含む組成物を提供し、ここで、このポリペプチドは防御的変異体である。

【 0 0 2 5 】

関連する局面において、本発明は、組換えまたは精製H因子ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。1つの実施形態において、コードされるH因子ポリペプチドは野生型配列を有する。1つの実施形態において、コードされるH因子ポリペプチドは防御的変異体である。

【 0 0 2 6 】

1つの局面において、本発明は、変異体H因子ポリペプチドと特異的に相互作用するが野生型H因子ポリペプチドとは相互作用しない抗体を提供する。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、減法的技術 (s u b t r a c t i v e t e c h n i q u e s) によって得られてもよい。これらの抗体は、変異体H因子ポリペプチドを不活性化するために十分であり得る。関連する局面において、本発明は、抗H因子抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。

【 0 0 2 7 】

1つの局面において、本発明は、AMDを発症するリスクの増加または減少と関連する変異体H因子タンパク質を同定するための方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、(a) 防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および(b) 個体のゲノム中にコードされているH因子のアミノ酸配列を決定する工程によって、防御的H因子タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、防御的H因子タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、本発明は、(a) 中性ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および(b) 個体のゲノム中にコードされているH因子のアミノ酸配列を決定する工程によって、中性H因子タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、中性H因子タンパク質は、中性ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、AMDを発症するリスクの減少に関連するH因子の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は(a) AMDを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；(b) 個体からゲノムDNAまたはRNAを入手する工程；および(c) 個体のゲノム中にコードされるH因子のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、防御的H因子タンパク質は、AMDを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、防御的ま

10

20

30

40

50

たは中性H因子タンパク質は、野生型H因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【0028】

関連する方法において、AMDを発症するリスクの増加と関連するH因子の型は、(a) リスクハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および(b) 個体のゲノム中にコードされるH因子のアミノ酸配列を決定する工程によって同定され、ここで、リスクH因子タンパク質は、リスクハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、AMDを発症するリスクの増加と関連するH因子の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は(a) AMDを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；(b) 個体からゲノムDNAまたはRNAを入手する工程；および(c) 個体のゲノム中にコードされるH因子のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、リスクH因子タンパク質は、AMDを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、リスクH因子タンパク質は、野生型H因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

10

【0029】

1つの局面において、本発明は、患者の生物学的サンプル中の短縮型H因子に対する全長H因子の比率を検出することによって、AMDまたは他の疾患に対する性向または感受性を診断する方法を提供する。1つの実施形態において、被験体においてAMDを発症する性向または感受性を診断する方法は、被験体からRNAのサンプルを入手する工程、およびエキソン10A（すなわち、短縮型H因子）に対するエキソン10（すなわち、全長H因子）の発現の比率を患者のRNA中で検出する工程を包含し、この比率の増加は、被験体がAMDを発症する性向または感受性の増加を有することの指標であり、この比率の減少は、被験体がAMDを発症する性向または感受性の減少を有することの指標である。1つの実施形態において、被験体においてAMDを発症する性向または感受性を診断する方法は、被験体からタンパク質のサンプルを入手する工程、および短縮型H因子に対する全長H因子の発現の比率を患者のタンパク質中で検出する工程を包含し、この比率の増加は、被験体がAMDを発症する性向または感受性の増加を有することの指標であり、この比率の減少は、被験体がAMDを発症する性向または感受性の減少を有することの指標である。

20

【0030】

1つの局面において、本発明は、H因子タンパク質またはそのフラグメントをコードする組換えまたは精製核酸、例えば、H因子遺伝子から誘導される核酸を含む細胞を提供する。この細胞は、細菌または酵母、または研究および薬物開発のために有用である任意の他の細胞であってもよい。従って、本発明は、組換え変異体ヒトH因子を発現する単離された宿主細胞および細胞株を提供する。1つの実施形態において、変異体はリスク変異体であり、402位のアミノ酸にヒスチジンを有する。1つの実施形態において、変異体は防御的変異体であり、62位のアミノ酸にイソロイシンを有する。1つの実施形態において、変異体は中性変異体である。1つの実施形態において、リスク変異体、防御的変異体、または中性変異体のH因子タンパク質は、野生型H因子ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

30

40

【0031】

1つの局面において、本発明は、その体細胞および生殖細胞がヒト変異体H因子ポリペプチドをコードしている導入遺伝子を含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、AMDについてのモデルとして、およびAMDを治療する際に有用である薬剤をスクリーニングするために使用される。この動物は、マウス、蠕虫、または研究および薬物開発（H因子の組換え産生など）のために有用な任意の他の動物であってもよい。1つの実施形態において、H因子は変異体ヒトH因子であり、ここで上記変異体はアミノ酸62にイソロイシンを有し、または、アミノ酸402にヒスチジンを有する。

【0032】

50

1つの局面において、本発明は、表1A、1Bおよび1Cに記載されるH因子遺伝子における多型部位に連鎖した多型部位をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、H因子遺伝子における多型部位に連鎖している遺伝子中の多型部位を同定し、ここで、H因子遺伝子中の多型部位の多型型は関連するAMDである工程、および連鎖した多型部位が、AMD表現型と関連するH因子遺伝子の多型型と平衡不平衡にあるか否かを示すために、個体の集団中のハプロタイプを決定する工程を包含する。

【0033】

1つの局面において、本発明は、AMDについて上記のように実行される、MPGNIIについての診断方法、治療方法、およびスクリーニング方法を提供する。

【0034】

1つの局面において、本発明は、AMDまたはMPGNIIを発症する被験体の性向を決定するための診断方法を提供し、この方法は、CFHR5遺伝子の1つまたは複数の多型部位における1つまたは複数の変異の存在または非存在を検出する工程を包含する。1つの実施形態において、本発明は、個体のCFHR5遺伝子中の多型の存在または非存在を検出する工程を含む、AMDまたはMPGNIIを発症する感受性の増加を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からDNAを入手する工程、およびDNAがCFHR5遺伝子中に多型を含むか否かを決定するために個体からのDNAを分析する工程を包含してもよい。特定の多型は、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する感受性の増加を有することを示す。特定の多型は、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する可能性の減少を有することを示す。特定の多型は、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【0035】

1つの実施形態において、被験体におけるAMDまたはMPGNIIを発症する性向を診断する方法は、被験体からのDNAのサンプルを入手する工程、およびAMDまたはMPGNIIの発症と関連する多型の存在または非存在を患者のDNA中で検出する工程を包含し、多型の存在は、被験体がAMDまたはMPGNIIを発症する性向の増加を有することの指標であり、多型の非存在は、被験体がAMDまたはMPGNIIを発症する性向の減少を有することの指標である。

【0036】

関連する実施形態において、CFHR5遺伝子の多型部位における変異の存在および非存在は、遺伝子産物、例えば、RNA、または遺伝子によってコードされるCFHR5タンパク質（例えば、タンパク質アイソフォーム）などの分析によって決定される。変異体タンパク質の発現はCFHR5遺伝子中の変異の指標であり、AMDまたはMPGNIIを発症する性向の増加または減少を示すことができる。タンパク質は、イムノアッセイおよび他の方法を使用して検出することができる。

【0037】

関連する局面において、本発明は、個体のCFHR5ハプロタイプを決定する工程を包含する、AMDまたはMPGNIIを発症する感受性を診断する方法を提供する。これらの方法は、個体からDNAを入手する工程、およびそれらのCFHR5ハプロタイプを決定するために個体のDNAを分析する工程を包含する。特定のハプロタイプ（リスクハプロタイプ）は、対照集団と比較して、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する感受性の増加を有することを示す。特定のハプロタイプ（防御的ハプロタイプ）は、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する感受性の減少を有することを示す。特定のハプロタイプ（中性ハプロタイプ）は、個体がAMDまたはMPGNIIを発症する可能性の増加または減少のいずれも有しないことを示す。

【0038】

別の関連する局面において、本発明は、個体の生物学的サンプル中の変異体CFHR5ポリペプチドを検出することによって、AMDまたはMPGNIIまたは他の疾患を発症する感受性を診断する方法を提供する。1つの実施形態において、抗体に基づくアッセイが、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプルを抗体に接触させ、変異体CFHR

10

20

30

40

50

5 ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体におけるAMDまたはMPGNI Iまたは他の疾患を診断するために使用される。1つの実施形態において、抗体は変異体CFHR5ポリペプチドに特異的な(すなわち、野生型CFHR5ポリペプチドにおいては見られない)エピトープと特異的に相互作用する。1つの実施形態において、分離に基づくアッセイ(例えば、PAGE)が、個体の生物学的サンプル、例えば、血清サンプル中の変異体CFHR5ポリペプチドの存在または非存在を検出することによって、個体中のMPGNI Iまたは他の疾患を診断するために使用される。種々の型のイムノアッセイ形式を、サンプル中のCFHまたはCFHR5ポリペプチドまたはタンパク質をアッセイするために使用することができる。これらには、サンドイッチELISA、ラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、免疫組織化学アッセイ、ドットプロット、ディップスティック、およびウェスタンブロットが含まれる。

10

【0039】

1つの局面において、本発明は、全身レベルおよび/または腎臓レベルのCFHR5の型および/または量を調節することによって、AMDまたはMPGNI Iを有するかまたはそのリスクがある個体(例えば、症候性AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体)または変異体CFHR5遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。CFHR5ポリペプチドは、リスクハプロタイプと関連するアレルよりもむしろ、中性または防御的アレルによってコードされるCFHR5ポリペプチドであってもよい。1つの実施形態において、この方法は、疾患の兆候を減少させるための有効量で、CFHR5ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、疾患の徴候を発症する性向を減少させ、かつ疾患の発症または進行を遅延させるための有効量で、CFHR5ポリペプチドを個体に投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、CFHR5を含む血液を投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この方法は、CFHR5ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸(例えば、導入遺伝子)を投与する工程を包含する。

20

【0040】

1つの局面において、本発明は、AMDまたはMPGNI Iを有する個体(例えば、症候性AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの上昇を示す多型またはハプロタイプが検出される個体)または変異体CFHR5遺伝子を伴う他の疾患を有する個体を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、患者における疾患の徴候を減少させるための有効量で、変異体CFHR5またはCFHR5をコードしている遺伝子の発現の量を減少させる薬剤を患者に投与する工程を包含する。CFHR5ポリペプチドは、野生型CFHR5ポリペプチドまたは変異体CFHR5ポリペプチドであってもよい。

30

【0041】

1つの実施形態において、個体における阻害核酸(例えば、変異体CFHR5ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的なRNA)が投与される。1つの実施形態において、変異体CFHR5ポリペプチドをコードするRNAに相補的な精製されたアンチセンスRNAが投与される。

【0042】

別の実施形態において、個体における変異体CFHR5ポリペプチドを部分的に不活性化するために十分である抗CFHR5抗体の治療量が投与される。

40

【0043】

関連する実施形態において、個体における変異体CFHR5ポリペプチドの阻害因子(例えば、インアクチベーター)の治療量が投与される。

【0044】

別の実施形態において、個体は、血液から有害型CFHR5を除去するために処理される(例えば、血漿分離交換法、抗体指向性血漿分離交換法、またはCFHR5結合部分、例えば、ヘパリンとの複合体化による)。

【0045】

50

1つの局面において、本発明は、変異体CFHR5ポリペプチドをコードする精製されたDNA、変異体CFHR5ポリペプチドをコードする精製されたRNA、変異体CFHR5ポリペプチドをコードするRNAに相補的な精製されたアンチセンスRNA、および精製された変異体CFHR5ポリペプチドを提供する。関連する局面において、本発明は、野生型または変異体CFHR5ポリペプチド、またはCFHR5の生物学的に活性なフラグメントを発現するための核酸を提供する。

【0046】

1つの局面において、本発明は、CFHR5ポリペプチドをコードする核酸を含む遺伝子治療ベクターを提供する。このベクターは、複数の細胞型において、CFHR5遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。もしくは、このベクターは、特定の細胞型においてのみ、例えば、網膜の細胞においてまたは腎臓の細胞（例えば、内皮細胞、メサングウム細胞、有足細胞）においてのみ、CFHR5遺伝子の発現を駆動するプロモーターを含んでもよい。1つの局面において、CFHR5タンパク質をコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物が提供され、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。1つの実施形態において、コードされるCFHR5ポリペプチドは防御的変異体である。

【0047】

1つの局面において、本発明は、組換えまたは精製されたCFHR5ポリペプチドを含む組成物を提供し、ここで、このポリペプチドは防御的変異体である。

【0048】

関連する局面において、本発明は、組換えまたは精製CFHR5ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。1つの実施形態において、コードされるCFHR5ポリペプチドは野生型配列を有する。1つの実施形態において、コードされるCFHR5ポリペプチドは防御的変異体である。

【0049】

1つの局面において、本発明は、変異体CFHR5ポリペプチドと特異的に相互作用するが野生型CFHR5ポリペプチドとは相互作用しない抗体を提供する。これらの抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、減法的技術（*subtractive techniques*）によって得られてもよい。これらの抗体は、変異体CFHR5ポリペプチドを不活性するために十分であり得る。関連する局面において、本発明は、抗CFHR5抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物を提供し、ここで、この組成物は病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である。

【0050】

1つの局面において、本発明は、AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの増加または減少と関連する変異体CFHR5タンパク質を同定するための方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、（a）防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（b）個体のゲノム中にコードされているCFHR5のアミノ酸配列を決定する工程によって、防御的CFHR5タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、防御的CFHR5タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、本発明は、（a）中性ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および（b）個体のゲノム中にコードされているCFHR5のアミノ酸配列を決定する工程によって、中性CFHR5タンパク質を同定する方法を提供し、ここで、中性CFHR5タンパク質は、中性ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの減少と関連するCFHR5の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は（a）AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；（b）個体からゲノムDNAまたはRNAを入手する工程；および（c）個体のゲノム中にコードされるCFHR5のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、防御的CFHR5タンパク質は、AMDまたはMPGNI I

10

20

30

40

50

を発症するリスクの減少と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、防御的または中性CFHR5タンパク質は、野生型CFHR5ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

【0051】

関連する方法において、AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの増加と関連するCFHR5の型は、(a)リスクハプロタイプを有するとして個体を同定する工程、および(b)個体のゲノム中にコードされるCFHR5のアミノ酸配列を決定する工程によって同定され、ここで、リスクCFHR5タンパク質は、リスクハプロタイプを有するアレルによってコードされる。関連する実施形態において、本発明は、AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの増加と関連するCFHR5の変異体形態を同定する方法を提供し、この方法は(a)AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；(b)個体からゲノムDNAまたはRNAを入手する工程；および(c)個体のゲノム中にコードされるCFHR5のアミノ酸配列を決定する工程を包含し、ここで、リスクCFHR5タンパク質は、AMDまたはMPGNI Iを発症するリスクの増加と関連するハプロタイプを有するアレルによってコードされる。1つの実施形態において、リスクCFHR5タンパク質は、野生型CFHR5ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

10

【0052】

1つの局面において、本発明は、CFHR5タンパク質に由来する組換えまたは精製核酸を含む細胞を提供する。この細胞は、細菌または酵母、または研究および薬物開発のために有用である任意の他の細胞であってもよい。従って、本発明は、組換え変異体ヒトCFHR5を発現する単離された宿主細胞および細胞株を提供する。1つの実施形態において、CFHR5変異体はリスク変異体であり、46位のアミノ酸にセリンを有する。1つの実施形態において、CFHR5変異体は中性変異体である。1つの実施形態において、リスク変異体、防御的変異体、または中性変異体のCFHR5タンパク質は、野生型CFHR5ポリペプチドのアミノ酸配列を有しない。

20

【0053】

1つの局面において、本発明は、その体細胞および生殖細胞がヒト変異体CFHR5ポリペプチドをコードしている導入遺伝子を含む、トランスジェニック非ヒト動物を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、AMDまたはMPGNI Iについてのモデルとして、およびAMDまたはMPGNI Iを治療する際に有用である薬剤をスクリーニングするために使用される。この動物は、マウス、蠕虫、または研究および薬物開発(CFHR5の組換え産生など)のために有用な任意の他の動物であってもよい。1つの実施形態において、CFHR5は変異体ヒトCFHR5であり、ここで上記CFHR5変異体はアミノ酸46にセリンを有する。

30

【0054】

1つの局面において、本発明は、表14または表15に記載されるCFHR5遺伝子における多型部位に連鎖した多型部位をスクリーニングする方法を提供する。これらの方法は、CFHR5遺伝子における多型部位に連鎖している遺伝子中の多型部位を同定し、ここで、CFHR5遺伝子中の多型部位の多型型は関連するAMDまたはMPGNI Iである工程、および連鎖した多型部位が、AMDまたはMPGNI I表現型と関連するCFHR5遺伝子の多型型と平衡不平衡にある多型型を有するか否かを示すために、個体の集団中のハプロタイプを決定する工程を包含する。

40

【0055】

1つの局面において、本発明は、H因子ハプロタイプの分析のためのキットを提供する。これらのキットは、患者におけるAMDの診断のために使用され得る。これらのキットは、1つ以上のH因子、H因子アレル特異的オリゴヌクレオチド(例えば、アレル特異的プライマーまたはプローブ)、またはH因子ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。H因子アレル特異的オリゴヌクレオチドは、H因子遺伝子のコード(エキソン)または非コード(プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳)領域に由

50

来する配列を含んでもよい。H因子特異的抗体は、正常もしくは野生型Hポリペプチド、または、非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がH因子コード領域に存在する、変異体H因子ポリペプチドを認識してもよい。これらのキットは、AMD、ならびに、H因子遺伝子中のSNPと関連する他の疾患、例えば、MPGNI Iを診断するために使用されてもよい。これらのキットは、代わりにまたは加えて、1つ以上のH因子関連5(CFHR5)アレル特異的オリゴヌクレオチド(例えば、プライマーおよびプローブ)、またはCFHR5ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。CFHR5アレル特異的プライマーおよびH因子関連5アレル特異的オリゴヌクレオチドは、H因子関連5遺伝子のコード(エキソン)または非コード(プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳)領域に由来する配列を含んでもよい。H因子関連5特異的抗体は、正常もしくは野生型Hポリペプチド、または、非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がH因子関連5コード領域に存在する、変異体H因子関連5ポリペプチドを認識してもよい。

【0056】

1つの実施形態において、このキットは、表1A、表1B、および/または表1Cに列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。1つの実施形態において、プローブは、表1A、表1B、および/または表1Cに列挙されるH因子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。1つの実施形態において、このキットは、表1A、表1B、および/または表1Cに列挙される2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このキットは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：(a) rs529825；(b) rs800292；(c) rs3766404；(d) rs1061147；(e) rs1061170；(f) rs203674；(g) rs529825およびrs800292の少なくとも1つ；(h) rs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つ；(i) rs529825およびrs800292の少なくとも1つ；ならびにrs3766404；ならびにrs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つ；または(j) 少なくともrs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170およびrs203674。

【0057】

関連する実施形態において、このキットは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：(a) rs529825；(b) rs800292；(c) イントロン2(IVS2またはin s T T) (d) rs3766404；(e) rs1061147；(f) rs1061170；(g) エキソン10A；(h) rs203674；(i) rs375046；(j) rs529825およびrs800292；(k) rs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも2つもしくは3つ；(l) rs529825およびrs800292の少なくとも1つ；ならびにイントロン2；ならびにrs3766404；ならびにrs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つ；ならびにエキソン10A；ならびにrs375046；(m) 少なくともrs529825；rs800292；イントロン2；rs3766404；rs1061170；エキソン10A；rs203674；およびrs375046；(n) rs529825、rs800292、イントロン2；rs3766404、rs1061170、エキソン10A、rs203674、およびrs375046の少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つ；(o) エキソン22(1210)；または(p) 任意の上述の変異もしくは変異のセット(a-o)と組み合わせたエキソン22(1210)。1つの実施形態において、このキットは、rs460897およびrs460184の一方または両方においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このキットは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、多型部位は以下から選択される：(a) rs3753394；(b) rs529825；(c) rs800292；(d) イント

10

20

30

40

50

ロン2 (I V S 2 または i n s T T) ; (e) r s 3 7 6 6 4 0 4 ; (f) r s 1 0 6 1 1 4 7 ; (g) r s 1 0 6 1 1 7 0 ; (h) r s 2 2 7 4 7 0 0 ; (i) r s 2 0 3 6 7 4 ; (j) r s 3 7 5 3 3 9 6 ; および (k) r s 1 0 6 5 4 8 9 。

【 0 0 5 8 】

1つの実施形態において、このキットは、上記のプローブの代わりに、またはそれに加えて、C F H R 5 遺伝子における多型部位を区別するプローブ、プライマー、抗体などを含む。1つの局面において、本発明は、C F H R 5 遺伝子における変異に基づいて患者におけるAMDまたはM P G N I Iを診断するためのキットを提供する。これらのキットは、1つ以上のC F H R 5 特異的プローブもしくはC F H R 5 アレル特異的オリゴヌクレオチド、またはC F H R 5 ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。C F H R 5 特異的プライマーおよびC F H R 5 アレル特異的オリゴヌクレオチドは、C F H R 5 遺伝子のコード(エキソン)または非コード(プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳)領域に由来する配列を含んでもよい。C F H R 5 特異的抗体は、正常もしくは野生型C F H R 5 ポリペプチド、または、1つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がC F H R 5 コード領域に存在する、変異体C F H R 5 ポリペプチドを認識してもよい。これらのキットは、AMDまたはM P G N I I、ならびにC F H R 5 遺伝子中のSNPと関連する他の疾患を診断するために使用されてもよい。

【 0 0 5 9 】

1つの実施形態において、このキットは、表14または表15に列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。1つの実施形態において、プローブは、表14または表15に列挙されるC F H R 5 遺伝子の多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。1つの実施形態において、このキットは、表14または表15に列挙される2つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位: r s 9 4 2 7 6 6 1 (- 2 4 9 T > C) ; r s 9 4 2 7 6 6 2 (- 2 0 T > C) ; および r s 1 2 0 9 7 5 5 0 (P 4 6 S) の1つ、2つ、またはすべてのアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【 0 0 6 0 】

1つの実施形態において、このキットは、C F H 遺伝子における多型部位、およびC F H R 5 などのC F H R 遺伝子中の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【 0 0 6 1 】

1つの局面において、本発明は、被験体のハプロタイプを決定するためのデバイスを提供する。これらのデバイスは、例えば、患者におけるAMDまたは他の疾患の診断のために有用である。1つの実施形態において、このデバイスは、表1A、1Bおよび/または1Cに列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。1つの実施形態において、これらのプローブは、表1A、1Bおよび/または1Cに列挙されるH因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。1つの実施形態において、このデバイスは、表1A、1Bおよび/または1Cに列挙される2つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このデバイスは、2つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む: (a) r s 5 2 9 8 2 5 ; (b) r s 8 0 0 2 9 2 ; (c) r s 3 7 6 6 4 0 4 ; (d) r s 1 0 6 1 1 4 7 ; (e) r s 1 0 6 1 1 7 0 ; (f) r s 2 0 3 6 7 4 ; (g) r s 5 2 9 8 2 5 および r s 8 0 0 2 9 2 の少なくとも1つ; (h) r s 1 0 6 1 1 4 7、r s 1 0 6 1 1 7 0 および r s 2 0 3 6 7 4 の少なくとも1つ; (i) r s 5 2 9 8 2 5 および r s 8 0 0 2 9 2 の少なくとも1つ; ならびに r s 3 7 6 6 4 0 4 ; ならびに r s 1 0 6 1 1 4 7、r s 1 0 6 1 1 7 0 および r s 2 0 3 6 7 4 の少なくとも1つ; または (j) 少なくとも r s 5 2 9 8 2 5、r s 8 0 0 2 9 2、r s 3 7 6 6 4 0 4、r s 1 0 6 1 1 7 0 および r s 2 0 3 6 7 4 。

【 0 0 6 2 】

上記のキットおよびそれらの内容物はまた、M P G N I Iを発症する性向を同定するため、または任意の目的のためにH因子ハプロタイプを決定するために使用されてもよい。

【 0 0 6 3 】

関連する実施形態において、このデバイスは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下を含む：(a) r s 5 2 9 8 2 5；(b) r s 8 0 0 2 9 2；(c)イントロン2 (I V S 2またはi n s T T)；(d) r s 3 7 6 6 4 0 4；(e) r s 1 0 6 1 1 4 7；(f) r s 1 0 6 1 1 7 0；(g)エキソン1 0 A；(h) r s 2 0 3 6 7 4；(i) r s 3 7 5 0 4 6；(j) r s 5 2 9 8 2 5およびr s 8 0 0 2 9 2；(k) r s 1 0 6 1 1 4 7、r s 1 0 6 1 1 7 0およびr s 2 0 3 6 7 4の少なくとも2つもしくは3つ；(l) r s 5 2 9 8 2 5およびr s 8 0 0 2 9 2の少なくとも1つ；ならびにイントロン2；ならびにr s 3 7 6 6 4 0 4；ならびにr s 1 0 6 1 1 4 7、r s 1 0 6 1 1 7 0およびr s 2 0 3 6 7 4の少なくとも1つ；ならびにエキソン1 0 A；ならびにr s 3 7 5 0 4 6；(m)少なくともr s 5 2 9 8 2 5；r s 8 0 0 2 9 2；イントロン2；r s 3 7 6 6 4 0 4；r s 1 0 6 1 1 7 0；エキソン1 0 A；r s 2 0 3 6 7 4；およびr s 3 7 5 0 4 6；(n) r s 5 2 9 8 2 5；r s 8 0 0 2 9 2；イントロン2；r s 3 7 6 6 4 0 4；r s 1 0 6 1 1 7 0；エキソン1 0 A；r s 2 0 3 6 7 4；およびr s 3 7 5 0 4 6の少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つ；(o)エキソン2 2 (1 2 1 0)；または(p)任意の上述の変異もしくは変異のセット(a - o)と組み合わせたエキソン2 2 (1 2 1 0)。1つの実施形態において、このデバイスは、r s 4 6 0 8 9 7およびr s 4 6 0 1 8 4の一方または両方においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このデバイスは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下から選択される：(a) r s 3 7 5 3 3 9 4；(b) r s 5 2 9 8 2 5；(c) r s 8 0 0 2 9 2；(d)イントロン2 (I V S 2またはi n s T T)；(e) r s 3 7 6 6 4 0 4；(f) r s 1 0 6 1 1 4 7；(g) r s 1 0 6 1 1 7 0；(h) r s 2 2 7 4 7 0 0；(i) r s 2 0 3 6 7 4；(j) r s 3 7 5 3 3 9 6；および(k) r s 1 0 6 5 4 8 9。1つの実施形態において、このデバイスは、2つ以上の多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを有し、ここで、この多型部位は以下から選択される：(a) r s 3 7 5 3 3 9 4；(b) r s 5 2 9 8 2 5；(c) r s 8 0 0 2 9 2；(d)イントロン2 (I V S 2またはi n s T T)；(e) r s 3 7 6 6 4 0 4；(f) r s 1 0 6 1 1 4 7；(g) r s 1 0 6 1 1 7 0；(h) r s 2 2 7 4 7 0 0；(i) r s 2 0 3 6 7 4；(j) r s 3 7 5 3 3 9 6；および(k) r s 1 0 6 5 4 8 9。

【 0 0 6 4 】

1つの局面において、本発明は、患者におけるA M DまたはM P G N I Iの診断のためのデバイスを提供する。1つの実施形態において、このデバイスは、表1 4または表1 5に列挙される多型部位においてアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。1つの実施形態において、これらのプローブは、表1 4または表1 5に列挙されるC F H R 5遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。1つの実施形態において、このデバイスは、表1 4または表1 5に列挙される2つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。本発明のデバイスは、上記および本開示の他のあらゆる箇所に記載される部位の任意の組み合わせを含む、H因子とC F H R 5変異体の両方の間を区別するプローブまたはプライマーを含んでもよい。

【 0 0 6 5 】

上記のデバイスおよびそれらの内容物はまた、M P G N I Iを発症する性向を同定するため、または任意の目的のためにH因子ハプロタイプを決定するために使用されてもよい。

【 0 0 6 6 】

1つの実施形態において、このデバイスは、上記のプローブまたはプライマーの代わり

に、またはそれに加えて、C F H R 5 遺伝子における多型部位を区別するプローブ、プライマー、抗体などを含む。1つの局面において、本発明は、C F H R 5 遺伝子における変異に基づいて患者におけるA M DまたはM P G N I Iを診断するためのデバイスを提供する。これらのデバイスは、1つ以上のC F H R 5 特異的プローブもしくはC F H R 5 アレル特異的オリゴヌクレオチド、またはC F H R 5 ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。C F H R 5 特異的プライマーおよびC F H R 5 アレル特異的オリゴヌクレオチドは、C F H R 5 遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。C F H R 5 特異的抗体は、正常もしくは野生型C F H R 5 ポリペプチド、または、1つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型（S N P）がC F H R 5 コード領域に存在する、変異体C F H R 5 ポリペプチドを認識してもよい。これらのデバイスは、A M DまたはM P G N I I、ならびにC F H R 5 遺伝子中のS N Pと関連する他の疾患を診断するために使用されてもよい。

10

【0067】

1つの実施形態において、このデバイスは、表14または表15に列挙される多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。1つの実施形態において、プローブは、表14または表15に列挙されるC F H R 5 遺伝子の多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである。1つの実施形態において、このデバイスは、表14または表15に列挙される2つ以上の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを有する。1つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位：r s 9 4 2 7 6 6 1（- 2 4 9 T > C）；r s 9 4 2 7 6 6 2（- 2 0 T > C）；およびr s 1 2 0 9 7 5 5 0（P 4 6 S）の1つ、2つ、またはすべてのアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

20

【0068】

1つの実施形態において、このデバイスは、C F H 遺伝子における多型部位、およびC F H R 5 などのC F H R 遺伝子中の多型部位におけるアレルを区別するプローブまたはプライマーを含む。

【0069】

本発明のさらなる局面は、開示の全体を読むことで明らかになる。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

30

（項目1）

補体調節因子（R C A）をコードする遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出する工程を包含する、加齢性黄斑変性（A M D）を発症する被験体の性向を決定するための診断方法。

（項目2）

上記遺伝子がH因子またはC F H R 5である、項目1に記載の方法。

（項目3）

上記多型部位が、上記H因子遺伝子における両アレル一ヌクレオチド変異多型である、項目2に記載の方法。

（項目4）

患者から核酸のサンプルを入手する工程、およびH因子遺伝子における多型部位の変異の存在または非存在を該患者のD N A中で検出する工程を包含する、項目3に記載の方法。

40

（項目5）

上記変異の存在が、上記患者がA M Dを発症する性向の増加を有することの指標である、項目4に記載の方法。

（項目6）

上記変異の存在が、上記患者がA M Dを発症する性向の減少を有することの指標である、項目4に記載の方法。

（項目7）

上記多型部位が、表1 A ~ 1 Cに列挙したH因子遺伝子における一ヌクレオチド変異多型

50

である、項目 2 に記載の方法。

(項目 8)

上記多型が $r s 8 0 0 2 9 2 (I 6 2 V)$ である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

上記多型が $r s 1 0 6 1 1 7 0 (Y 4 0 2 H)$ である、項目 7 に記載の方法。

(項目 10)

上記多型がエキソン 22 ($R 1 2 1 0 C$) である、項目 7 に記載の方法。

(項目 11)

上記検出する工程が、(i) 反応中に H 因子遺伝子アレルに選択的にハイブリダイズ可能である 1 種以上のポリヌクレオチドプローブと、被験体からの核酸サンプルを合わせる工程、および (ii) 該反応をモニターして、該サンプル中の該 H 因子遺伝子アレルの存在を決定する工程を包含する、項目 4 に記載の方法。

(項目 12)

上記プローブが、ポリメラーゼ連鎖反応においてポリヌクレオチド合成を開始可能なオリゴヌクレオチドである、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

変異体 H 因子タンパク質が検出される、項目 2 に記載の方法。

(項目 14)

上記変異体がアミノ酸 62 にイソロイシンを有する、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

上記変異体がアミノ酸 402 にヒスチジンを有する、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

上記変異体がアミノ酸 1210 にシステインを有する、項目 13 に記載の方法。

(項目 17)

上記検出する工程が、(i) 変異体タンパク質アレルに特異的な抗体試薬と、被験体からの血液または血清サンプルを免疫学的アッセイにおいて混合する工程、および (ii) 該抗体試薬とタンパク質サンプルとの間の特異的結合を決定するためのアッセイをモニターする工程を包含する、項目 13 に記載の方法。

(項目 18)

上記多型部位が、 $r s 9 4 2 7 6 6 1 (- 2 4 9 T > C)$ 、 $r s 9 4 2 7 6 6 2 (- 2 0 T > C)$ および $r s 1 2 0 9 7 7 5 5 0 (P 6 4 S)$ からなる群より選択される C F H R 5 遺伝子における一ヌクレオチド変異多型である、項目 2 に記載の方法。

(項目 19)

上記多型が $r s 1 2 0 9 7 7 5 5 0 (P 6 4 S)$ である、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

変異体 C F H R 5 ポリペプチドが検出される、項目 2 に記載の方法。

(項目 21)

上記変異体 C F H R 5 ポリペプチドが、アミノ酸 46 におけるプロリンの代わりにセリンを有する、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

ハプロタイプについてスクリーニングする工程を包含する、被験体における加齢性黄斑変性 (AMD) に対する感受性を診断する方法であって、該ハプロタイプが：

a) 健常個体と比較して、AMD と診断された個体においてより頻繁に存在する、H 因子もしくは C F H R 5 遺伝子におけるリスクハプロタイプ、または

b) AMD と診断された個体と比較して、健常個体においてより頻繁に存在する、H 因子もしくは C F H R 5 遺伝子における防御的ハプロタイプ、または

c) H 因子もしくは C F H R 5 遺伝子における中性ハプロタイプ

である、方法。

(項目 23)

上記ハプロタイプが H 因子遺伝子の中にある、項目 22 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 2 4)

上記ハプロタイプが $rs\ 1061170$ および $rs\ 203674$ の少なくとも 1 つの変異体配列を含む、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

上記ハプロタイプが、 $rs\ 529825$ 、 $rs\ 800292$ 、および $rs\ 3766404$ の少なくとも 1 つの変異体配列を含む防御的ハプロタイプである、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 6)

項目 2 3 に記載の方法であって、上記スクリーニングが、以下における変異：

a) $rs\ 529825$; $rs\ 800292$; $rs\ 3766404$; $rs\ 1061147$; $rs\ 1061170$; および $rs\ 203674$ のいずれか 1 つ以上；

b) イントロン 2 ($IVS\ 2$ もしくは $ins\ TT$) ; $rs\ 2274700$; エキソン 10A ; および $rs\ 375046$ のいずれか 1 つ以上；

c) $rs\ 529825$ および $rs\ 800292$ の一方もしくは両方；

d) $rs\ 1061147$ 、 $rs\ 1061170$ および $rs\ 203674$ の 1 つ以上；

e) $rs\ 529825$ および $rs\ 800292$ の少なくとも 1 つ；ならびに $rs\ 3766404$; ならびに $rs\ 1061147$ 、 $rs\ 1061170$ および $rs\ 203674$ の少なくとも 1 つ；

f) 少なくとも $rs\ 529825$ 、 $rs\ 800292$ 、 $rs\ 3766404$ 、 $rs\ 1061170$ 、および $rs\ 203674$ ；

g) エキソン 22 ($R\ 1210C$) ; または

h) エキソン 22 ($R\ 1210C$) および (a) ~ (g) のいずれか

を決定する工程を包含する、方法。

(項目 2 7)

上記ハプロタイプが $CFHR\ 5$ 遺伝子の中にある、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 8)

上記ハプロタイプが、 $rs\ 9427661$ 、 $rs\ 9427662$ および $rs\ 12097550$ の少なくとも 1 つの変異体配列を含む $CFHR\ 5$ 遺伝子の中のリスクハプロタイプである、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

H 因子ポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、加齢性黄斑変性 (AMD) を有すると診断されたか、またはそれを発症するリスクがあると診断された患者を治療する方法。

(項目 3 0)

上記患者が、 AMD のリスクと関連する H 因子ハプロタイプを有する、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

上記 H 因子ポリペプチドが H 因子防御的ハプロタイプによってコードされている、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 2)

上記投与が、H 因子ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドを投与する工程であって、該配列はプロモーターに作動可能に連結されている、工程、または H 因子ポリペプチドを発現する細胞を投与する工程を包含する、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 3)

上記プロモーターが RPE に特異的である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

上記 H 因子ポリペプチドが眼に投与される、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 5)

上記 H 因子ポリペプチドが眼内注射によって投与される、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

10

20

30

40

50

A M D のリスクと関連する H 因子ハプロタイプを有する患者を治療する方法であって、変異体 H 因子ポリペプチドをコードする H 因子遺伝子からコードされた遺伝子産物の発現を減少するための薬剤を投与する工程を含む、方法。

(項目 3 7)

上記薬剤が、上記変異体 H 因子ポリペプチドのヌクレオチド配列の少なくとも一部に相補的な R N A である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

上記 R N A がアンチセンス R N A である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

上記 R N A がリボザイムである、項目 3 7 に記載の方法。

10

(項目 4 0)

上記 R N A が低分子干渉 R N A (s i R N A) である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 1)

H 因子ポリペプチドをコードする遺伝子治療ベクターおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物。

(項目 4 2)

組換え H 因子ポリペプチドが防御的ハプロタイプによってコードされ、かつ 6 2 位にイソロイシンを有する、組換え H 因子ポリペプチドを含む組成物。

(項目 4 3)

組換え H 因子ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な賦形剤を含み、病原体を含まず、かつヒト患者への投与のために適切である、薬学的組成物。

20

(項目 4 4)

上記組換え H 因子ポリペプチドが防御的ハプロタイプによってコードされている、項目 4 3 に記載の薬学的組成物。

(項目 4 5)

変異体 H 因子タンパク質に結合するが、配列番号 2 または配列番号 3 3 7 の配列を有する H 因子タンパク質には結合しない抗体を含む、薬学的組成物。

(項目 4 6)

変異体ヒト H 因子をコードする導入遺伝子を発現するトランスジェニック非ヒト動物であって、該変異体はアミノ酸 6 2 におけるイソロイシンの代わりにバリンを有し (I 6 2 V)、該変異体はアミノ酸 4 0 2 におけるチロシンの代わりにヒスチジンを有し (Y 4 0 2 H)、または該変異体はアミノ酸 1 2 1 0 におけるアルギニンの代わりにシステインを有する (R 1 2 0 C)、トランスジェニック非ヒト動物。

30

(項目 4 7)

組換え変異体ヒト H 因子を発現する単離された宿主細胞であって、該変異体はアミノ酸 4 0 2 におけるチロシンの代わりにヒスチジンを有し (Y 4 0 2 H)、または該変異体はアミノ酸 1 2 1 0 におけるアルギニンの代わりにシステインを有する (R 1 2 0 C)、宿主細胞。

(項目 4 8)

組換え変異体ヒト H 因子を発現する単離された宿主細胞であって、該変異体が防御的ハプロタイプによってコードされている、宿主細胞。

40

(項目 4 9)

A M D を治療可能である薬剤についてスクリーニングする方法であって：該薬剤と項目 4 7 に記載の宿主細胞を接触させる工程；および Y 4 0 2 H または R 1 2 1 0 C 変異体の発現またはプロセッシングをモニターする工程を包含する、方法。

(項目 5 0)

防御的 H 因子タンパク質を同定する方法であって：

a) 防御的ハプロタイプを有するとして個体を同定する工程；および

b) 該個体のゲノム中にコードされる H 因子の配列を決定する工程

を包含する、方法。

50

(項目 5 1)

A M D を発症するリスクの減少と関連する H 因子の変異体形態を同定する方法であって：

i) A M D を発症するリスクの減少と関連するハプロタイプまたはディプロタイプを有するとして個体を同定する工程；

i i) 該個体からゲノム D N A または R N A を入手する工程；および

i i i) 該個体のゲノム中にコードされる H 因子のアミノ酸配列を決定する工程を含む、方法。

(項目 5 2)

表 1 A ~ 1 C に列挙される H 因子遺伝子中の少なくとも 1 つの多型部位においてアレルを区別するオリゴヌクレオチドを含む、被験体における A M D に対する感受性を診断するためのデバイスまたはキット。

10

(項目 5 3)

上記オリゴヌクレオチドが、表 1 A ~ 1 C に列挙される H 因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸増幅のためのプライマーである、項目 5 2 に記載のデバイスまたはキット。

(項目 5 4)

上記オリゴヌクレオチドが、表 1 A ~ 1 C に列挙される H 因子遺伝子多型部位に及ぶ領域の核酸ハイブリダイゼーションのためのプローブである、項目 5 2 に記載のデバイスまたはキット。

(項目 5 5)

表 1 A ~ 1 C に列挙される 2 つ以上の多型部位のアレルを区別するオリゴヌクレオチドを有する、項目 5 2 に記載のデバイスまたはキット。

20

(項目 5 6)

項目 5 5 に記載のデバイスまたはキットであって、上記多型部位が：

a) r s 5 2 9 8 2 5 ; r s 8 0 0 2 9 2 ; r s 3 7 6 6 4 0 4 ; r s 1 0 6 1 1 4 7 ; r s 1 0 6 1 1 7 0 ; および r s 2 0 3 6 7 4 のいずれか 1 つ以上；

b) イントロン 2 (I V S 2 もしくは i n s T T) ; r s 2 2 7 4 7 0 0 ; エキソン 1 0 A ; および r s 3 7 5 0 4 6 のいずれか 1 つ以上；

c) r s 5 2 9 8 2 5 および r s 8 0 0 2 9 2 の一方もしくは両方；

d) r s 1 0 6 1 1 4 7 、 r s 1 0 6 1 1 7 0 および r s 2 0 3 6 7 4 の 1 つ以上；

e) r s 5 2 9 8 2 5 および r s 8 0 0 2 9 2 の少なくとも 1 つ；ならびに r s 3 7 6 6 4 0 4 ; ならびに r s 1 0 6 1 1 4 7 、 r s 1 0 6 1 1 7 0 および r s 2 0 3 6 7 4 の少なくとも 1 つ；

30

f) 少なくとも r s 5 2 9 8 2 5 、 r s 8 0 0 2 9 2 、 r s 3 7 6 6 4 0 4 、 r s 1 0 6 1 1 7 0 、 および r s 2 0 3 6 7 4 ；

g) エキソン 2 2 (R 1 2 1 0 C) ; または

h) エキソン 2 2 (R 1 2 1 0 C) および (a) ~ (g) のいずれか

を含む、デバイスまたはキット。

(項目 5 7)

項目 5 5 に記載のデバイスまたはキットであって、上記多型部位が：

a) r s 5 2 9 8 2 5 ; r s 8 0 0 2 9 2 ; r s 3 7 6 6 4 0 4 ; r s 1 0 6 1 1 4 7 ; r s 1 0 6 1 1 7 0 ; r s 2 0 3 6 7 4 ; イントロン 2 (I V S 2 もしくは i n s T T) ; r s 2 2 7 4 7 0 0 ; エキソン 1 0 A ; r s 3 7 5 0 4 6 ; およびエキソン 2 2 (R 1 2 1 0 C) ならびに

40

b) r s 9 4 2 7 6 6 1 、 r s 9 4 2 7 6 6 2 および r s 1 2 0 9 7 5 5 0 のいずれか 1 つ以上

を含む、デバイスまたはキット。

(項目 5 8)

表 1 4 に列挙された C F H R 5 遺伝子中の少なくとも 1 つの多型部位におけるアレルを区別するオリゴヌクレオチドを含む、被験体における A M D に対する感受性を診断するためのデバイスまたはキット。

50

(項目59)

II型膜性増殖性糸球体腎炎(高密度沈着疾患)(MPGNII)を発症する被験体の性向を決定するための診断方法であって、H因子遺伝子および/または補体H因子関連5(CFHR5)遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出する工程を含む、方法。

(項目60)

上記変異の存在は、患者がMPGNIIを発症する性向の増加を有することの指標である、項目59に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1A~1Lは、ヒト網膜色素上皮におけるH因子(図1A~1H)および終末補体複合体(C5b-9)(図1I~1L)の免疫学的局在決定を示す。略号:(RPE)-脈絡膜(Chor)複合体;ブルー膜(BM);網膜(Ret);ドルーゼン(Dr)。

【図2】図2は、ヒト眼から抽出したRNAを使用する、H因子遺伝子発現(CFHおよび短縮型HFL1)のRT-PCR分析を示す。

【図3】図3は、分析に使用した12個のSNP、H因子遺伝子の22個のエキソン、20個の短いコンセンサスリピート(SCR)、病原体および他の基質の結合部位、ならびに連鎖不平衡(LD)ブロックのおよその位置を示すヒトH因子遺伝子のダイアグラムである。CFHのすべての22個のエキソンを示す(しかしイントロンは示さない)このダイアグラムは、原寸に比例して描かれてはいない。

【図4】図4は、円のサイズおよび位置によって示されるような、リスクハプロタイプ(黒丸)、防御的ハプロタイプ(線付き丸)、中性ハプロタイプ(白丸)および先祖ハプロタイプ(表示付き)の間の関連性、ならびにハプロタイプの相対的頻度を示す、ヒトH因子遺伝子SNPのハプロタイプネットワークダイアグラムである。

【図5】図5は、ヒトH因子遺伝子のハプロタイプおよびディプロタイプの連関分析を示す。情報を与える8個のSNPを、AMDの症例および対照において対の連鎖不均衡について分析した。示される多型部位におけるコード鎖上のヌクレオチドを、IVS1以外について示し、IVS1では、非コード鎖上のヌクレオチドを示す。

【図6-1】図6は、ヒトH因子cDNAの参照型の3926塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号Y00716[配列番号1])を示す。ATG開始コドンは74位のヌクレオチドで開始し、TAG終止コドンは3769位のヌクレオチドで終わる。

【図6-2】図6は、ヒトH因子cDNAの参照型の3926塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号Y00716[配列番号1])を示す。ATG開始コドンは74位のヌクレオチドで開始し、TAG終止コドンは3769位のヌクレオチドで終わる。

【図7】図7は、配列番号1によってコードされるポリペプチド配列(GenBankアクセッション番号Y00716[配列番号2])を示す。1231アミノ酸のH因子ポリペプチドは、18アミノ酸N末端シグナルペプチドを含む。

【図8】図8は、ヒトH因子の短縮型であるHFL1の参照型の1658塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号X07523[配列番号3])を示す。ATG開始コドンは74位のヌクレオチドで開始し、TGA終止コドンは1423位のヌクレオチドで終わる。

【図9】図9は、配列番号3によってコードされるHFL1の参照型のポリペプチド配列(GenBankアクセッション番号X07523[配列番号4])を示す。449アミノ酸のHFL1ポリペプチドは、18アミノ酸N末端シグナルペプチドを含む。

【図10】図10は、ヒトH因子の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列[配列番号5]を示す。この防御的変異体H因子ポリペプチドは、62位のアミノ酸にイソロイシン、および402位のアミノ酸にチロシンを有する(太字で示す)。

10

20

30

40

50

【図 1 1】図 1 1 は、短縮型のヒト H 因子である H F L 1 の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列（配列番号 6）を示す。この防御的変異体短縮型 H 因子ポリペプチドは、62 位のアミノ酸にイソロイシン、および 402 位のアミノ酸にチロシンを有する（太字で示す）。

【図 1 2】図 1 2 は、（A）光学顕微鏡および（B）電子顕微鏡によって見られるような、M P G N I I を有する患者における毛細血管壁肥厚を引き起こす、高密度の膜内沈着物を有する顕著な糸球体細胞過多を示す。沈着物は、糸球体基底膜（G B M）の緻密層におけるセグメント性、不連続、または拡散パターンを形成し得る。光学顕微鏡によると、これらは、好酸性かつ屈折性であり、過ヨウ素酸 - シッフで明るく染まり、そして高度に浸透性であり、これはそれらの高電子密度の外見を説明する（A）。電子顕微鏡によっても、沈着物は下位構造を欠き、非常に暗い均質な染みとして見える（B）。高密度沈着物の正確な組成は未知のままである（バーは 5 μ m である）。

【図 1 3】図 1 3 は、AMD および M P G N I I を有する患者において高レベルで全身的に活性化される、補体カスケードの代替経路の活性化および調節を示すダイアグラムである。補体カスケードの代替経路は、M P G N I I / D D D を有する患者において高レベルで全身的に活性化される。通常、C 3 の連続的な低レベルの活性化は、チックオーバーとして知られる自発的加水分解のプロセスによって起こる。C 3 加水分解は、ダイアグラムの上端に示すタンパク質の大きなコンホメーションの変化を伴う。コンホメーションの変化は、C 3（H 2 O）を、C 3 切断生成物である C 3 b と類似させる。最初のコンバーターゼ、C 3（H 2 O）B b は、C 3 を活性化して C 3 b を形成する。C 3 b は短い半減期を有するが、これが I g G、細胞または基底膜に結合する場合、これは即時的な不活性から保護される。（C 3 b）₂ - I g G 複合体が流体相中で形成し、プロペルジン（P）を結合し、これは B 因子結合および C 3 b B b の生成を促進する、ここでは B b（C 3 b）₂ - I g G - プロペルジン複合体として示される、代替経路のコンバーターゼである。増幅ループは矢印によって示す。C 3 N e F は、C 3 コンバーターゼの半減期を延長し、挿入図の中に示される。C 3 コンバーターゼを分解する 1 つのメカニズムは、f H として下の右に示される補体 H 因子（C F H）とのその相互作用を通してである。H 因子における欠失および変異は、M P G N I I / D D D と関連する。

【図 1 4】図 1 4 は、染色体 1 q 3 2 上の補体活性化の調節因子（R C A）遺伝子クラスターの組織化、ならびに補体 H 因子（C F H）、H 因子様 1（C F H L 1）ならびに H 因子関連 1、2、3、4 および 5（C F H R 1、C F H R 2、C F H R 3、C F H R 4 および C F H R 5）における短いコンセンサスリピート（S C R）として知られるおよそ 60 アミノ酸ドメインの配置を示すダイアグラムである。C F H は 20 個の S C R を有する。これらの S C R のいくつかと相互作用するパートナーは決定されており、上端の右に示す（C R P、C 反応性タンパク質；H e p、ヘパリン）。補体 H 因子様 1（C F H L 1）は、C F H のスプライシングアイソフォームであるのに対して、補体 H 因子関連タンパク質 1 ~ 5（C F H R 1 ~ 5）は各々特有の遺伝子（C F H R 1 ~ 5）によってコードされる。C F H R 1 ~ 5 の S C R は、卵形の中の数字によって示されるように、C F H 中の S C R のいくつかに類似している。例えば、C F H R 5 は 9 個の S C R を有し、最初の 2 つは H 因子の S C R 6 および 7 に類似しており、それゆえに、C R P およびヘパリン結合特性を有する。C F H R 5 の S C R 5 ~ 7 は、対応する卵形の中に 12 ~ 14 の数字を有する。なぜなら、これらの S C R は H 因子の S C R 12 ~ 14 に類似しており、C 3 b およびヘパリン結合特性を有するからである。

【図 1 5】図 1 5 は、A 307A および Y 402H が H 因子中で連鎖不均衡にあり、かつ - 249T > C および - 20T > C が C F H R 5 中で連鎖不均衡にあることを示す、連鎖不均衡プロットを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、ヒト C F H R 5 の参照型の 2821 塩基ヌクレオチド配列（Gen Bank アクセッション番号 AF 295327 [配列番号 7]）を示す。A T G 開始コドンは 94 位のヌクレオチドで開始し、T G A 終止コドンは 1803 位のヌクレオチドで終わる。

10

20

30

40

50

【図17】図17は、配列番号7によってコードされるポリペプチド配列 (GenBank アクセション番号 AAK15619 [配列番号8]) を示す。569 アミノ酸の CFHR5 ポリペプチドは、18 アミノ酸 N 末端シグナルペプチドを含む。

【図18】図18は、CFH および H 因子関連タンパク質についての遺伝子のゲノム重複を示す。エキソンを垂直線で示す。同じ文字で標識した領域 (例えば、A、A'、および A'') は実質的に同一の配列を有する。

【発明を実施するための形態】

【0071】

(発明の詳細な説明)

I. 序論

本発明は、H 因子遺伝子、および H 因子関連 5 遺伝子などの H 因子関連遺伝子における複数の変異から構成される多型およびハプロタイプのコレクションを提供する。これらの多型およびハプロタイプは、加齢性黄斑変性 (AMD) および他の H 因子関連病気と関連する。特定のこれらの多型およびハプロタイプは、変異体 H 因子ポリペプチドを生じる。これらおよび他の多型および多型のセット (例えば、ハプロタイプ) の検出は、AMD についての診断アッセイを設計および実施する際に有用である。多型および多型のセットは、核酸の分析によって、H 因子コード配列によってコードされるポリペプチド (スプライシング変異体によってコードされるポリペプチドを含む) の分析によって、または当該分野において公知である他の手段によって検出することができる。このような多型およびハプロタイプの分析はまた、AMD についての予防的および治療的レジメンを設計する際に有用である。

【0072】

H 因子は、補体系の主要な調節因子として機能する多機能タンパク質である。Zipfel, 2001, 「Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions」Semin Thromb Hemost. 27:191-9 を参照のこと。H 因子タンパク質活性には以下が含まれる: (1) C 反応性タンパク質 (CRP) への結合、(2) C3b への結合、(3) ヘパリンへの結合、(4) シアル酸への結合、(5) 内皮細胞表面への結合、(6) 細胞インテグリン受容体への結合、(7) 微生物を含む病原体への結合 (図3を参照のこと)、および (8) C3b コファクター活性。HF1、CFH および HF として知られる H 因子遺伝子は、ヒト染色体 1 上の 1q32 位に局在している。1q32 の特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化遺伝子クラスターの調節因子 (RCA) といわれるこれらの遺伝子の 1 つの群は、H 因子をコードする遺伝子、5 つの H 因子関連遺伝子 (それぞれ、FHR-1、FHR-2、FHR-3、FHR-4 および FHR-5、または CFHR1、CFHR2、CFHR3、CFHR4 および CFHR5)、および凝固因子 XII のサブユニットをコードする遺伝子を含む。H 因子および H 因子関連遺伝子は、短いコンセンサスリピート (SCR) からほぼ完全に構成される。H 因子および FHL1 は、SCR1~20 および 1~7 からそれぞれ構成される。FHR-1、FHR-2、FHR-3、FHR-4 および FHR-5 は、5、4、5、5 および 8 SCR からそれぞれ構成される (図14を参照のこと)。セントロメアからテロメアまでの遺伝子の順番は、FH/FHL1、FHR-3、FHR-1、FHR-4、FHR-2 および FHR-5 である。

【0073】

H 因子遺伝子

参照型のヒト H 因子 cDNA (配列番号1) (Ripoch et al., 1988, Biochem J 249:593-602 を参照のこと) およびゲノム配列が決定された。H 因子 cDNA は、155 kDa の見かけの分子量を有する 1231 アミノ酸長のポリペプチド (配列番号2) をコードする。FHL-1 として知られる (およびまた、FHL1 または CFHT と呼ばれてきた) H 因子の選択的スプライシング型が存在する。FHL-1 (配列番号3) は、H 因子のエキソン 1 から 9 までに本質的に対応する (Ripoch

10

20

30

40

50

eら、1988, Biochem J 249:593-602を参照のこと)。FHL1 cDNAは、45~50kDaの見かけの分子量を有する449アミノ酸長のポリペプチド(配列番号4)をコードする。FH1およびFHL1の最初の445アミノ酸は同一であり、FHL1はC末端4アミノ酸を有する(エキソン10A)。代替的なエキソン10Aは、エキソン9とエキソン10との間のイントロンに局在化する。ヒトH因子およびFHL1についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいて、それぞれ、アクセッション番号Y00716およびX07523の下で見出される。参照型のヒトH因子cDNAの3926塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号Y00716[配列番号1])は図6に示され、配列番号1によってコードされるポリペプチド配列(GenBankアクセッション番号Y00716[配列番号2])は図7に示される。ヒトH因子の短縮型である、参照型のHFL1の1658塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号X07523[配列番号3])は図8に示され、配列番号3によってコードされるポリペプチド配列(GenBankアクセッション番号X07523[配列番号4])は図9に示される。H因子遺伝子配列(150626塩基長)は、GenBankアクセッション番号AL049744の下で見出される。H因子プロモーターは、H因子遺伝子のコード領域に対して5'に局在化する。

【0074】

FHR-1 遺伝子

FHR-1 遺伝子はまた、CHFR1、CFHL1、CFHL、FHR1およびHFL1としても知られる。ヒトHFR-1の参照型のcDNA配列(Estallerら、1991, J. Immunol. 146:3190-3196を参照のこと)およびゲノム配列が決定された。FHR-1 cDNAは、39kDaの予測分子量を有する330アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトFHR-1についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいてアクセッション番号M65292の下で見出される。FHR-1 遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号AL049741において見出される。

【0075】

FHR-2 遺伝子

FHR-2 遺伝子はまた、CHFR2、CFHL2、FHR2およびHFL3としても知られる。ヒトHFR-2の参照型のcDNA配列(Strausbergら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903を参照のこと)およびゲノム配列が決定された。FHR-2 cDNAは、31kDaの予測分子量を有する270アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトFHR-2についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいてアクセッション番号BC022283の下で見出される。FHR-2 遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号AL139418において見出される。

【0076】

FHR-3 遺伝子

FHR-3 遺伝子はまた、CFHR3、CFHL3、FHR3およびHFL4としても知られる。ヒトHFR-3の参照型のcDNA配列(Strausbergら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903を参照のこと)およびゲノム配列が決定された。FHR-3 cDNAは、38kDaの予測分子量を有する330アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトFHR-3についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいてアクセッション番号BC058009の下で見出される。FHR-3 遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号AL049741において見出される。

【0077】

FHR-4 遺伝子

FHR-4 遺伝子はまた、CFHR4、CFHL4およびFHR4としても知られる。

ヒトFHR-4の参照型のcDNA配列(Skerkaら、1991, J. Biol. Chem. 272: 5627-5634を参照のこと)およびゲノム配列が決定された。FHR-4 cDNAは、38kDaの予測分子量を有する331アミノ酸長のポリペプチドをコードする。ヒトFHR-4についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいてアクセッション番号X98337の下で見出される。FHR-4遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号AF190816(5'末端)、AL139418(3'末端)およびBX248415において見出される。

【0078】

FHR-5遺伝子

FHR-5遺伝子はまた、CFHR5、CFHL5およびFHR5としても知られる。ヒトCFHR5の参照型のcDNA配列(配列番号83)(McRaeら、2001, J. Biol. Chem. 276: 6747-6754を参照のこと)およびゲノム配列が決定された。CFHR5 cDNAは、65kDaの見かけの分子量を有する569アミノ酸長のポリペプチド(配列番号8)をコードする。ヒトCFHR5についてのcDNAおよびアミノ酸配列データは、EMBL/GenBankデータライブラリーにおいてアクセッション番号AF295327の下で見出される。ヒトCFHR5の参照型の2821塩基ヌクレオチド配列(GenBankアクセッション番号AF295327[配列番号7])は図16に示され、配列番号7によってコードされるポリペプチド配列(GenBankアクセッション番号AAK15619[配列番号8])は図17に示される。CFHR5遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号AL139418(5'末端)およびAL353809(3'末端)において見出される。FHR-5プロモーターはCFHR5遺伝子のコード領域に対して5'に局在化する。

【0079】

II. 定義

以下の定義は、本発明の理解を補助するために提供される。他に定義されない限り、本明細書で使用される、すべての技術用語、表記法および他の科学的または医学的な用語または用語法は、医学および分子生物学の分野における当業者によって共通して理解される意味を有することが意図される。ある場合において、共通して理解される意味を有する用語は、明確さ、および/または即時的な参照のために本明細書で定義され、そして本明細書にこのような定義を含めることは、当該分野において一般的に理解されることを超えた実質的な違いを表すものと仮定されるべきではない。

【0080】

「核酸」、「ポリヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド」は、任意の長さのポリマー型のヌクレオチドであり、DNAまたはRNAであってもよく、そして一本鎖または二本鎖であってもよい。核酸は、プロモーターまたは他の調節配列を含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、通常、合成手段によって調製される。核酸には、表1A、表1Bおよび/もしくは表1Cに示され、あるいはH因子遺伝子中にあることが知られている多型部位の任意の1つに及び、またはそれに隣接するDNAのセグメントまたはそれらの補体が含まれる。これらのセグメントは、通常、5個から100個の間の連続する塩基であり、5、10、12、15、20、または25ヌクレオチドの下限から、10、15、20、25、30、50または100ヌクレオチドの上限までの範囲であることが多い(ここで、上限は下限よりも大きい)。5~10、5~20、10~20、12~30、15~30、10~50、20~50または20~100塩基が一般的である。多型部位はセグメントの任意の位置に存在することができる。二本鎖核酸の一方の鎖の配列の言及は、相補鎖の配列を規定し、文脈から他のことが明白である場合を除いて、核酸の一方の鎖への言及はまた、その補体への言及である。特定の応用のために、核酸(例えば、RNA)分子は、細胞内安定性および半減期を増加させるために修飾されてもよい。可能な修飾には、分子のバックボーン中のホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が含まれるがこれに限定されない。修飾核酸には、ペプチド核

酸 (PNA) および、イノシン、キユーオシン、およびワイプトシンなどの特殊な塩基を有する核酸、ならびにアセチル -、メチル -、チオ - および同様に修飾された型のアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンを有する核酸が含まれ、これらは、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない。

【0081】

「ハイブリダイゼーションプローブ」は、核酸の相補鎖に対して塩基特異的な様式で結合が可能である核酸である。このようなプローブは核酸およびペプチド核酸を含む (Nielsenら、1991)。ハイブリダイゼーションは、当該分野で公知であるストリンジェントな条件下で実施されてもよい。例えば、以下を参照のこと: BergerおよびKimmel (1987) *Methods In Enzymology*, Vol. 152: *Guide To Molecular Cloning Techniques*, San Diego: Academic Press, Inc.; Sambrookら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; Sambrook (2001) 3rd Edition; Rychlik, W. および Rhoads, R. E., 1989, *Nucl. Acids Res.* 17, 8543; Mueller, P. R. ら (1993) *Current Protocols in Molecular Biology* 15.5 所収、Green Publishing Associates, Inc. および John Wiley および Sons, New York; ならびに Anderson および Young, Q. *Quantitative Filter Hybridization in Nucleic Acid Hybridization* (1985))。本明細書で使用される場合、「プローブ」という用語はプライマーを含む。プローブおよびプライマーは、「オリゴヌクレオチド」と呼ばれることもある。

【0082】

「プライマー」という用語は、適切な条件下で、適切な緩衝液中および適切な温度において、鋳型指向性の DNA 合成の開始点として作用することが可能である一本鎖オリゴヌクレオチドをいう。プライマーの適切な長さは、意図されるプライマーの用途に依存するが、典型的には 15 から 30 ヌクレオチドまでの範囲である。プライマー配列は鋳型に対して正確に相補的である必要はないが、鋳型にハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。「プライマー部位」という用語は、プライマーがハイブリダイズする標的 DNA の領域をいう。「プライマー対」という用語は、増幅される DNA 配列の 5' 末端にハイブリダイズする 5' 上流プライマー、および増幅される DNA 配列の 3' 末端にハイブリダイズする 3' 下流プライマーを含む、プライマーのセットを意味する。

【0083】

短いプローブおよびプライマーのための例示的なハイブリダイゼーション条件は、計算された T_m よりも約 5 ~ 12 °C 下である。 T_m を計算するための式は公知であり、かつ以下を含む: < 14 塩基のオリゴについて、かつ 50 mM の一価カチオンの存在下で反応が実行されることを仮定して、 $T_m = 4 \times (\text{プライマー中の G および C の数}) + 2 \times (\text{プライマー中の A および T の数})$ 。より長いオリゴについては、以下の式を使用することができる: $T_m = 64.9 + 41 \times (\text{プライマー中の G および C の数} - 16.4) / N$ 、ここで、 N はプライマーの長さである。別の一般的に使用される式は、反応の塩濃度を考慮に入れている (Rychlik、前出、Sambrook、前出、Mueller、前出): $T_m = 81.5 + 16.6 \times (\log_{10} [Na^+] + [K^+]) + 0.41 \times (GC\%) - 675 / N$ 、ここで、 N はオリゴ中のヌクレオチドの数である。上述の式は特定の適用のための出発点を提供する; しかし、特定のプローブおよびプライマーの設計は、さらなる因子および異なる因子を考慮に入れてもよい。本発明の方法における使用のためのプローブおよびプライマーの設計のための方法は、当該分野で周知である。

【0084】

「リスク」「防御的」および「中性」という用語は、このような変異のパターンによって特徴付けられる遺伝子によってコードされる集団中の変異、SNPS、ハプロタイプ、ディプロタイプ、およびタンパク質を説明するために使用される。リスクハプロタイプは、1つの遺伝子、本明細書ではH因子またはH因子関連遺伝子のアレル型であり、AMDを発症するリスクの増加に関連する少なくとも1つの変異体多型、好ましくは、変異体多型のセットを含む。「変異体」という用語は、H因子またはH因子関連遺伝子に関連して使用される場合、配列が、集団、本明細書では、欧州 - 米国血統のヒトにおいて最も優勢である配列とは異なるヌクレオチド配列をいう。変異体多型は、遺伝子のコード部分または非コード部分においてであり得る。リスクH因子ハプロタイプの例は、アミノ酸402にヒスチジンを、および/またはアミノ酸1210にシステインをコードするH因子遺伝子のアレルである。リスクハプロタイプは、天然に存在することが可能であり、または組換え技術によって合成することが可能である。防御的ハプロタイプは、遺伝子、本明細書ではH因子またはH因子関連遺伝子のアレル型であり、AMDを発症するリスクの減少に関連する少なくとも1つの変異体多型、好ましくは、変異体多型のセットを含む。例えば、1つの防御的H因子ハプロタイプは、アミノ酸62においてイソロイシンをコードするH因子遺伝子のアレルを有する。防御的ハプロタイプは、天然に存在することが可能であり、または組換え技術によって合成することが可能である。中性ハプロタイプは、遺伝子、本明細書ではH因子またはH因子関連遺伝子のアレル型であり、AMDを発症するリスクの増加または減少のいずれかを有する集団または民族的群に関連する変異体多型を含まない。以下の議論から、「中性」ハプロタイプにコードされるタンパク質は、AMDまたは他の病気のための治療または予防の必要がある患者に投与されるときに防御的であり得る。すなわち、CFHまたはCFHR5の「中性」と「防御的」の両方の型は、例えば、AMDを有するかまたはAMDを発症するリスクがある被験体に投与されるときに、治療的な利点を提供することができ、従って、疾患から被験体を「防御する」ことができる。

【0085】

「野生型」という用語は、配列が、集団、本明細書では、欧州 - 米国血統のヒトにおいて最も優勢である型である核酸またはポリペプチドをいう（およそ40%優勢、図5を参照のこと）。本開示において、「野生型」H因子タンパク質は、402位のアミノ酸がチロシンであること（Y；[配列番号337]）以外は、配列番号2（図7）の配列を有する。本開示において、野生型H因子タンパク質をコードするH因子遺伝子は、402位のアミノ酸に対応する1277塩基で始まるコドンがチロシンをコードすること（TAT；[配列番号336]）以外は、配列番号1（図6）の配列を有する。

【0086】

「変異体」という用語は、H因子またはH因子関連ポリペプチドに関連して使用される場合、配列が、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させる位置において正常型または野生型の配列とは異なるポリペプチドをいう。例えば、H因子遺伝子のヌクレオチド配列におけるある変異または置換は、異なるアミノ酸がコードされるようにコドンを変化させ（例えば、および非限定的に、I62V、Y402H、D936Eの1つ以上における代替的なアレルを有する）、変異体ポリペプチドを生じることがある。変異体ポリペプチドはリスクと関連し得（例えば、402位にヒスチジンを有する）、防御と関連し得（例えば、62位にイソロイシンを有する）、または中性ハプロタイプによってコードされ得る（例えば、936位にアスパラギン酸を有する）。変異体CFHR5ポリペプチドはリスクと関連し得（例えば、46位にセリンを有する）、防御と関連し得、または中性であり得る。

【0087】

「参照」という用語は、H因子ポリペプチドに言及する場合、全長（FH1、配列番号2）または短縮型（FHL1、配列番号4）ヒトH因子について、アミノ酸配列が、Ripochera, 1988, Biochem J, 249: 593-602によって記載される配列に対して同一であるポリペプチドを意味する。「参照」という用語は、CFHR5ポリペプチドに言及する場合、全長ヒトCFHR5（配列番号8）について、アミノ酸

配列が、McRaeら、2001, J. Biol. Chem. 276: 6747-6754によって記載される配列と同一であるポリペプチドを意味する。第1の同定されたアレル型は、参照型またはアレルと任意に指定され；他のアレル型は、代替アレルまたは変異体アレルとして指定される。野生型および変異体形態は、参照型と実質的な配列同一性を有し得る（例えば、野生型または変異体形態は、野生型または変異体のアミノ酸位置の少なくとも90%、時折、位置の少なくとも95%、および時折、位置の少なくとも98%または99%において、参照型と同一であり得る）。変異体は、フレームシフト突然変異またはスプライシング変異に起因するタンパク質の特定の領域において参照型とは異なり得る。

【0088】

「多型」という用語は、集団中の2つ以上の遺伝的に決定された代替的配列またはアレルの存在をいう。「多型部位」は、配列の相違が存在する遺伝子座である。多型部位は少なくとも2つのアレルを有する。ダイアレル多型は2つのアレルを有する。トリアレル多型は3つのアレルを有する。二倍体生物は、アレル型について、ホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。多型部位は、1塩基対までの小ささであり得る。多型部位の例には以下が含まれる：制限フラグメント長多型（RFLP）；変数のタンデムリピート（VNTR）；超可変領域；ミニサテライト；ジヌクレオチドリピート；トリヌクレオチドリピート；テトラヌクレオチドリピート；および単純配列リピート。本明細書で使用される場合、「多型」への言及は、多型のセット（すなわち、ハプロタイプ）を包含することができる。

【0089】

「一ヌクレオチド変異多型（SNP）」は、アレル配列間の変異の部位である、単一のヌクレオチドによって占められる多型部位に存在する。この部位は、通常、アレルの高度に保存性の配列に先行され、およびこの配列に続く。SNPは、通常、多型部位において、1つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換に起因して生じる。1つのプリンの別のプリンによる置換、または1つのピリミジンの別のピリミジンによる置換はトランジションと呼ばれる。ピリミジンによるプリンの置換、またはその逆はトランスバージョンと呼ばれる。同義語SNPとは、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない、コード領域における1つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換をいう。非同義語SNPとは、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列を変化させる、コード領域における1つのヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換をいう。SNPはまた、参照アレルに対して、単数または複数のヌクレオチドの欠失または挿入から生じる可能性がある。

【0090】

多型の「セット」とは、表1A、表1Bおよび/または表1Cに示され、あるいはH因子遺伝子もしくは他の遺伝子の中で知られている、2つ以上の多型、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、または6個より多くの多型を意味する。

【0091】

「ハプロタイプ」という用語は、個体の遺伝子の中の多型部位の、多型またはアレルのセットの指定をいう。例えば、「112」H因子ハプロタイプとは、最初の2つの多型部位の各々におけるアレル1および第3の多型部位における多型2を含む、H因子遺伝子をいう。「ディプロタイプ」はハプロタイプ対である。

【0092】

「単離された」核酸とは、組成物中に存在する優勢な種である、核酸種を意味する。単離されたとは、核酸が、それが天然に付随する少なくとも1つの化合物から分離されていることを意味する。精製された核酸は、（分子量ベースで）存在するすべての高分子種の少なくとも約50、80または90パーセントを含む。

【0093】

2つのアミノ酸配列は、それらが少なくとも約80%同一、好ましくは少なくとも約90%同一、より好ましくは少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、または少

10

20

30

40

50

なくとも約99%同一である場合に、「実質的な同一性」を有すると見なされる。配列同一性パーセンテージは、典型的には、2つの配列間の最適なアラインメントを決定すること、および2つの配列を比較することによって計算される。配列の最適なアラインメントは、検査によって、またはSmithおよびWaterman、1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所的相同性アルゴリズムを使用することによって、NeedlemanおよびWunsch、1970, J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムを使用することによって、PearsonおよびLipman、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444の類似性のための検索方法を使用することによって、アミノ酸比較のためのデフォルトパラメーター（例えば、ギャップスコアリングなどのための）を使用するこれらのアルゴリズムのコンピュータ化手段によって（例えば、the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.において）実施されてもよい。特定の長さまたは領域に関して、2つの配列間で配列同一性を説明することが望ましいことがある（例えば、2つの配列は、少なくとも500塩基対の長さにわたって少なくとも95%の同一性を有すると説明されてもよい）。通常、その長さは、少なくとも約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000アミノ酸、または参照タンパク質の全長である。2つのアミノ酸配列はまた、それらが1、2、もしくは3残基、または2~20残基、2~10残基、3~20残基、もしくは3~10残基異なる場合に、実質的な同一性を有すると見なすことができる。

【0094】

「連鎖」は、同じ染色体上のそれらの位置の結果として、一緒に遺伝される遺伝子、アレル、遺伝子座、または遺伝子マーカーの傾向を説明する。連鎖は、2つの遺伝子、アレル、遺伝子座または遺伝子マーカー間の組換えのパーセントによって測定することができる。典型的には、互いに50センチモルガン(cM)の距離内に存在する遺伝子座は連鎖する。連鎖マーカーは、同じ遺伝子または遺伝子クラスターの中に存在する可能性がある。「連鎖不均衡」または「アレル連鎖」は、集団中の任意の特定のアレル頻度について偶然に予測されるよりもより高い頻度である、近傍の染色体の位置における特異的アレルまたは遺伝子マーカーとの特定のアレルまたは遺伝子マーカーの優先的な連鎖を意味する。連鎖不均衡にあるマーカーは、たとえそのマーカーそれ自体が疾患を引き起こさない場合であっても、疾患に対する感受性を検出する際に特に有用であり得る。

【0095】

「診断する」および「診断」という用語は、個体が疾患（徴候または症状を伴うものまたは伴わないものを含む）を発症する性向を有するか否かを決定する能力をいう。疾患を発症する性向の診断はまた「スクリーニング」と呼ぶことができ、本明細書で使用される場合、診断およびスクリーニングという用語は交換可能に使用される。病気を発症する性向の増加または減少を有するとは、病気を伴わない集団中の個体に対する、病気を発症する可能性をいうことが理解されよう。

【0096】

III. 表

本明細書で言及される特定の表は、下記の実施例に従って提供される。以下の説明が読者を補助するために提供される。

【0097】

表1A~1Cは、ヒトH因子遺伝子多型および加齢性黄斑変性とのそれらの関連を示す。(1A) dbSNP番号、位置、多型に及ぶコード鎖(上、5'から3'方向)および非コード鎖(下)の配列、アミノ酸の変化、対照およびAMD症例についてのアレル頻度、ヒトH因子遺伝子における1SNPについての²およびP-値を示す。(1B) dbSNP番号、質問配列、チンパンジーH因子遺伝子における対応するヌクレオチド、位置、アミノ酸の変化、ならびにヒトH因子遺伝子における11個のSNPについてのプライ

マーおよびプローブのセットを示す。(1C)存在する場合、dbSNPデータベース中には見出されないヒトH因子遺伝子中の14個のSNPについての、位置、多型に及ぶ配列、アミノ酸の位置およびアミノ酸の変化を示す。

【0098】

表2は、AMD症例および対照のコホートにおけるヒトH因子遺伝子における8個のSNPのハプロタイプ分析を示す。

【0099】

表3は、ヒトH因子遺伝子およびそれらのAMDとの関連における6個のSNPのハプロタイプ分析を示す。

【0100】

表4は、加齢性黄斑変性と、11個のヒトH因子遺伝子SNPとの関連性を示す。

【0101】

表5は、ヒトH因子についてのSSCP、DHPLCおよびDNA配列決定分析のために使用されるプライマーを示す。

【0102】

表6は、AMD患者および対照の遺伝子型決定データを示す。

【0103】

表7は、種々の民族群におけるアットリスクハプロタイプの頻度を示す。

【0104】

表8は、いくつかのH因子ディプロタイプを示す。一般的なリスクディプロタイプおよび防御的ディプロタイプを示す。

【0105】

表9は、H因子コード配列を増幅するために使用されるプライマーの配列を示す。

【0106】

表10は、CFHR5コード配列を増幅するために使用されるプライマーの配列を示す。

【0107】

表11は、22例のMPGNII患者におけるH因子SNPの分析を示す。

【0108】

表12は、22例のMPGNII患者およびAMD陰性である民族的に一致する対照におけるH因子SNP頻度の比較を示す。

【0109】

表13は、MPGNIIおよびそれらの関連するSCRと関連するH因子SNPを列挙する。

【0110】

表14は、22例のMPGNII患者におけるCFHR5 SNPの分析を示す。

【0111】

表15は、22例のMPGNII患者およびAMD陰性である民族的に一致する対照におけるCFHR5 SNP頻度の比較を示す。

【0112】

表16は、H因子遺伝子における多型を検出するために有用である例示的なアレルト異的プローブ(16A)およびプライマー(16B)を示す。

【0113】

IV. 補体H因子多型

1つの局面において、本発明は、補体因子H(HF1)遺伝子における多型部位がAMDに対する感受性およびその発症と関連するという発見に係る、新規な診断的な治療および薬物スクリーニングの方法を提供する。

【0114】

AMDと関連するH因子多型は、実施例1に記載されるように、標準的なプロトコールに従って、SSCP分析、DHPLC分析、および直接的配列決定を使用して、変異体に

10

20

30

40

50

ついてH因子(H因子アイソフォームFHL1に転写されるエキソン10Aを含む)のコード領域および隣接するイントロン領域を調べることによって同定した。残りの多型は5'ヌクレアーゼ(Taqman, ABI)方法論によって決定した。Taqman遺伝子型決定および関連する分析は、記載されたように(Goldら、2004)実施した。SSCPおよびDNA配列決定分析のためのプライマーは、MacVectorソフトウェアを使用して、各エキソンおよびその隣接するイントロン領域を増幅するように設計した。PCR由来のアンプリコンは、標準的なプロトコールに従って、SSCPおよびDHPLCによって配列の変異についてスクリーニングした。SSCPおよびDHPLCによって検出されるすべての変化は、標準的なプロトコールに従う二方向性配列決定によって確認した。統計学的分析は、カイ二乗(χ^2)およびフィッシャーの直接確率検定(P値)を使用して実施した。

10

【0115】

2つの独立したAMD症例の群および年齢を適合させた対照を使用した。すべての参加した個体は、60歳を超えたヨーロッパアメリカ人血統であり、インフォームドコンセントに従ってIRB-認可プロトコールの下で登録された。これらの群は、アイオワ大学からの臨床的に記録されたAMDを有する352例の血縁関係のない患者(平均年齢79.5 \pm 7.8歳)および113例の血縁関係のない対照患者(平均年齢78.4 \pm 7.4歳;年齢および民族によって適合させた)、ならびにコロンビア大学からの臨床的に記録されたAMDを有する550例の血縁関係のない患者(平均年齢71.32 \pm 8.9歳)および275例の血縁関係のない、年齢および民族によって適合させた対照患者(平均年齢68.84 \pm 8.6歳)から構成された。患者は、網膜フェローシップ訓練された眼科医による間接検眼鏡検査および細隙灯顕微鏡検査によって調べた。

20

【0116】

基底部(fundus)の写真は、標準化された、国際分類系に従って等級付けした(Birdら、1995)。対照患者は、彼らが黄斑疾患のいかなる際立った徴候も示さず、またはAMDの既知の家族歴を有しなかった場合に、選択されかつ含められた。AMD患者は、彼らが研究に参加した時点での彼らの最も重篤な眼の分類に基づいて、以下の表現型のカテゴリーに下位分類された:初期AMD(ARM)、地図状萎縮症(geographic atrophy)(GA)、および滲出性(CNV)AMD。アイオワ大学のARMおよびGAの症例は、さらに、別個の表現型(RPE変化単独、>10黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、BB(表皮)ドルーゼン、PED、「チェロキー」萎縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症)に下位分類された。すべての症例についての最初期の記録可能な表現型もまた、分析において記録および利用した。

30

【0117】

表1Aに示されるように、H因子遺伝子における多型部位の、AMDとの高度に有意な関連性は、およそ900例のAMDの症例および400例適合させた対照と一緒に含んだ2つの独立したコホートの試験において見出された。H因子遺伝子中の16個の多型を表1A~1Bに示す。このうちの12個は、the National Center for Biotechnology Information(NCBI)において見出され得る、SNPデータベース(dbSNP)において見出される。dbSNPは、ヒトH因子遺伝子におけるSNPのコレクションであり、これは、H因子遺伝子の22個のコーディングエキソンの間に、ならびにH因子遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領域、イントロン、および3'非翻訳領域の間に分散している。以下に列挙するのは、dbSNPデータベースにおいて見出されるヒトH因子遺伝子における379個のSNPについてのアクセッション番号である。これらのSNPは本発明の方法を実行する際に使用することができる。

40

【0118】

【化 1】

表 A

rs17575212	rs11582939	rs7551203	rs5014736	rs2019724	rs534479	rs395963
rs17573867	rs11580821	rs7546015	rs5014735	rs1984894	rs534399	rs395544
rs16840522	rs11579439	rs7540032	rs5014734	rs1928433	rs529825	rs395129
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	
rs11799595	rs9970784	rs5002879	rs1587325	rs569219	rs409319	
rs11799380	rs9970075	rs5002878	rs1576340	rs564657	rs409308	
rs11584505	rs9427909	rs5002877	rs1474792	rs559350	rs407361	

10

20

30

40

る Y 4 2 9 H、ならびにより頻度の低い変異体、エキソン 2 2 における R 1 2 1 0 C は、AMD との最も有意な関連性を示した。

【 0 1 1 9 】

表 1 A ~ 1 B における 3 つのさらなる多型は S N P データベースには見出されない：プロモーターにおける多型（表 1 A におけるプロモーター 1）；2 つの T ヌクレオチドが挿入されているイントロン 2 における多型；およびエキソン 1 0 A における多型である。

【 0 1 2 0 】

表 1 A における第 1 のカラムは、H 因子遺伝子における多型についての d b S N P 番号を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 は、H 因子遺伝子における多型についての d b S N P 指定である。この多型の説明、ならびに d b S N P における他の H 因子遺伝子多型は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=>) において利用可能である。第 2 のカラムは、多型の位置を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型は、H 因子遺伝子のエキソン 2 に位置する。データベース番号によって同定されていない多型は、位置によって言及することができる（例えば、「イントロン 2」）。第 3 のカラムは、多型に及ぶ D N A のコード鎖（上、5 ' から 3 ' 方向）および非コード鎖（下）の核酸配列を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型では、コード鎖についての括弧中に示される G または A は、多型の 5 ' または 3 ' に示される 2 0 ヌクレオチドによって隣接される。エキソン 1 0 A 多型にわたる配列中の「N」は、変異体アレルにおける A、C、G または T のいずれかである単一のヌクレオチドの挿入を示す。第 4 のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。第 5 のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸の変化を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型は、H 因子ポリペプチドの 6 2 位におけるバリン（V）からイソロイシン（I）へのアミノ酸配列の変化を生じる。第 6 のカラムは、対照集団における多型のアレル頻度を列挙する。数字 1 および 2 は、それぞれ、第 3 のカラムの多型部位における第 1 のヌクレオチドおよび第 2 のヌクレオチドに対応するアレルをいう。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型については、G が、対照集団から配列決定されたアレルの 7 8 %、A がその 2 2 % で存在する。第 7 のカラムは、AMD 集団における多型のアレル頻度を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型については、G が、AMD 集団から配列決定されたアレルの 9 1 %、A がその 9 % で存在する。第 8 のカラムは、対照集団および AMD 集団中の多型のアレル頻度間の比較のための、カイ二乗検定およびフィッシャーの直接確率検定（それぞれ、 χ^2 値および P 値）を列挙する。例えば、r s 8 0 0 2 9 2 多型については、 χ^2 値は 1 6 . 1 9 でありかつ P 値は $5 . 7 4 \times 1 0^{-5}$ であり、G アレルが AMD と関連することを示す。

【 0 1 2 1 】

表 1 B の部分（1）、（2）および（3）における第 1 のカラムは、H 因子遺伝子における多型についての d b S N P 番号を列挙する。部分（1）については、第 2 のカラムは、多型にわたる核酸配列を列挙する（質問配列）。r s 5 2 9 8 2 5 多型（イントロン 1）、r s 8 0 0 2 9 2 多型（エキソン 2）、および r s 2 0 3 6 7 4 多型（イントロン 1 0）については、ヒト H 因子遺伝子の非コード鎖の配列を示す。第 3 のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。第 4 のカラムは、チンパンジー H 因子遺伝子に存在するアレルを列挙する。第 5 のカラムは、S N P の位置を列挙する。第 6 のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸変化を列挙する。部分（2）については、第 2 のカラムおよび第 4 のカラムは、多型を増幅するためのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、または A O D 番号を列挙する。第 3 および第 5 のカラムは、プライマーについての配列番号を列挙する。部分（3）については、第 2 および第 4 のカラムは、多型を検出するために使用されるプローブを列挙する。第 3 および第 5 のカラムは、プローブについての配列番号を列挙する。

【 0 1 2 2 】

表 1 A ~ 1 B に列挙されていない H 因子遺伝子におけるさらなる多型部位が AMD と関

10

20

30

40

50

連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、H因子遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。表1CはH因子遺伝子におけるさらなる14個の多型部位を列挙し、これは、dbSNPデータベースには見出されず、AMDまたは他の疾患と関連する可能性がある。第1のカラムはSNPの位置を列挙する。第2のカラムは多型にわたる核酸配列を列挙する。エキソン5多型にわたる配列中の「not G」は、変異体アレル中のA、CまたはTヌクレオチドの存在を示す。エキソン6多型にわたる配列中の「not C」は、変異体アレル中のA、GまたはTヌクレオチドの存在を示す。エキソン21多型にわたる配列中の「N」は、変異体アレル中のA、C、GまたはTのいずれかである単一のヌクレオチドの挿入を示す。第3のカラムは、存在する場合、多型と関連するアミノ酸変化を列挙する。第4のカラムは、配列についての配列番号を列挙する。これらのSNPはまた、本発明の方法を実行する際に使用することができる。さらに、これらのCFH多型は、連鎖および関連性研究、臨床集団の遺伝子型決定、表現型情報に対する遺伝子型情報の相関、ヘテロ接合性の喪失の分析、および細胞サンプルの供給源の同定のために有用であることが認識される。

【0123】

表2は、AMD症例および対照のヒトH因子遺伝子における8個のSNPのハプロタイプ分析を示す。アットリスクハプロタイプは点描したボックスに示し、SNPを決定するハプロタイプ(Y402HおよびIVS10)はより高密度の点描に示す。防御的ハプロタイプは斜線を付けたボックスに示し、SNPを決定するハプロタイプ(IVS1、I62VおよびIVS6)はより高密度の斜線に示す。第1のカラムは、プロモーター中の多型のアレルを列挙する(プロモーター)。第2のカラムは、イントロン1中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する(IVS1)。第3のカラムは、エキソン2中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する(I62V)。第4のカラムは、イントロン6中の多型のアレルを列挙する(IVS6)。第5のカラムは、エキソン9中の多型のアレルを列挙する(Y402H)。第6のカラムは、イントロン10中の多型の非コード鎖のアレルを列挙する(IVS10)。第7のカラムは、エキソン13中の多型のアレルを列挙する(Q672Q)。第8のカラムは、エキソン18中の多型のアレルを列挙する(D936E)。これらの8個のSNPについてのdbSNP割り当ては表1A~1Bに列挙する。第9のカラムは、ハプロタイプについてのオッズ比(OR)を列挙する。第10のカラムは、アットリスクハプロタイプおよび2つの防御的ハプロタイプについてのP値を列挙する。第11のカラムおよび第12のカラムは、AMD症例および対照におけるハプロタイプの頻度を列挙する。

【0124】

表3は、AMDを有する6個のH因子多型のハプロタイプ分析を示す。第1のカラムは、プロモーター中の多型の特定のアレルを列挙する(rs3753394)。第2のカラムは、イントロン1中の多型のアレルを列挙する(rs529825)。第3のカラムは、イントロン6中の多型のアレルを列挙する(rs3766404)。第4のカラムは、イントロン10中の多型を列挙する(rs203674)。第5のカラムは、エキソン13中の多型のアレルを列挙する(rs3753396)。第6のカラムは、エキソン18中の多型のアレルを列挙する(rs1065489)。カラム1~6における数字1および2は、それぞれ、各々の多型部位における第1のヌクレオチドおよび第2のヌクレオチドに対応するアレルをいう(表1Aを参照のこと)。従って、カラム1~6は、H因子遺伝子における5'から3'への多型のアレルを列挙する。第7のカラムは、カラム1~6に列挙された多型に基づいてH因子ハプロタイプを列挙する。第8のカラムは、対照集団における示されたH因子ハプロタイプの頻度を列挙する。第9のカラムは、AMD集団における示されたH因子ハプロタイプの頻度を列挙する。表3に示されるように、ハプロタイプ分析は、複数の変異体が関連に寄与し、AMDのリスクの増加または減少のいずれかを付与し得ることを示唆する。

【0125】

表8は、7個のH因子多型のディプロタイプ分析を示す。第1のカラムは、ディプロタ

10

20

30

40

50

イブが、AMDの発症のリスクの増加（リスクディプロタイプ）または減少（防御的ディプロタイプ）と関連するか否かを示す。一般的なリスクディプロタイプおよび防御的ディプロタイプを示す。第2のカラムは、エキソン2における多型のアレルを列挙する（I 6 2 V）。第3のカラムは、イントロン2における多型のアレルを列挙する（I V S 2 - 1 8）。第4のカラムは、エキソン9における多型のアレルを列挙する（Y 4 0 2 H）。第5のカラムは、エキソン18における多型のアレルを列挙する（D 9 3 6 E）。第6のカラムは、イントロン20における多型のアレルを列挙する（I V S 2 0）。

【0126】

リスク関連（「リスク」）多型およびハプロタイプ

AMDについてのリスクの増加と関連する多型を含む部位を表1Aおよび表2に示す。リスクの増加と特に関連する多型には、rs1061170（402H；エキソン9）；rs203674（イントロン10）および残基1210における多型（R1210C；エキソン22）における変異体アレルが含まれる。

【0127】

AMDについてのリスクの増加と関連する特定のハプロタイプは、表2および6ならびに図5に示される。表2および図5に示されるように、1つの一般的なアットリスクハプロタイプはH1ハプロタイプであり、これは、402位における変異体アレル（ヒスチジンをコードする）およびIVS10における変異体アレル（イントロン10、rs203674）を含み、AMDの症例の49%に見出されるが、対照の26%においてのみ見出される。リスクディプロタイプについてのホモ接合性（H1/H1）は有意にリスクがある。他のリスクがあるハプロタイプおよびディプロタイプは表2および8に示される。同様のデータは表3に提示され、これは、AMD症例の48%において見出されるが、対照の28%においてのみ見出されるアットリスクハプロタイプ（111211）を示す。

【0128】

顕著には、MPGN II（II型膜性増殖性糸球体腎炎）患者の70%は、このアットリスクハプロタイプを有し（表7を参照のこと）、これは、MPGN IIを発症する性向は、AMDについて本明細書に記載されるように、検出および治療することができることを示す。

【0129】

これらの多型部位の有意な関連性はまた、実施例1において開示されるように、種々のAMDサブタイプとともに見出された。

【0130】

H因子遺伝子のエキソン22における1210位のアミノ酸における非同義語多型は、AMDと強力に相関している（表1Aを参照のこと）。アルギニンの代わりにシステインをコードする変異体アレルは、AMDの症例の5%においてヘテロ接合性状態で見出され、アイオワ大学において確認された919例の個体から構成されるコホート中の対照には見出されなかった。1210Cホモ接合性は今日までに同定されている。それゆえに、H因子のアミノ酸1210位におけるシステインの存在は、個体がAMDを有するか、またはAMDを発症する可能性があることの強力な徴候を提供する。顕著には、1210Cは、たとえ他の点では防御的であるアレル（例えば、Y402）上で検出されとしても、AMDまたは他の補体媒介の病気を発症する性向を示す。CFH1210位における変異（R1210C）は、腎臓徴候を伴う補体関連疾患である非定型的溶血性尿毒症性症候群（aHUS）を引き起こすことが知られている。拡大解釈すると、aHUSを引き起こすことが知られている他のCFHの変異または突然変異は、AMDを発症するリスクの増加と関連する可能性がある。最も一般的に確立されたaHUSを引き起こす変異には、T956M、Q1076E、D1119G、W1183L、T1184R、L1189R、L1189F、S1191W、S1191L、V1197A、およびR1215Gが含まれるがこれらに限定されず（Esparza-Gordilloら、2005；Perez-Caballeroら、2001；Richardsら、2001；Sanchez-Corralら、2002）；さらなるaHUSを引き起こす突然変異は、Saunde

10

20

30

40

50

rs (Saundersら、2006)によって記載されている。本発明の1つの局面において、被験体からの生物学的サンプル(例えば、タンパク質または核酸)は、1つ以上のaHUS関連変異または突然変異の存在についてアッセイされ、その存在は、AMDを発症する性向を示す。

【0131】

表1A~1Cに列挙されない、H因子遺伝子におけるさらなる多型部位は、このハプロタイプ分析をさらに洗練し得ることが認められる。H因子遺伝子における非同義語多型を使用するハプロタイプ分析は、変異体H因子ポリペプチドを同定するために有用である。リスクと関連する他のハプロタイプは、中性または防御的ハプロタイプによってコードされるタンパク質と同じ配列を有するタンパク質をコードし得るが、例えば、H因子発現のレベルまたは部位を変化させる、プロモーターまたはイントロンにおけるアレルを含む可能性がある。H因子遺伝子またはH因子関連遺伝子における多型は、隣接する遺伝子における変異と連鎖される可能性があることもまた認められる。隣接する遺伝子におけるこの変異は、コードされるタンパク質の発現または型の変化を生じる可能性があり、キャリア中での有害な効果または防御的な効果を有する可能性がある。

【0132】

防御的多型およびハプロタイプ

予想外に、防御的多型またはハプロタイプもまた発見された。例えば、表2および図5に示すように、IVS6中の変異体アレル(イントロン6、rs3766404)を含む防御的H2ハプロタイプは、対照の12%に存在するが、AMD症例の6%にしか存在しない。防御的H4ハプロタイプは、IVS1中の変異体アレル(イントロン1、rs529825)および変異体アレル(I62)(エキソン2、rs800292)を含み、対照の18%に存在するが、AMD症例の12%にしか存在しない。同様のデータは表3に提示されており、ここでは、ハプロタイプ121111は対照の21%に存在するが、AMD症例の13%にしか存在せず、ハプロタイプ112111は対照の13%に存在するが、AMD症例の6%にしか存在しない。図5に示されるように、防御的ハプロタイプを有するホモ接合性は有意に防御されている。

【0133】

ある場合において、防御的ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は、リスクハプロタイプタンパク質とは異なる配列を有する(例えば、非同義語SNPの存在に起因する)。例えば、防御型のH因子タンパク質は、一般的には、402位にヒスチジンを有しない。ある実施形態において、防御型は、62位にイソロイシンを有する。さらなる防御型は、(1)防御的ハプロタイプを有する単数または複数の個体を同定すること、および(2)個体からのH因子のcDNAまたはタンパク質の配列を決定することによって同定することができる。他の防御型は、VII節において以下に説明されるように同定される。

【0134】

中性多型およびハプロタイプ

特定のハプロタイプは、AMDを発症するリスクの増加または減少のいずれも有しない集団において関連付けられ、これは「中性」と呼ばれる。コーカサス人集団において同定された中性ハプロタイプの例は図5(H3およびH5)に示す。さらなるまたは異なる中性ハプロタイプが、人種的/民族的に異なる集団において同定される可能性がある。中性ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は「中性」H因子タンパク質である。上記に説明したように、「中性」H因子タンパク質は、リスクハプロタイプを有するか、またはAMDを有すると診断された患者に投与されるときに、治療的利点を提供し得る。例えば、中性ハプロタイプによって特徴付けられた遺伝子によってコードされる例示的なタンパク質には、402位にヒスチジンを有しないタンパク質、および/または62位にイソロイシンを有しないタンパク質が含まれる。402位にヒスチジンを有しないタンパク質は、その位置にチロシンを有する可能性があり、またはヒスチジンもしくはチロシン以外のアミノ酸を有する可能性がある。62位にイソロイシ

を有しないタンパク質は、その位置にバリンを有する可能性があり、またはバリンもしくはイソロイシン以外のアミノ酸を有する可能性がある。中性型のH因子タンパク質は、一般的に、1210位にシステインを有しない。

【0135】

V・H因子関連5(CFHR5)遺伝子多型

1つの局面において、本発明は、H因子遺伝子およびCFHR5遺伝子における多型部位がMPGNI Iの発症に対する感受性と関連するという発見に関連する、新規な診断、治療、および薬物スクリーニングの方法を提供する。

【0136】

MPGNI Iと関連するH因子多型およびCFHR5多型は、実施例2に記載されるように、PCR増幅を使用して変異体についてのH因子またはCFHR5のコード領域および隣接するイントロン領域を調べることによって、続いて標準的なプロトコールに従って、アガロースゲル電気泳動および二方向性配列決定を行ってPCR産物を確認することによって同定した。新規なSNPおよび報告されていたSNPを、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)によって対照集団中でタイプ付けした。H因子およびCFHR5のコード配列を増幅するために使用したプライマーは、表9および10にそれぞれ示す。

【0137】

生検で判明したMPGNI Iを有する患者からなる試験群は、腎臓病学部門において確認され、IRB認可ガイドラインの下で本研究に加入させた。対照群は、眼科的試験によってAMDがその中で除外された、民族的に適合させられたが、年齢が一致しない、血縁関係のないヒトからなった。

【0138】

表11および12に示されるように、H因子遺伝子における多型部位の、MPGNI Iとの有意な関連性が、22例のMPGNI I症例および131例の民族的に適合させた対照の試験において見出された。H因子遺伝子における11個の多型を表11および12に列挙する。これらのうちで、6個が、the National Center for Biotechnology Information(NCBI)において見出され得るSNPデータベース(dbSNP)に見出される。dbSNPは、ヒトゲノムにおけるSNPのコレクションである。H因子遺伝子におけるSNPは、H因子遺伝子の22個のコーディングエキソンの間に、ならびにH因子遺伝子のプロモーター、5'非翻訳領域、イントロン、および3'非翻訳領域の間に分散している。dbSNPデータベースにおいて見出されるヒトH因子遺伝子における379個のSNPについてのアクセッション番号は、上記に列挙されている。これらのSNPは本発明の方法を実行する際に使用することができる。

【0139】

表11および12における5個のさらなる多型はSNPデータベースにおいて見出されない：2つのTヌクレオチドが挿入されているイントロン2における多型(IVS2-18insTT)；イントロン7における多型(IVS7-53G>T)；イントロン15における多型(IVS15-30C>A)；イントロン18における多型(IVS18-89T>C)；およびエキソン20における多型(N1050Y)。これらの多型は、本発明の方法において有用である。さらに、これらのCFHR5多型は、連鎖および関連性研究、臨床集団の遺伝子型決定、表現型情報に対する遺伝子型情報の相関、ヘテロ接合性の喪失の分析、および細胞サンプルの供給源の同定のために有用であることが認識される。

【0140】

表11の第1の行は、H因子遺伝子におけるSNPのエキソンまたはイントロンの位置を列挙する。エキソンSNPについては、存在する場合、アミノ酸の位置および変化が列挙される。例えば、エキソン2SNPはH因子ポリペプチドの62位にあり、バリン(V)からイソロイシン(I)に変化している。イントロンSNPについては、SNPの性質が示される。例えば、イントロン2SNPは、2つのヌクレオチド、TTの挿入であ

10

20

30

40

50

る。表 1 1 の第 2 の行は、存在する場合、多型についての dbSNP 番号を列挙する。例えば、rs800292 は、H 因子遺伝子のエキソン 2 における多型についての dbSNP 指定である。この多型の説明、ならびに dbSNP における他の H 因子 (CFH) 遺伝子多型は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=>) において利用可能である。表 1 1 の第 3 から第 5 までの行は、22 例の MPGNII 患者の間に存在する特定のディプロタイプの回数を列挙する。例えば、エキソン 2 SNP については、GG が MPGNII を有する 20 例の患者の中に存在し、GA はその 2 例の患者の中に存在し、そして AA はその患者の中に存在しない。表 1 1 の第 6 および第 7 の行は、特定のハプロタイプが、22 例の MPGNII 患者の間に存在する頻度を列挙する。例えば、エキソン 2 SNP については、G は、22 例の MPGNII 患者のアレルの 95% に存在し、A は、その 5% に存在する。第 8 の行は、22 例の MPGNII 患者についての H 因子遺伝子における共通のハプロタイプのヌクレオチドを列挙する。例えば、22 例の MPGNII 患者についての H 因子遺伝子において、G はエキソン 2 SNP におけるより頻繁なヌクレオチドであり、9 T ヌクレオチドは、イントロン 2 SNP における 11 T ヌクレオチドよりも頻繁に観察される。残りの行は、22 例の MPGNII 患者の各々についての H 因子遺伝子における 11 個の SNP についてのディプロタイプを列挙する。

10

【0141】

表 1 1 に列挙されていない H 因子遺伝子におけるさらなる多型部位が MPGNII と関連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、H 因子遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。

20

【0142】

表 1 2 は、AMD - 陰性である民族的に適合させられた対照個体に対する、MPGNII を有する患者における SNP 頻度の比較を示す。表 1 2 の第 1 のカラムは、H 因子遺伝子における SNP を列挙する。表 1 2 の第 2 および第 3 のカラムは、特定のハプロタイプが 22 例の MPGNII 患者の間に存在する頻度を列挙する。表 1 2 の第 4 および第 5 のカラムは、特定のハプロタイプが 131 例の対照個体の間に存在する頻度を列挙する。表 1 2 の第 6 のカラムは、各データセットについて計算した P - 値を列挙する。

【0143】

30

表 1 1 および 1 2 に示されるように、2 つの高頻度の非同義語変異体であるエキソン 2 における I62V およびエキソン 9 における Y420H、同義語変異体であるエキソン 10 における A307A、ならびにイントロン 2 における多型は、MPGNII との有意な関連性を示した。

【0144】

表 1 4 および 1 5 に示されるように、CFHR5 遺伝子における多型部位の MPGNII との有意な関連性は、22 例の MPGNII の症例および 103 例の民族的に適合させられた対照の試験において見出された。CFHR5 遺伝子中の 5 個の多型は表 1 4 および 1 5 に列挙され；これらは、NCBI の dbSNP において見出される。CFHR5 遺伝子中の SNP は、CFHR5 遺伝子の 10 個のコーディングエキソンの間に、ならびに CFHR5 遺伝子のプロモーター、5' 非翻訳領域、イントロン、および 3' 非翻訳領域の間に分散している。以下に列挙するのは、dbSNP データベースにおいて見出されるヒト CFHR5 遺伝子における 82 個の SNP についてのアクセッション番号である。これらの SNP は本発明の方法を実行する際に使用することができる。

40

【0145】

【化 2】

表 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	

10

表 1 4 の第 1 の行は、C F H R 5 遺伝子における S N P のエキソン、プロモーターまたはイントロンの位置を列挙する。エキソン S N P については、存在する場合、アミノ酸の位置および変化が列挙される。例えば、エキソン 2 S N P は C F H R 5 ポリペプチドの 4 6 位にあり、プロリン (P) からセリン (S) に変化している。プロモーターおよびイントロン S N P については、S N P の性質が示される。例えば、- 2 4 9 位のプロモーター S N P は、T を C で置換している。表 1 4 の第 2 の行は、存在する場合、多型について

の d b S N P 番号を列挙する。例えば、r s 9 4 2 7 6 6 1 は、C F H R 5 遺伝子のプロモーター領域における多型についての d b S N P 指定である。この多型の説明、ならびに d b S N P における他の C F H R 5 遺伝子多型は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=>) において利用可能である。表 1 4 の第 3 から第 5 までの行は、2 2 例の M P G N I I 患者の間に存在する特定のディプロタイプの回数を列挙する。例えば、エキソン 2 S N P については、C C が M P G N I I を有する 1 9 例の患者の中に存在し、C T はその 3 例の患者の中に存在し、そして T T はその患者の中に存在しない。表 1 4 の第 6 および第 7 の行は、特定のハプロタイプが、2 2 例の M P G N I I 患者の間に存在する頻度を列挙する

。例えば、エキソン 2 S N P については、C (プロリンをコードする) は、2 2 例の M P G N I I 患者のアレルの 9 3 % に存在し、T (セリンをコードする) は、その 7 % に存在する。第 8 の行は、2 2 例の M P G N I I 患者についての C F H R 5 遺伝子における共通のハプロタイプのヌクレオチドを列挙する。例えば、2 2 例の M P G N I I 患者についての C F H R 5 遺伝子において、C はエキソン 2 S N P におけるより頻繁なヌクレオチドである。残りの行は、2 2 例の M P G N I I 患者の各々についての C F H R 5 遺伝子における 5 個の S N P についてのディプロタイプを列挙する。

20

30

【 0 1 4 6 】

表 1 4 に列挙されていない C F H R 5 遺伝子におけるさらなる多型部位が M P G N I I と関連する可能性があることが理解されるべきである。例えば、C F H R 5 遺伝子における例示的な多型部位が上記に列挙され、これには限定されない。

40

【 0 1 4 7 】

表 1 5 は、A M D - 陰性である民族的に適合させた対照個体に対する、M P G N I I を有する患者における S N P 頻度の比較を示す。表 1 5 の第 1 のカラムは、C F H R 5 遺伝子における S N P を列挙する。表 1 5 の第 2 および第 3 のカラムは、特定のハプロタイプが 2 2 例の M P G N I I 患者についての間に存在する頻度を列挙する。表 1 5 の第 4 および第 5 のカラムは、特定のハプロタイプが 1 0 3 例の対照個体の間に存在する頻度を列挙する。表 1 5 の第 6 のカラムは、各データセットについて計算した P - 値を列挙する。

【 0 1 4 8 】

表 1 4 および 1 5 に示されるように、1 つの非同義語変異体であるエキソン 2 における

50

P 4 6 S、および2つのプロモーター多型、- 2 4 9 T > C および - 2 - T > C は、M P G N I I との有意な関連性を示した。

【 0 1 4 9 】

M P G N I I 患者において同定されるリスク関連 (「リスク」) 多型およびハプロタイプ

M P G N I I のリスクの増加と関連する H 因子および C F H R 5 における多型を含む部位は、表 1 1 および 1 2、ならびに表 1 4 および 1 5 にそれぞれ示される。H 因子および C F H R 5 のリスクの増加と特に関連する多型には、それぞれ、r s 1 0 6 1 1 7 0 (エキソン 9 における Y 4 2 0 H) および r s 1 2 0 9 7 5 5 0 (エキソン 2 における P 4 6 S) における変異体アレルが含まれる。

10

【 0 1 5 0 】

M P G N I I についてのリスクの増加と関連する特定のハプロタイプは、表 1 2 および 1 5 に示される。表 1 2 に示されるように、H 因子遺伝子における 1 つのアットリスクハプロタイプは、4 0 2 位において変異体アレル (ヒスチジンをコードする) を含み、これは M P G N I I 症例の 6 4 % において見出されるが、対照の 3 3 % においてしか見出されない。表 1 5 に示されるように、C F H R 5 遺伝子における 1 つのアットリスクハプロタイプは、4 6 位において変異体アレル (セリンをコードする) を含み、これは M P G N I I 症例の 7 % において見出されるが、対照の < 1 % においてしか見出されない。

【 0 1 5 1 】

表 1 1 ~ 1 2 および 1 4 ~ 1 5 に列挙されない、H 因子遺伝子および C F H R 5 遺伝子におけるさらなる多型部位は、これらのハプロタイプ分析をさらに洗練し得ることが認められる。H 因子遺伝子または C F H R 5 遺伝子における非同義語多型を使用するハプロタイプ分析は、変異体 H 因子ポリペプチドまたは C F H R 5 ポリペプチドを同定するために有用である。リスクと関連する他のハプロタイプは、中性または防御的ハプロタイプによってコードされるタンパク質と同じ配列を有するタンパク質をコードし得るが、例えば、H 因子または C F H R 5 の発現のレベルまたは部位を変化させる、プロモーターまたはイントロンにおけるアレルを含む可能性がある。

20

【 0 1 5 2 】

防御的多型およびハプロタイプ

予想外に、防御的多型またはハプロタイプもまた発見された。例えば、表 1 2 に示すように、エキソン 2 中の変異体アレル (r s 8 0 0 2 9 2、I 6 2 V) を有するハプロタイプは、対照の 2 3 % に存在するが M P G N I I 症例の < 3 % にしか存在せず、I V S 2 中の変異体アレル (イントロン 2、- 1 8 i n s T T) を有するハプロタイプは、対照の 2 6 % に存在するが M P G N I I 症例の < 3 % にしか存在しない。エキソン 1 0 中の変異体アレル (r s 2 2 7 4 7 0 0、A 4 7 3 A) を有するハプロタイプは、M P G N I I 症例よりも対照においてより高頻度で存在する。

30

【 0 1 5 3 】

ある場合において、防御的ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は、リスクハプロタイプタンパク質とは異なる配列を有する。例えば、防御型の H 因子タンパク質は、一般的には、4 0 2 位にヒスチジンを有しない。ある実施形態において、防御型は、6 2 位にイソロイシンを有する。さらなる防御型は、(1) 防御的ハプロタイプを有する単数または複数の個体を同定すること、および (2) 個体からの H 因子の c D N A またはタンパク質の配列を決定することによって同定することができる。ある防御型は全長よりも短い。C F H R 5 タンパク質の防御型は同様に同定されてもよい。

40

【 0 1 5 4 】

中性多型およびハプロタイプ

特定のハプロタイプは、M P G N I I を発症するリスクの増加または減少のいずれとも関連付けられず、これは「中性」と呼ばれる。中性ハプロタイプによって特徴付けられる遺伝子によってコードされるタンパク質は「中性」H 因子タンパク質または C F H R 5 タ

50

ンパク質である。例えば、中性ハプロタイプによって特徴付けられた遺伝子によってコードされる例示的なタンパク質には、402位にヒスチジンを有しないH因子タンパク質、および/または62位にイソロイシンを有しないH因子タンパク質、ならびに46位にセリンを有しないCFHR5タンパク質が含まれる。

【0155】

MPGNI患者における多型の有意性

実施例2に示されるように、AMDを発症する性向と関連する同じCFH多型がまた、II型膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN II)の発症とも関連することが発見された。確かに、AMD患者においても見出されたリスクハプロタイプ(Y402HおよびIVS10)はまた、II型膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN II)を有する試験された患者の70%において見出され、このことは、本発明の診断方法がこの病気を検出するために有用であることを示す。加えて、CFHR5遺伝子中の変異およびハプロタイプは、MPGNIを有するリスクの増加と強力に関連した。これらのデータから浮かび上がる強力な結論は、MPGNIおよびAMDが同じ遺伝子損傷の代替的な出現であることである。顕著には、MPGNIを有する患者はドルーゼンを発症し、これは、AMDにおいて形成するドルーゼンと、臨床的かつ組成的に区別できない。これらの2つの基底部の表現型を区別する単一の特徴は発症の年齢であり - MPGNIにおけるドルーゼンは、初期、しばしば、10歳代に発症するのに対して、AMDにおけるドルーゼンは高齢期に発症する。本発明者らは、いずれかの集団(AMDまたはMPGNI)において同定されたH因子遺伝子およびCFHR5遺伝子における多型が、両方の疾患に対する感受性を予測すると結論付けた。MPGNIに寄与し、および初期の徴候の原因である他の因子が存在していると思われる。AMDは非常に一般的であり、MPGNIはまれであるので、CFHとCFHR5遺伝子の両方のハプロタイプ分析および本明細書に記載される他の方法は、AMDを有するか、またはAMDを発症する可能性の増加を有する患者のスクリーニングおよび治療のために有用である。

【0156】

機能の喪失

H因子またはCFHR5の通常または野生型の機能の喪失は、AMDと関連する可能性がある。H因子遺伝子における非同義語多型、例えば、AMDと最強の相関を示し、かつ変異体H因子ポリペプチドまたは変異体CFHR5ポリペプチドを生じる、表1A、1B、1C、11、14および15に示されるものが、AMDにおいて原因となる役割を有するようである。このような役割は、このような非同義語多型を有するヒトH因子またはCFHR5を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製すること、およびこの動物がAMDを発症するか否かを決定することによって確認することができる。終止コドンを導入するH因子またはCFHR5コード領域における多型は、機能的H因子またはCFHR5タンパク質を減少または除去することによってAMDを引き起こす可能性がある。終止コドンはまた、全長タンパク質と比較して異常な活性を有する短縮型H因子またはCFHR5ペプチドの産生を引き起こす可能性がある。プロモーターおよびイントロンなどの調節領域における多型は、H因子またはCFHR5遺伝子発現を減少させることによってAMDを引き起こす可能性がある。イントロン(例えば、CFHのイントロン2)における多型もまた、遺伝子スプライシングパターンを変化させて、変化したH因子またはCFHR5タンパク質を生じることによってAMDを引き起こす可能性がある。CFHRNAまたはタンパク質は、スプライシング変異体の発現の変化を検出するためにアッセイすることができ、ここで、上記変化は、AMDを発症する性向を示す。選択的スプライシングパターンは、H因子遺伝子それ自体について報告されてきた。

【0157】

AMDに対するH因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型の効果は、いくつかの手段によって決定することができる。変異体H因子またはCFHR5ポリペプチドの発現レベルの変化は、AMDまたはAMDの種々のサブタイプを有するかまたは有しない個体の群からのサンプル中のタンパク質レベルを測定することによって決定することができ

10

20

30

40

50

る。変異体H因子またはCFHR5ポリペプチドの生物学的活性の変化は、上記の個体の群からのサンプル中で、H因子またはCFHR5のインビトロ活性、例えば、C3bまたはヘパリンへの結合をアッセイすることによって検出することができる。

【0158】

VI. ゲノム複製の部位における多型

図18において図示されるように、CFHについての遺伝子およびH因子関連(CFH R)1~5遺伝子は、ゲノム複製からおそらく生じる、共有される、保存性の配列の領域を有する。CFHまたはCFHR5において見出される特定のSNPおよび変異、例えば、本明細書に記載されるものはまた、CFHR1、CFHR2、CFHR3、およびCFHR4の対応する配列中にあることが予測される。例えば、CFHエキソン22に対応する配列は、CFH、CFHR1およびCFHR2において見出され、CFHのエキソン22において同定される多型(例えば、R1210C)もまたCFHR1および/またはCFHR2において見出されることが可能であり、これらの変異体は、AMD、MPGNI I、および他の補体関連の病気の発症への性向と関連する可能性がある。CFHおよびCFHR5において同定された多型部位に隣接する配列の相同性ブロックは、これらの領域におけるcDNA配列またはゲノム配列のアラインメントによって同定することができる。多型部位に隣接するこれらの保存配列は、通常、ヌクレオチドレベルで少なくとも95%同一性を有し、および時折、少なくとも98%同一性、少なくとも99%同一性、または100%同一性をさえ有する、少なくとも10bp(多型部位のいずれかの側で)、およびより頻繁には少なくとも20bp、または少なくとも50bp、または少なくとも100bpを含む。同一性は検査または周知のアルゴリズム(SmithおよびWaterman、1981またはNeedlemanおよびWunsch、1970、両方とも前出)を使用することによって決定することができる。それゆえに、本発明は、CFHまたはCFHR5遺伝子における相同多型部位に対応するH因子関連遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出することによって、加齢性黄斑変性(AMD)または他の病気を発症する被験体の性向を決定する方法を提供する。

【0159】

CFHおよびH因子関連遺伝子についての配列は当該分野で公知である(本明細書の他の箇所提供される配列およびアクセッション番号を参照のこと)。以下もまた参照のこと:Rodriguez de Cordoba, S.ら、2004, Mol Immunol 41:355-67;Zipfelら、1999, Immunopharmacology 42:53-60;Zipfelら、Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases, Biochem Soc Trans. 2002 Nov;30(Pt 6):971-8;Diaz-Guillen MAら、A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes, Immunogenetics, 1999 Jun;49(6):549-52;Skerka Cら、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ら、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ら、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ら、Biochemical and functional characterization

10

20

30

40

50

of the factor-H-related protein 4 (FHR-4), Immunopharmacology. 1997 Dec; 38(1~2): 149-57; Skerka C⁵, 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 J⁵, 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 M⁵, 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 JL⁵, Location and structure of the human FHR-5 gene, Genetica. 2002 Mar; 114(2): 157-61; McRae JL⁵, 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 B⁵, Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits, Am J Kidney Dis. 2002 Jan; 39(1): 24-7.

【0160】

VII. AMDと関連するH因子多型の検出および分析

H因子遺伝子およびCFHR5遺伝子における多型部位およびハプロタイプがAMD（およびMPGNII）と関連するという発見は、AMDを発症するリスクを確認するために個体をスクリーニングすること、およびAMDに苦しんでいる個体、またはAMDのリスクの増加を有する個体の新規なまたは最適な治療的アプローチの同定を含む、多数の具体的な応用を有する。特定のメカニズムに限定されることを意図することはないが、H因子遺伝子における多型は、さまざまなやり方で個体の表現型に寄与し得る。H因子のタンパク質コード領域中に存在する多型は、タンパク質の構造および/または機能に影響を与えることによって表現型に寄与し得る。H因子の非コード領域中に存在する多型は、複製、転写および/または翻訳に対するそれらの影響を介して間接的に表現型の効果を発揮し得る。H因子遺伝子における特定の多型は、特定のAMD表現型に原因として関係している別個の突然変異を個体に生じやすくし得る。もしくは、上述のように、CFH遺伝子またはCFHR5中の多型は、隣接する遺伝子（CFHR-1、2、3、または4を含むが、これに限定されない）における変異に連鎖され得る。この隣接する遺伝子における変異は、コードされるタンパク質の発現および型の変化を生じる可能性があり、キャリアにおいて有害なまたは防御的な効果を有する可能性がある。

【0161】

A. 分析のためのサンプルの調製

多型は、評価される個体から単離された標的核酸において検出される。典型的には、ゲノムDNAが分析される。ゲノムDNAのアッセイのためには、ゲノムDNAまたはRNAを含む実質的に任意の生物学的サンプル、例えば、有核細胞が適切である。例えば、実施例1に記載される実験において、ゲノムDNAは、症例および対照の被験体から採取された末梢血白血球から得られた（QIAamp DNA Blood Maxi kit

、Qiagen, Valencia, CA)。他の適切なサンプルには、唾液、頬かきとり物、網膜の生検、腎臓または肝臓または他の器官または組織、皮膚生検；羊水またはCVSサンプルなどが含まれる。もしくは、RNAまたはcDNAをアッセイすることができる。もしくは、以下に議論されるように、アッセイは、変異体Hタンパク質を検出することができる。診断アッセイまたは他のアッセイにおける使用のための、患者サンプルからの核酸またはタンパク質の精製または部分精製のための方法は周知である。

【0162】

B．標的核酸における多型の検出

表1A、1B、1C、11、14および15において示されるH因子遺伝子およびH因子関連5遺伝子における多型部位、ならびにH因子遺伝子またはCFHR5遺伝子に局在するか、またはそれに隣接するdbSNPコレクションにおける他の多型部位（上記のリストを参照のこと）を占める塩基の同定は、個体、例えば、分析される個体において、当該分野で公知であるいくつかの方法のいずれかを使用して決定することができる。例には以下が含まれる：アレルト異的プローブの使用；アレルト異的プライマーの使用；直接的配列分析；変性勾配ゲル電気泳動（DGGE）分析；一本鎖コンホメーション多型（SSCP）分析；および変性高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）分析。DNAにおける多型を検出するための他の周知の方法には以下の使用が含まれる：分子ビーコン技術（例えば、Piatekら、1998；Nat. Biotechnol. 16:359-63；TyagiおよびKramer, 1996, Nat. Biotechnology 14:303-308；ならびにTyagiら、1998, Nat. Biotechnol. 16:49-53を参照のこと）、インベーター技術（例えば、Neriら、2000, Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis 3826:117-125および米国特許第6,706,471号を参照のこと）、核酸配列ベースの増幅（Nasba）（Compton、1991）、スコピーオン技術（Thelwellら、2000, Nuc. Acids Res, 28:3752-3761およびSolinasら、2001, 「Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications」Nuc. Acids Res, 29:20.）、制限フラグメント長多型（RFLP）分析など。さらなる方法は当業者に明らかである。

【0163】

多型を分析するためのアレルト異的プローブの設計および使用は、例えば、Saikiら、1986；Dattagupta, EP 235,726, Saiki, WO 89/11548によって記載されている。手短に述べると、アレルト異的プローブは、2つのセグメントが異なる多型を表すならば、1例の個体からの標的DNAのセグメントにハイブリダイズするが、別の個体からの対応するセグメントにはハイブリダイズしないように設計される。所定のプローブが2つのアレルの一方のみに本質的にハイブリダイズするように十分にストリンジェントであるハイブリダイゼーション条件が選択される。典型的には、アレルト異的プローブは、標的DNAのセグメントにハイブリダイズして、多型部位がプローブの中心位置に整列するように設計される。

【0164】

H因子多型を分析するための例示的なアレルト異的プローブを表16Aに示す。例示として多型dbSNP番号rs1061170を使用して、アレルト異的プローブの例には以下が含まれる：5'-TTTCTTCCATAATTTTG-3' [配列番号234]（参照アレルト異的プローブ）および5'-TTTCTTCCATGATTTTG-3' [配列番号235]（変異体アレルト異的プローブ）；ならびに5'-TAATCAAAATATGGAA-3' [配列番号232]（参照アレルト異的プローブ）および5'-TAATCAAAATCATGGAA-3' [配列番号233]（変異体アレルト異的プローブ）。この例において、アレルト異的プローブの第1のセットは、エキソン9多型に及ぶH因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズする。アレルト異的プローブの第2のセットは、エキソン9多型に及ぶH因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズする。これらのプローブは17塩基長で

ある。アレルト異的プローブの最適な長さは、当該分野において公知である方法を使用して容易に決定することができる。

【0165】

アレルト異的プローブは、しばしば対で使用され、対の1つのメンバーは標的配列の参照アレルにハイブリダイズするように設計され、他方のメンバーは変異体アレルにハイブリダイズするように設計される。いくつかの対のプローブは、同じ標的遺伝子配列中の複数の多型の同時分析のために同じ支持体上に固定化することができる。

【0166】

多型を分析するためのアレルト異的プライマーの設計および使用は、例えば、WO 93/22456およびGibbs、1989によって記載される。手短に述べると、アレルト異的プライマーは、プライマーが特定のアレル型に完全に相補性を示す場合にのみ、多型と重複する標的DNAの部位にハイブリダイズし、かつ標準的なPCRプロトコールに従うDNA増幅を開始するように設計される。一塩基のミスマッチはDNA増幅を妨害し、検出可能なPCR産物が形成されない。この方法は、多型部位がプライマーの極度に3'末端にあるときに最高に機能する。なぜなら、この位置は、プライマーからの伸長に対して最も不安定であるからである。

【0167】

H因子多型を分析するための例示的なアレルト異的プライマーを表16Bに示す。例示として多型dbSNP番号rs1061170を使用して、アレルト異的プライマーの例には以下が含まれる：5'-CAAACTTTCTTCCATA-3' [配列番号294] (参照アレルプライマー) および5'-CAAACTTTCTTCCATG-3' [配列番号295] (変異体アレルプライマー)；ならびに5'-GGATAATAATCAAAATT-3' [配列番号292] (参照アレルプライマー) および5'-GGATAATAATCAAAATC-3' [配列番号293] (変異体アレルプライマー)。この例において、アレルト異的プライマーの第1のセットは、エキソン9における多型に直に隣接するH因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズし、示されるように、最後のヌクレオチドが、参照または変異体多型アレルに相補的である。これらのプライマーは、多型から下流の特定の位置においてH因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズする別の共通のプライマーとともに、標準的なPCRプロトコールにおいて使用される。アレルト異的プライマーの第2のセットは、エキソン9における多型に直に隣接するH因子遺伝子のコード鎖にハイブリダイズし、示されるように、最後のヌクレオチドが、参照または変異体多型アレルに相補的である。これらのプライマーは、多型から上流の特定の位置においてH因子遺伝子の非コード鎖にハイブリダイズする別の共通のプライマーとともに、標準的なPCRプロトコールにおいて使用される。共通のプライマーは、得られるPCR産物が、約100～約300塩基長、または約150～約250塩基長で変動可能であるように選択されるが、より小さな(約50～約100塩基長)またはより大きな(約300～約500塩基長)のPCR産物もまた可能である。プライマーの長さは、約10～約30塩基長、または約15～25塩基長で変動可能である。共通のプライマーの配列は、GenBankアクセッション番号AL049744の下で見出されるH因子ゲノム配列の検査によって決定することができる。

【0168】

多型を検出するための方法の多くは、標的サンプルからDNAまたはRNAを増幅する工程(例えば、H因子特異的プライマーを使用して個体のH因子遺伝子のセグメントを増幅する工程)および増幅した遺伝子を分析する工程を包含する。これは、標準的なポリメラーゼ連鎖反応(PCRおよびRT-PCR)プロトコールおよび当該分野で公知である他の方法によって達成することができる。この増幅する工程は、H因子遺伝子における単一ヌクレオチド多型部位に及ぶ、H因子アレルト異的オリゴヌクレオチドの生成を生じ得る。H因子特異的プライマー配列およびH因子アレルト異的オリゴヌクレオチドは、H因子遺伝子のコード(エキソン)または非コード(プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳)領域から誘導され得る。

10

20

30

40

50

【0169】

PCRを使用して生成した増幅産物は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)の使用によって分析することができる。異なるアレルは、溶液中での配列依存的な融解特性および電気泳動の移動度に基づいて同定することができる。Erllich編、PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Chapter 7 (W. H. Freeman and Co, New York, 1992)を参照のこと。

【0170】

標的配列のアレルは、一本鎖コンホメーション多型(SSCP)分析を使用して識別することができる。異なるアレルは、一本鎖PCR産物の配列および構造依存的な電気泳動の移動度に基づいて同定することができる(Oritaら、1989)。増幅されるPCR産物は、標準的なプロトコールに従って生成することができ、加熱するか、あるいは変性させて一本鎖産物を形成し、これは、塩基配列に部分的に依存している二次構造を再フォールディングまたは形成し得る。

10

【0171】

標的配列のアレルは、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)分析を使用して識別することができる。異なるアレルは、一本鎖PCR産物のクロマトグラフィーの移動度の変化によって、塩基の違いに基づいて同定することができる(FruehおよびNoyer-Weidner、2003)。増幅されるPCR産物は、標準的なプロトコールに従って生成することができ、加熱するか、あるいは変性させて一本鎖産物を形成し、これは、塩基配列に部分的に依存している二次構造を再フォールディングまたは形成し得る。

20

【0172】

多型の直接的配列分析は、当該分野において周知であるDNA配列決定手順を使用して達成することができる。Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第2版、C SHP, New York 1989)およびZyskindら、Recombinant DNA Laboratory Manual (Acad. Press, 1988)を参照のこと。

【0173】

生物学的サンプル中で多型を検出するための広範な種々の他の方法が当該分野において公知である。例えば、Ullmanら、「Methods for single nucleotide polymorphism detection」米国特許第6,632,606号; Shi、2002, 「Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes」Am J Pharmacogenomics 2:197-205; Kwokら、2003, 「Detection of single nucleotide polymorphisms」Curr Issues Biol. 5:43-60を参照のこと。

30

【0174】

本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、H因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせ、ならびに本明細書に提供される他のものは、例示のために提供され、限定のためではない。本発明の1つの局面において、H因子遺伝子における以下の多型部位の1つ以上において患者のアレルが決定される: rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; および rs203674。1つの実施形態において、rs529825において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs800292において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs3766404において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs1061147において患者のアレルが決定される。1つの

40

50

実施形態において、rs1061170において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs203674において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs529825およびrs800292の少なくとも1つが決定される。1つの実施形態において、rs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つが決定される。1つの実施形態において、rs529825およびrs800292の少なくとも1つが決定され、rs3766404が決定され、rs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つが決定される。1つの実施形態において、rs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170およびrs203674におけるアレルが決定される。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。すなわち、本発明を実施する際に有用な他の多型およびハプロタイプは、本開示から明らかである。

10

【0175】

本発明の関連する局面において、H因子遺伝子における以下の多型部位の1つ以上において患者のアレルが決定される：rs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；エキソン10A；rs203674；rs375046；およびエキソン22（1210）。1つの実施形態において、rs529825において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs800292において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、イントロン2において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs3766404において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs1061147において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs1061170において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、エキソン10Aにおいて患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs203674において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs375046において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、エキソン22（1210）において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs529825およびrs800292の少なくとも1つが決定され；イントロン2が決定され；rs3766404が決定され；rs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つが決定され；エキソン10Aが決定され；rs375046が決定され；エキソン22（1210）が決定される。1つの実施形態において、rs529825、rs800292、イントロン2；rs3766404、rs1061170、エキソン10A、rs203674、rs375046、およびエキソン22（1210）においてアレルが決定される。1つの実施形態において、H因子遺伝子における1個、2個、3個、4個、5個、または5個より多くの以下の多型部位が決定される：rs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；rs2274700；エキソン10A；rs203674；rs375046；およびエキソン22（1210）。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。

20

30

40

【0176】

上記に議論したように、H因子遺伝子のエキソン22の中の1210位のアミノ酸における非同義語多型はAMDと強力に関連しており、それゆえに、H因子の1210位のアミノ酸におけるシステインの存在は、個体がAMDを有するか、またはAMDを発症する可能性があることの強力な指標を提供する。顕著には、1210Cは、さもなくば保護的であるアレル上で検出されるときでさえ（例えば、Y402）、AMDまたは他の補体媒介の病気を発症する性向を示す。従って、エキソン22（1210）における患者のアレルは、AMDまたは他のH因子関連疾患を発症するリスクに関して高度に情報を与える。

【0177】

本発明の関連する局面において、CFHR5遺伝子における以下の多型部位の1つ以上

50

における個体のアレルが決定される：rs9427661(-249T>C)；rs9427662(-20T>C)；およびrs12097550(P46S)。1つの実施形態において、rs9427661において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs9427662において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs12097550において患者のアレルが決定される。1つの実施形態において、rs9427661およびrs9427662の少なくとも1つが決定される。1つの実施形態において、rs9427661およびrs9427662の少なくとも1つが決定され、rs12097550が決定される。1つの実施形態において、rs9427661、rs9427662およびrs12097550が決定される。上述の多型および多型の組み合わせは、例示のために本明細書に提供され、いかなる場合においても、本発明を限定することを意図しない。すなわち、本発明を実施する際に有用な他の多型およびハプロタイプは、本開示から明らかである。

【0178】

C. タンパク質変異体の検出

本発明の1つの実施形態において、タンパク質アッセイが、被験体のCFH遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型を特徴付けするために実行される。変異体CFH、HFL1およびCFHR5の検出のために適合可能な方法は周知である。これらの方法には、電気泳動(キャピラリー電気泳動および二次元電気泳動を含む)などの分析生化学的方法、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、超拡散クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法、質量スペクトル分析、および流体またはゲル沈降素反応、免疫拡散(一重または二重)免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、ウェスタンブロッティングなどの種々の免疫学的方法が含まれる。

【0179】

例えば、本発明の実施のために適切な多数の十分に確立された免疫学的結合アッセイ形式が知られている(例えば、Harlow, E.; Lane, D. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988; および Ausubelら、(2004) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NYを参照のこと)。このアッセイは、例えば、競合的または非競合的であり得る。典型的には、免疫学的結合アッセイ(またはイムノアッセイ)は、分析物に特異的に結合し、およびしばしば、これを固定化するための「捕捉剤」を利用する。1つの実施形態において、この捕捉剤は、変異体CFHまたはCFHR5ポリペプチドまたはサブ配列に特異的に結合する部分である。結合したタンパク質は、例えば、検出可能に標識された抗CFH/CFHR5抗体を使用して検出されてもよい。1つの実施形態において、この抗体の少なくとも1つは、変異体形態に特異的である(例えば、野生型CFHまたはCFHR5ポリペプチドに結合しない)。1つの実施形態において、変異体ポリペプチドは、イムノブロット(ウェスタンブロット)形式を使用して検出される。

【0180】

D. 患者のAMDのスクリーニング/診断

AMDまたはAMDの特定のサブタイプと相関する、H因子遺伝子における多型、例えば、表1A、表1B、表1Cに示されるもの、または本明細書に記載されるように同定されるものは、AMDもしくはAMDの特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。AMDまたはAMDの特定のサブタイプと相関する、CFHR5遺伝子における多型、例えば、表14および15に示されるもの、または本明細書に記載されるように同定されるものは、AMDもしくはAMDの特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。これらの多型はまた、MPGNI Iおよび他のH因子関連疾患をスクリーニングするために有用である。

【0181】

A M Dを発症する高いリスクがあると同定された個体は、以下に記載され、当該分野において公知であり、または将来開発される、頻繁な眼科的な検査および治療を含む、リスクを減少させるための段階を経ることができる。

【 0 1 8 2 】

実施例 1 に記載されるように、誘発性の事象（例えば、感染）と組み合わせたアットリスク C H F ハプロタイプは、疾患の出現のために十分であるように思われる。A M Dのリスクがあると同定された患者は、感染の初期の徴候において積極的治療（例えば、抗生物質、抗炎症薬剤、防御型の C F H / C F H R 5 を用いる治療、または C F H 活性の他の調節因子を用いる治療）を受けることができる。

【 0 1 8 3 】

このようないくつかの多型型の組み合わせた検出（すなわち、特定の部位における多型の存在または非存在）、例えば、単独でまたは表 1 A ~ 1 C には含まれないさらなる H 因子遺伝子の多型と組み合わせた、表 1 A、表 1 B および / または表 1 C において列挙された H 因子遺伝子における多型の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはすべてが、正確な診断の確率を増加させり可能性がある。同様に、C F H R 5 遺伝子におけるいくつかの多型の組み合わせた検出、例えば、単独でまたは表 1 4 および 1 5 には含まれないさらなる C F H R 5 遺伝子の多型と組み合わせた、表 1 4 および 1 5 において列挙された C F H R 5 遺伝子における多型の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはすべてが、正確な診断の確率を増加させる可能性がある。1 つの実施形態において、スクリーニングは、H 因子遺伝子における少なくとも 1 つの多型、および C F H R 5 遺伝子における少なくとも 1 つの多型の存在または非存在を決定する工程を含む。1 つの実施形態において、スクリーニングは、C F H R 5 遺伝子における少なくとも 2 個、3 個、または 4 個の多型と組み合わせて、H 因子遺伝子における少なくとも 2 個、3 個、または 4 個の多型の存在または非存在を決定する工程を含む。

【 0 1 8 4 】

H 因子遺伝子および C F H R 5 遺伝子における多型は、A M D を有する患者の家族メンバーにおいて、ならびに一般的集団において、A M D もしくは A M D の特異的サブタイプ、またはそれに対する感受性を診断する際に有用である。

【 0 1 8 5 】

診断方法において、H 因子多型および / または C F H R 5 多型の分析は、A M D と関連する他の遺伝子における多型の分析、A M D のタンパク質マーカーの検出（例えば、H a g e m a n ら、特許出願 U S 2 0 0 3 0 0 1 7 5 0 1 ; U S 2 0 0 2 0 1 0 2 5 8 1 ; W O 0 1 8 4 1 4 9 ; および W O 0 1 0 6 2 6 2 を参照のこと）、A M D の他のリスク要因（例えば、家族歴）の評価、眼科的検査、ならびに他のアッセイおよび手順と組み合わせることができる。

【 0 1 8 6 】

E) 薬物治療のための患者の同定

H 因子遺伝子および C F H R 5 遺伝子における多型はまた、A M D のための薬物候補についての臨床試験を実施するために適切な患者を同定するために有用である。このような試験は、H 因子遺伝子および / もしくは C F H R 5 遺伝子における多型部位の規定されたコレクションにおいて同様のまたは同一の多型を有し、または同様のもしくは同一の H 因子ハプロタイプおよび / もしくは C F H R 5 ハプロタイプを有する、治療された集団または対照集団において実施される。遺伝子が一致する集団の使用は、遺伝的要因に起因する治療の結果の変動を除去または減少し、潜在的な薬物の効力のより正確な評価に導く。

【 0 1 8 7 】

F) 移植のためのドナー組織のスクリーニング

臓器（例えば、肝臓）および組織（例えば、血液、肝細胞）の移植は、ますます一般的になりつつある。このような移植を実行する際に、H 因子または H 因子関連タンパク質の有害な型をレシピエントに導入し、それによって、A M D を発症するレシピエントのリス

10

20

30

40

50

クを増加することを回避することが望ましい。従って、本発明の1つの局面において、ドナー組織は、リスクハプロタイプまたは他の有害な配列を有する宿主組織を同定するために、H因子またはCFHR5遺伝子の多型部位における変異の存在または非存在を検出するために試験される。加えて、または代替的に、臓器および組織は、例えば、本明細書に記載されるような免疫学的アッセイを使用することによって、H因子タンパク質またはCFHRタンパク質の発現について試験することができる。1つの実施形態において、移植される組織は血液または血漿である（すなわち、輸血または血漿補充における場合）。リスクを伴うタンパク質（例えば、CFHの1210C型）の投与を回避するための、提供された血液の日常的なスクリーニングは、レシピエントを傷つけることを回避する可能性がある。

10

【0188】

G) 表現型のカテゴリー

AMDの特定のサブタイプに対する感受性は、特定のハプロタイプとの関連に基づいて同定することができる。従って、スクリーニングは、AMDの異なる遺伝子サブタイプを有する患者の群のために適切な治療を決定するために使用することができる。

【0189】

方法は、表現型のカテゴリー（例えば、初期AMD（ARM）地図状萎縮症（GA）および滲出性AMD（CNV））に下位分類され得るAMDの診断のために使用されてもよい。ARMおよびGA表現型は、別個の表現型（例えば、RPE変化単独、>10黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、BB（表皮）ドルーゼン、色素上皮剥離（PED）、「チェロキー」萎縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症）にさらに下位分類されてもよい。これらの表現型の説明については、例えば、Birdら、1995, Surv Ophthalmol 39, 367-74; およびKlaverら、2001, Invest Ophthalmol Vis Sci 42, 2237-41を参照のこと。

20

【0190】

H) 他の疾患

H因子およびCFHR5遺伝子における多型、例えば、表1A、1B、1C、11、14および14において示されるものはまた、既知であるがこれまでにマッピングされていない遺伝子成分である、代替補体経路の調節異常を伴う、他の疾患（例えば、アルツハイマー病、多発性硬化症、狼瘡、および喘息）および病気（例えば、熱傷、移植、および脳卒中）との関連について試験することができる。特定の作用のメカニズムに何ら限定されることなく、変異体H因子および/またはCFHR5ポリペプチドの発現が代替補体経路の調節異常と関連することが本明細書で示唆される。H因子および/またはCFHR5の変異体形態は、代替補体経路の欠損を伴う疾患に対して因果効果を有する可能性があり、またはH因子および/またはCFHR5の変異体形態の存在は、代替補体経路に關与する別の遺伝子が因果効果を有することを示す可能性がある。

30

【0191】

H因子遺伝子における多型はまた、染色体1q、特に、H因子遺伝子が位置する1q32またはその近傍にマッピングされる疾患を、マッピングおよび治療する際に有用であり得る。この特定の遺伝子座は、多数の補体経路関連遺伝子を含む。補体活性化遺伝子クラスターの調節因子（RCA）と呼ばれる、これらの遺伝子の1つの群は、H因子、5つのH因子関連遺伝子および凝固第XIII因子のサブユニットをコードする遺伝子を含む。C4BPA、C4BPB、C4BPAL2、DAF（CD55）CR1、CR2、CR1LおよびMCP（CD46）を含む、補体関連遺伝子の第2のクラスターは、1q25-31遺伝子座に直に隣接して存在する。

40

【0192】

VII. AMDの予防および治療

H因子多型を有する患者は、変異体H因子ポリペプチドおよび/または変異体CFHR5ポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与することによって治療することができる。

50

アンタゴニストは、変異体H因子ポリペプチドおよび/もしくは変異体CFHR5ポリペプチドのヌクレオチド配列に相補的なRNA、または変異体H因子ポリペプチドおよび/または変異体CFHR5ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗体の治療量を含んでもよい。もしくは、H因子多型および/またはCFHR5多型と関連するAMDは、リスクの増加と関連しない型のH因子および/またはCFHR5、例えば、正常もしくは野生型のH因子タンパク質および/または正常もしくは野生型のCFHR5ポリペプチドを患者に投与することによって治療することができる。本発明の1つの方法において、H因子の防御的変異体形態および/またはCFHR5の防御的変異体形態が患者に投与される。

【0193】

AMDについて高いリスクがあると同定された被験体における治療的および予防的アプローチには以下が含まれるがこれらに限定されない：(1) H因子の中性型もしくは防御型および/またはCFHR5の中性型もしくは防御型の量または発現を増加させること；(2) H因子のリスク関連型および/またはCFHR5のリスク関連型の量または発現を減少させること；ならびに(3) 補体代替経路の活性化を減少させること。このような治療的および予防的アプローチの例には以下が含まれる：(1) H因子タンパク質もしくはその治療活性フラグメントの中性型もしくは防御型、および/またはCFHR5もしくはその治療活性の投与フラグメントの中性型もしくは防御型の投与；(2) さもなくばH因子の中性型または防御型の発現または活性を増加させること；(3) リスクハプロタイプを有する個体によってコードされる変異体H因子タンパク質および/または変異体CFHR5タンパク質の発現に干渉すること(例えば、アンチセンスRNAの投与によって)；(4) 有害な変異体形態の活性の量を減少させること。

【0194】

治療薬剤(例えば、野生型もしくは変異体H因子のレベルを増加もしくは減少させ、またはその活性を調節する薬剤、あるいは野生型もしくは変異体CFHR5のレベルを増加もしくは減少させ、またはその活性を調節する薬剤)は、全身的に(例えば、静脈内注射または注入によって)または局所的に(例えば、AMDの治療のために眼RPEの近傍に)投与することができる。眼への薬剤の投与のための方法は医学分野において周知であり、本明細書に記載されているAMD治療剤を投与するために使用することができる。例示的な方法には、眼内注射(例えば、眼球後、網膜下、硝子体内および角膜内(intrachoroidal))、イオン泳動、点眼、および眼内移植(例えば、硝子体内、テノン嚢下および結膜下)が含まれる。例えば、抗VEGF抗体は、硝子体内注射によって、カニクイザルに導入されており(例えば、Gaudreaultら、2005、「Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhvFabV2) after a single intravitreal administration」Invest Ophthalmol Vis Sci 46:726-33を参照のこと)、生物活性VEGFおよびbFGFが、持続放出ペレットの硝子体内移植を介して眼において発現されてきた(Wongら、2001、「Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit」Curr Eye Res. 22:140-7)。重要なことには、H因子は網膜色素上皮によって局所的に合成されることが発見されており(実施例1を参照のこと)、薬剤の局所的投与が治療的利点を有することを示す。

【0195】

A. 治療的H因子ポリペプチドの投与

AMDを発症するリスクがある(および/または早期の疾患を有する)被験体への、H因子ポリペプチドの中性型もしくは防御型および/またはCFHR5ポリペプチドの中性型もしくは防御型の投与は、疾患の進行を改善するために使用することができる。

【0196】

1つのアプローチにおいて、組換えH因子ポリペプチドが患者に投与される。1つの実

10

20

30

40

50

施形態において、組換えH因子は、全長（CFH/HF1）、短縮型（FHL1）、または選択的スプライシング型、またはその生物学的に活性なフラグメントであってもよい、中性ハプロタイプ配列によってコードされる。別の実施形態において、組換えH因子は、全長もしくは短縮型のいずれかである防御的アレル、またはその生物学的に活性なフラグメントの配列を有する。治療用組換えタンパク質の産生のための方法は周知であり、本明細書中以下に記載される方法を含む。治療用ポリペプチドは、全身的に（例えば、静脈内にまたは注入によって）または局所的に（例えば、眼または肝臓などの臓器または組織に直接的に）投与することができる。

【0197】

H因子およびCFHL1タンパク質のある防御型は全長未満である。例えば、H因子の中性型または防御型のフラグメントは、AMDまたはMPGNIの治療または予防のために投与されてもよい。特定の実施形態において、防御的表現型を有する個体において発現されるCFHスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドが投与される。これらのタンパク質は、防御的または中性ハプロタイプについてホモ接合性である個体においてCFH関連RNAの発現をスクリーニングすることによって同定することができる。

10

【0198】

特定の実施形態において、防御的タンパク質は、CFH遺伝子配列の1つ以上のエキソンに対応する配列を有する。例えば、防御的タンパク質は、1個、2個、3個またはそれ以上のエキソン（これらは連続していてもよいし、そうでなくてもよい）によってコードされるアミノ酸残基が削除されている以外は、全長または短縮型のCFHタンパク質の配列を有してもよい。

20

【0199】

1つの実施形態において、本発明の防御的H因子タンパク質は、402位の残基がヒスチジンではなく、1210位の残基がシステインではないという条件で、配列番号2に対して実質的に同一であるアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、62位の残基はバリンではない。好ましくは、62位の残基はイソロイシンである。好ましくは、62位の残基はイソロイシンであり、402位の残基はチロシンであり、1210位の残基はアルギニンである。好ましくは、防御的H因子タンパク質は、配列番号2またはそのフラグメントに対して95%のアミノ酸同一性を有し；時折、配列番号2の参照H因子ポリペプチドに対して、少なくとも95%のアミノ酸同一性、時折少なくとも98%のアミノ酸同一性、そして時折少なくとも99%の同一性を有する。ヒトH因子の例示的な防御的変異体のポリペプチド配列〔配列番号5〕は図10に示される。この防御的変異体H因子ポリペプチドは、アミノ酸62位にイソロイシンを有し、アミノ酸402位にチロシンを有する（太字で示される）。例示的なFHL1の防御的変異体、ヒトH因子の短縮型のポリペプチド配列（配列番号6）は図11に示される。この防御的変異体短縮型H因子ポリペプチドは、アミノ酸62位にイソロイシンを、アミノ酸402位にチロシンを有する（太字で示される）。

30

【0200】

1つの実施形態において、本発明の防御的H因子タンパク質は、配列番号4（FHL1）と実質的に同一のアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、62位の残基はバリンではない。好ましくは、62位の残基はイソロイシンである。好ましくは、防御的H因子タンパク質は、配列番号4またはそのフラグメントに対して95%のアミノ酸同一性を有し；時折、配列番号4の参照H因子ポリペプチドに対して、少なくとも95%のアミノ酸同一性、時折少なくとも98%のアミノ酸同一性、そして時折少なくとも99%の同一性を有する。

40

【0201】

ある実施形態において、防御的H因子タンパク質は、参照H因子ポリペプチドの1つ以上の活性を有する。1つの実施形態において、活性はヘパリンに結合することである。1つの実施形態において、活性はCRPに結合することである。1つの実施形態において、

50

活性はC3bに結合することである。1つの実施形態において、活性は内皮細胞表面に結合することである。1つの実施形態において、活性はC3bコファクター活性である。1つの実施形態において、防御的H因子タンパク質は、配列番号2のタンパク質よりも、その通常の機能に関してより高い活性を有する。1つの実施形態において、防御的H因子タンパク質は、配列番号4のタンパク質よりも、その通常の機能に関してより高い活性を有する。

【0202】

H因子活性についてのアッセイは周知であり、科学文献に記載されている。限定のためではなく例示のために、アッセイの例を手短に記載する。

【0203】

防御的タンパク質(CFH変異体)のC3bまたはCRPへの結合

C3bタンパク質とCFHタンパク質との間の相互作用は、以前に記載されたように(Manuelianら、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)、Biacore 3000システム(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用して、表面共鳴によって分析することができる。手短に述べると、C3b(CalBiochem, Inc)を、センサーチップ(カルボキシル化デキストランチップ(Carboxylated Dextran Chip)CM5, Biacore AB, Uppsala, Sweden)のフローセルに、標準的なアミンカップリングを使用してカップリングする。2つのセルを活性化し、C3b(50 µg/ml、10 mM 酢酸緩衝液、pH 5.0に対して透析)を、4000共鳴単位に対応するカップリングのレベルに到達するまで、1つのフローセルに注入する。未反応の基は、エタノールアミン-HClを使用して不活性化する。他のセルは、C3bを含まないカップリング緩衝液を注入することによって参照セルとして調製する。各結合アッセイの前に、10 mM 酢酸緩衝液、pH 4.6中の2 M NaClおよび実行緩衝液(PBS、pH 7.4)の2回の注入によりフローセルを徹底的に洗浄する。H因子タンパク質を、C3bをカップリングしたフローセルおよび対照セルに、5 µl/分の流速で25 において注入する。C3bへのH因子の結合は、Manuelian 30
ら、2003、前出において記載されるように、経時的に共鳴単位を測定することによって定量する。

【0204】

CRPタンパク質とCHFタンパク質との間の相互作用は、センサーチップのフローセル中でC3bをCRPで置換することによって同一の様式で表面共鳴によって分析することができる。

【0205】

内皮細胞表面への結合

内皮細胞表面へのCHFタンパク質の結合を、HUVECの免疫蛍光染色およびFACS分析によってアッセイする。HUVEC細胞は、無血清DMEM(BioWhittaker)中に、アッセイの前24時間保持する。細胞は、DPBS/EDTAを用いて表面から脱離させ、DPBSで2回洗浄する； 5×10^5 細胞をプラスチックチューブに移し、非特異的結合部位を、1%BSA/DPBSで15分間ブロックし、その後、H因子の精製アレル変異体(5 µg)とのインキュベーションを行う。対照は、H因子アイソフォームの非存在下で実施する。H因子の結合後、細胞をDPBSで徹底的に洗浄する。ポリクローナルヤギ抗ヒトFH抗血清を一次抗体(CalBiochem)(1:100希釈)として使用し、細胞を4 で15分間インキュベートする。ブロッキング緩衝液中で1:100希釈したAlexa-fluor 488-結合体化ヤギ抗血清を二次抗体として使用する。細胞を、フローサイトメトリー(FACScalibur, Becton-Dickinson Immunocytometry, Mountain View 40
50

、California, USA) によって試験する。典型的には、10,000個の事象が計数される。

【0206】

流体相におけるコファクター活性

流体相コファクターアッセイのために、C3bピオチン(100ng/反応)、I因子(200ng/反応)および100ngの精製H因子を、総量30μl中で使用する。I因子の添加の前後に採取したサンプルを、還元条件下でのSDS-PAGEによって分離し、ウェスタンブロットニングによって分析し、ストレプトアビジン(Streptavidin)-POD-結合体(1:10000)によって、C3b分解産物を検出および定量する。C3b(40μg)(CalBiochem)は、製造業者の説明書に従ってピオチン標識キット(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用してピオチン化する。手短に述べると、30μgのC3b(CalBiochem)を、D-ピオチニル- - アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステルで、25℃にて2時間標識する。過剰のピオチンは、PBSで平衡化したPD10カラム(Amersham Biosciences)を使用するゲル濾過によって除去する。Sanchez-Corralら、2002, Am J Hum Genet. 71:1285-95もまた参照のこと。

10

【0207】

ヘパリン結合活性

ヘパリンへの精製CFHタンパク質(CFH402YおよびCFH402H)の結合は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)システムにおいてヘパリンアフィニティークロマトグラフィーを使用して分析する。10μgのCFHタンパク質を1/2×PBS中で希釈し、ヘパリンセファロースアフィニティークラム(HiTrap, Amersham Biosciences)に0.5ml/分の流速で適用する。このカラムを、1/2×PBSで広範に洗浄し、結合したCFHタンパク質を、総量の10mlで0.5ml/分の流速で、75~500mM NaClの範囲の直線状塩勾配を使用して溶出する。溶出した画分はSDS-PAGEおよびウェスタンブロット分析によってアッセイする。異なる画分中のアイソフォームの溶出は、CFHタンパク質中の特異的アミノ酸変異がヘパリンへのタンパク質の結合を調節させ得ることを示す。例えば、Pangburnら、1991, Localization of the heparin-binding site on complement Factor H, J Biol Chem. 266:16847-53もまた参照のこと。

20

30

【0208】

CFHR5投与

別のアプローチにおいて、組換えCFHR5ポリペプチドが患者に投与される。1つの実施形態において、組換えCFHR5は、中性型配列またはその生物学的に活性なフラグメントを有する。別の実施形態において、組換えCFHR5は、防御的アレルの配列またはその防御的な生物学的に活性なフラグメントを有する。治療用組換えタンパク質の産生のための方法は周知であり、本明細書中以下に記載される方法を含む。治療用ポリペプチドは、全身的に(例えば、静脈内にまたは注入によって)または局所的に(例えば、眼または肝臓などの臓器または組織に直接的に)投与することができる。

40

【0209】

CFHポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドを含む治療用組成物

本発明は、野生型または変異体であり得(例えば、中性または防御的変異体)、変異体H因子ポリペプチドの全長型、短縮型、または生物学的に活性なフラグメントであり得る、H因子ポリペプチドの治療用製剤を提供する。本明細書に記載されるように、防御的H因子タンパク質(およびそれらをコードする遺伝子)は、防御的ハプロタイプを有する個体を同定すること、および個体のゲノム中にコードされるH因子のアミノ酸配列を決定することによって同定することができ、ここで、防御的H因子タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。生物学的に活性なフラグメントは、変異体

50

タンパク質に生物学的機能を付与する、全長H因子ポリペプチドの任意の部分を含んでもよい。ある場合において、防御的ハプロタイプは、例えば、遺伝子中の未成熟終止コドンの存在に起因して、全長型未満のH因子（すなわち、FHL-1に加えて）の発現と関連する。

【0210】

治療活性フラグメントはまた、AMDバイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって同定することができる。例示的なAMDバイオマーカーには、補体経路成分（例えば、I因子、H因子、C1r、C3、C3a）、C反応性タンパク質、ハプトグロビン、アポリポタンパク質E、免疫グロブリン重鎖または軽鎖、1アンチトリプシン、2マクログロブリン、トランスサイレチン、クレアチニン、および「Bio markers Associated With Age-Related Macular Degeneration」という表題の同時係属の仮出願番号60/715,503に記載されるその他のものが含まれる。

10

【0211】

本発明は、野生型または変異体であり得（例えば、中性または防御的変異体）、変異体CFHR5ポリペプチドの全長型または生物学的に活性なフラグメントであり得る、CFHR5ポリペプチドの治療用製剤を提供する。本明細書に記載されるように、防御的CFHR5タンパク質（およびそれらをコードする遺伝子）は、防御的ハプロタイプを有する個体を同定すること、および個体のゲノム中にコードされるCFHR5のアミノ酸配列を決定することによって同定することができ、ここで、防御的CFHR5タンパク質は、防御的ハプロタイプを有するアレルによってコードされる。生物学的に活性なフラグメントは、変異体タンパク質に生物学的機能を付与する、全長CFHR5ポリペプチドの任意の部分を含んでもよい。治療的に活性なフラグメントはまた、H因子についての上記のようなAMDバイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって同定することができる。

20

【0212】

H因子およびCFHR5のある型は、遺伝子型決定されたドナーの血液から、遺伝子型決定された眼ドナーに由来する培養もしくは形質転換されたRPE細胞から、または内因性H因子を発現する細胞株（例えば、グリア細胞または肝細胞）から単離することができる。もしくは、治療用タンパク質は、当該分野で公知の方法および本明細書に記載される方法を使用して、組換え的に産生し（例えば、培養した細菌細胞または真核細胞中で）、精製することができる。上述のように、H因子およびCFHR5のある型は、研究目的のために組換え的に発現されてきた。しかし、このような研究製剤は、治療用途のために適切ではない。本発明は、医薬品製造品質管理基準（GMP）要件に従って製造および試験されるポリペプチドを含む、患者への投与のために適切な組換えポリペプチドを提供する。例えば、FDA認可に従う組換えポリペプチドは、効力および同一性について試験されなければならない、滅菌されなければならない、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分（すなわち、保存剤、希釈剤、アジュバントなど）が、純度、品質の規準に合致しなければならない、患者に対して有害であってはならない。

30

【0213】

本発明は、H因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチド、および薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアを含む組成物を提供する。「薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリア」という用語は、化合物の所望の剤形を調製するために使用される媒体をいう。薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアには、1種以上の溶媒、希釈剤、または他の液体ビヒクル；分散または懸濁補助剤；界面活性剤；等張剤；濃化剤または乳化剤；保存剤；固体結合剤；潤滑剤などを含めることができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第5版, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975) および Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, A.H. Kibbe 編 (American Pharmaceutical Assoc. 2000)

40

50

は、薬学的組成物を製剤化する際に使用される種々のキャリアおよびその調製のための既知の技術を開示する。1つの実施形態において、薬学的に受容可能な賦形剤は、眼に投与される場合に（例えば、眼内注射によって）、哺乳動物（例えば、ヒト患者）に対して有害ではない。眼内投与のために、例えば、および非限定的に、治療薬剤は、平衡塩類溶液（BSS）または平衡塩類溶液プラス（BSS Plus）（Alcon Laboratories, Fort Worth, Texas, USA）中で投与することができる。関連する局面において、本発明は、治療的に受容可能なH因子タンパク質、任意に凍結乾燥製剤を含む滅菌容器、例えば、バイアルを提供する。治療用H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドは、上記のように、組換え的に作製することができる。もしくは、H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドは、培養RPE細胞（例えば、初代培養）またはH因子もしくはCFHR5を内因性に発現する他の細胞から単離することができる。

10

【0214】

個体に投与される、H因子もしくは短縮型H因子もしくはその生物学的に活性なフラグメントの中性型もしくは防御型、またはCFHR5もしくはその生物学的に活性なフラグメントの中性型もしくは防御型の量を決定することができる。H因子の通常の高漿濃度は、116から562マイクログラム/mlの間で変動し、高漿中のH因子の半減期は約61/2日である（最近の概説については、Esparza-Gordilloら、2004「Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels」Immunogenetics 56:77-82を参照のこと）。1つの実施形態において、内因性H因子は、健康個体におけるH因子の高漿濃度と同様のレベルを達成するために十分な量、すなわち、50~600mg/ml、例えば、100~560mg/mlの高漿レベルを達成するために十分な量で個体に投与することができる。個体（例えば、160ポンドの被験体）に投与されるH因子の量は、例えば、しかし非限定的に、用量あたり10ミリグラム~5000ミリグラム、用量あたり50ミリグラム~2000ミリグラム、用量あたり100ミリグラム~1500ミリグラム、用量あたり200ミリグラム~1000ミリグラム、または用量あたり250ミリグラム~750ミリグラムであり得る。H因子が個体に投与され得る頻度は、例えば、しかし非限定的に、1日に2回、1日に1回、1週間に2回、1週間に1回、2週間毎に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月毎に1回、6ヶ月毎に1回、または1年に1回であり得る。個体へのH因子の投与の量および頻度は、治療の経過をモニターすることによって、医師によって容易に決定可能である。

20

30

【0215】

B) 遺伝子治療方法

別のアプローチにおいて、H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドは、外因性ポリペプチドによってコードされるタンパク質のインビボ発現によって（すなわち、遺伝子治療を介して）投与される。1つの例において、遺伝子治療は、H因子ポリペプチドもしくは生物学的に活性なフラグメントまたはCFHR5ポリペプチドもしくは生物学的に活性なフラグメントを発現するベクターを細胞に導入する工程を含む。

【0216】

40

ベクターはウイルス性または非ウイルス性であり得る。動物ウイルス由来の多数のベクターが利用可能であり、これには、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、ラブドウイルス（*rhadboviruses*）、およびパピローマウイルスに由来するものが含まれる。通常、ウイルスは、もはや複製しないように弱毒化されている（例えば、Kayら、2001, *Nature Medicine* 7:33-40を参照のこと）。

【0217】

H因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドをコードする核酸は、典型的には、個体の標的細胞においてDNAの転写を駆動する、プロモーターまたはエンハンサーなどの調節エレメントに連結される。プロモーターは、すべての細胞型においてH因子遺伝子

50

またはCFHR5遺伝子の発現を駆動し得る。もしくは、プロモーターは、特定の最奥型において、例えば、網膜または腎臓の細胞においてのみ、H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子の発現を駆動し得る。H因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結されている調節エレメントは、しばしば、ベクターにクローニングされる。

【0218】

当業者によって理解されるように、遺伝子治療ベクターは、挿入されたコード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含む（例えば、プロモーター、エンハンサー、他の調節エレメントを含んでもよい）。プロモーターは、構成的または誘導性であり得る。プロモーターは、RPEなどの標的組織における優先的な遺伝子発現を標的とするように選択することができる（最近の概説については以下を参照のこと：Sutantら、2005,「Development and evaluation of the specificity of a cathepsin D proximal promoter in the eye」Curr Eye Res. 30:53-61; Zhangら、2004,「Concurrent enhancement of transcriptional activity and specificity of a retinal pigment epithelial cell-preferential promoter」Mol Vis. 10:208-14; Esumiら、2004,「Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation」J Biol Chem 279:19064-73; Camacho-Hubnerら、2000,「The Fugu rubripes tyrosinase gene promoter targets transgene expression to pigment cells in the mouse」Genesis. 28:99-105; およびこれらの中の参考文献）。

【0219】

適切なウイルスベクターには、DNAウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクター）およびRNAウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター）が含まれる。1つの実施形態において、アデノ関連ウイルス（AAV）ベクターが使用される。最近の概説については以下を参照のこと：Auricchioら、2005,「Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases」Curr Gene Ther. 5:339-48; Martinら、2004,「Gene therapy for optic nerve disease」Eye 18:1049-55; Ali、2004,「Prospects for gene therapy」Novartis Found Symp. 255:165-72; Hennigら、2004,「AAV-mediated intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in the retinal pigmented epithelium and improves retinal function in adult MPS VII mice」Mol Ther. 10:106-16; Smithら、2003,「AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa」Mol Ther. 8:188-95; Broderickら、2005,「Local administration of an adeno-associated viral vector expressing IL-10 reduces monocyte infiltration and subsequent photoreceptor damage durin

10

20

30

40

50

g experimental autoimmune uveitis」Mol Ther. 12:369-73; Chengら、2005, 「Efficient gene transfer to retinal pigment epithelium cells with long-term expression. Retina 25:193-201; Rexら、 「Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress. Hum Gene Ther. 15:960-7; およびこれらの中で引用される参考文献。

10

【0220】

遺伝子治療ベクターは、製造物を患者への投与のために適切にする、医薬品製造品質管理基準（GMP）要件に従って製造されなければならない。本発明は、GMP要件に従って製造および試験される遺伝子治療ベクターを含む、患者への投与のために適切な遺伝子治療ベクターを提供する。FDA認可に従う遺伝子治療ベクターは、効力および同一性について試験されなければならない、滅菌されなければならない、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分（すなわち、保存剤、希釈剤、アジュバントなど）が、純度、品質の規準に合致しなければならない、患者に対して有害であってはならない。例えば、核酸製剤は、マイコプラズマを含まないことが実証される。例えば、Islamら、1997 An academic centre for gene therapy research and clinical grade manufacturing capability, Ann Med 29, 579-583を参照のこと。

20

【0221】

遺伝子治療ベクターを投与するための方法は既知である。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは全身的に導入される（例えば、静脈内にまたは注入によって）。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは局所的に導入される（例えば、特定の組織または臓器、すなわち肝臓に直接的に）。1つの実施形態において、H因子またはCFHR5発現ベクターは眼に局所的に導入される（例えば、眼内注射によって）。最近の概説については、例えば、以下を参照のこと：Dinculescuら、2005, 「Adeno-associated virus-vector red gene therapy for retinal disease」Hum Gene Ther. 16:649-63; Rexら、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ら、 「Range of retinal diseases potentially treatable by AAV-vectored gene therapy」Novartis Found Symp. 255:179-188、およびこれらの中で引用される参考文献。

30

40

【0222】

従って、1つの局面において、本発明は、H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドをコードする遺伝子治療ベクター、任意に、ウイルスベクターを含む製剤を提供し、ここで、この遺伝子治療ベクターは、ヒト被験体への投与のために適切であり、ヒト被験体への投与のために適切な賦形剤中にある（例えば、GLP技術を使用して製造される）。任意に、遺伝子治療ベクターは、網膜色素上皮細胞において優先的にまたは特異的に発現されるプロモーターを含む。

【0223】

50

H因子またはCFHR5配列の導入のための非ウイルス的方法、例えば、生物分解性ポリマー（例えば、ポリ乳酸（PLA）；ポリグリコール酸（PGA）；およびコポリマー（PLGA））中でのカプセル化もまた使用することができる（最近の概説については、例えば、以下を参照のこと：Bejjaniら、2005、「Nanoparticle for gene delivery to retinal pigment epithelial cells」Mol Vis. 11:124-32；Manne rmaaら、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；およびこれらの中で引用される参考文献）。もしくは、H因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドをコードする核酸は、リポソームにパッケージされてもよく、または核酸はパッケージングなしで、ベクターを使用することなく、個体に送達することができる。

【0224】

C) DNA修復

別のアプローチにおいて、AMDを発症するリスクがある被験体（および/または初期段階の疾患を有する被験体）は、DNA修復によって中性型または防御型のH因子またはCFHR5によって置き換えられた、リスク型のH因子またはCFHR5を有することができる。1つの実施形態において、リスクハプロタイプと関連するH因子またはCFHR5遺伝子における多型部位に特異的に結合するように設計された三重鎖形成オリゴヌクレオチドを、ウイルス性または非ウイルス性方法によって個体に投与することができる。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、配列特異的な様式で二重鎖DNAの深い溝に結合しかつDNA修復を引き起こし、標的化されたゲノムの修飾を生じる（最近の概説については、Kuanら、2004、「Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides」Methods Mol Biol. 262:173-94を参照のこと）。リスクハプロタイプと関連する多型に及ぶ配列に結合する三重鎖形成オリゴヌクレオチドはDNA修復を引き起こし、リスクアレルから、中性または防御的アレルへの修飾を生じ、疾患の発症または進行を改善することができる。

【0225】

D) H因子タンパク質またはCFHR5ポリペプチドの中性型または防御型を発現する細胞、組織、または臓器の導入

別のアプローチにおいて、中性型または防御型のH因子またはH因子関連タンパク質（例えば、CFHR5）を発現する細胞が患者に投与される。1つの実施形態において、レシピエントは、リスクハプロタイプについて、ヘテロ接合性であり、またはより頻繁には、ホモ接合性である。例えば、肝細胞移植は、多くの型の肝不全に対応するために、全臓器移植に対する代替として使用されてきた（例えば、Ohashiら、Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application, J Mol Med. 2001 79:617-30を参照のこと）。この方法に従うと、肝細胞または他のCFHもしくはCFHR5-発現細胞は、治療の必要がある患者に投与される（例えば、注入される）。これらの細胞は肝臓または他の器官に移動し、治療タンパク質を産生する。例えば、以下もまた参照のこと：Alexandrovaら、2005、「Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application」Cell Transplant. 14(10):845-53；Cheongら、2004、「Attempted treatment of factor H deficiency by liver transplantation」Pediatr Nephrol. 19:454-8；Ohashiら、2001、「Hepatocyte transplantation: clinical a

nd experimental application」J Mol Med. 79 : 617 - 30 ; Serraltaら、2005, 「Influence of preservation solution on the isolation and culture of human hepatocytes from liver grafts」Cell Transplant. 14 (10) : 837 - 43 ; Yokoyamaら、2006, 「In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity」Am. J. Transplant. 6 (1) : 50 - 9 ; Dhawanら、2005, 「Hepatocyte transplantation for metabolic disorders, experience at King's College hospital and review of literature.」Acta Gastroenterol. Belg. 68 (4) : 457 - 60 ; Brunsら、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。使用してもよい他の細胞型には、例示のためでありかつ非限定的に、腎臓および膵臓の細胞が含まれる。1つの実施形態において、投与される細胞は、組換え型のタンパク質を発現するように操作される。

【0226】

別の関連するアプローチにおいて、治療用臓器移植が使用される。身体の全身的なH因子の大部分は、肝臓によって産生され、肝臓組織の移植を好ましい方法にしている。例えば、Gerberら、2003, 「Successful (?) therapy of hemolytic-uremic syndrome with factor H abnormality」Pediatr Nephrol. 18 : 952 - 5を参照のこと。

【0227】

別のアプローチにおいて、防御型のCFHRタンパク質は、眼への注射（例えば、硝子体内）によって、またはカプセル化された細胞を介して、眼の後ろに送達される。1つの例として、Neurotechのカプセル化細胞技術（Neurotech's Encapsulated Cell Technology）（ECT）は、眼の後ろへの治療因子の持続性の長期的な送達を可能にする独特な技術である。（<http://www.neurotech.fr>）を参照のこと。ECT移植物は、半透性の中空繊維膜中にカプセル化された特異的治療タンパク質を産生するように遺伝子改変された細胞からなる。細胞は継続的に治療タンパク質を産生し、これは移植物から、眼まで拡散する（Bushら、2004）。ECTデバイスによってヒトの眼に送達されたCNTFは、フェーズI臨床試験に登録された10例の患者において完全に成功し、かつ最小限の合併症を伴うことが最近示された（Sievingら、2005）。Songら、2003 ; Tao 2002, , およびHammanら、米国特許第6,649,184号もまた参照のこと。本発明の1つの実施形態において、防御型のH因子（いわゆる中性型を含む）は細胞中で発現され、カプセル化型で投与される。1つの実施形態において、使用される細胞は、the American Type Culture Collection P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108から入手可能であるNTC-201ヒトRPE株（ATCC番号CRL-2302）である。

【0228】

E) H因子またはCFHR5のリスク変異体のレベルを減少させるための治療

H因子またはCFHR5の正常または防御的な機能の喪失は、AMDと関連する可能性がある。AMDと最も強い相関を示し、かつ変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドを生じる、H因子およびCFHR5の遺伝子における非同義語多型、例え

ば、表 1 A、1 B、1 C、1 1、1 4 および 1 5 に示されるものは、AMD において原因となる役割を有するようである。例えば、変異体の H 因子または C F H R 5 は、正常な H 因子または C F H R 5 の機能と干渉するいわゆる「ドミナントネガティブ」突然変異体として働く可能性がある。

【0229】

眼においてまたは全身的に、リスク型の H 因子または C F H R 5 のレベルを減少させる任意の方法が、例えば、H 因子または C F H R 5 の遺伝子の転写を阻害すること、H 因子または C F H R 5 の RNA の翻訳を阻害すること、中性型または防御型の H 因子または短縮型 H 因子またはその生物学的に活性なフラグメントの量または活性を増加させること、中性型または防御型の C F H R 5 ポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントの量または活性を増加させること、あるいは H 因子タンパク質または C F H R 5 ポリペプチドの量または活性を減少させること（例えば、血漿分離交換法、抗体指向性血漿分離交換法、または H 因子もしくは C F H R 5 結合部分、例えば、ヘパリンもしくは変異体特異的抗体との複合体化によって）を含む治療のために、使用されてもよい。ある実施形態において、H 因子または C F H R 5 のレベルは、他の組織と比較して、眼（例えば、R P E）において優先的に減少される。例示のためにかつ限定のためではなく、いくつかの方法が以下に手短かに記載される。

【0230】

1 つのアプローチにおいて、AMD についてのリスクがあると同定された被験体は、ヘパリンの投与によって治療される。ヘパリンおよびヘパリン誘導体（ヘパリノイドを含む）は、M P G N I I を含む、種々の補体関連疾患の治療のための有望な治療特性を有する可能性がある（F l o e g e ら、1993；G i r a r d i、2005；D i a m o n d および K a r n o v s k y、1986；S t r i k e r、1999；R o p s ら、2004）。本明細書に開示されている AMD と M P G N I I との間の関連を考慮すると、ヘパリンおよびヘパリン誘導体（ヘパリノイドを含む）は、AMD の治療のために有効である可能性がある。1 年間にわたって毎日ヘパリンの皮下注射を受けた慢性増殖性糸球体腎炎を有する患者の臨床試験において、C a d e および共同研究者は、クレアチンクリアランスの改善および糸球体細胞過多の後退を報告した（C a d e ら、1971）。ヘパリンと低分子量ヘパリン（エノキサパリン）は、補体カスケードの代替経路および古典的経路をブロックすることによって、マウスにおける抗リン脂質抗体症候群の進行を妨害することが示された（G i r a r d i ら、2004）。ヘパリンの抗補体活性は、C 3 b B b の形成の遮断、代替経路によるコンバーターゼの増幅を含み；流体相ヘパリンは B 因子および D 因子との C 3 b の相互作用を阻害することによって、C 3 b B b の生成を妨害する（W e i l e r ら、1976）。

【0231】

F) 阻害性核酸の投与

アンチセンス核酸 - アンチセンス核酸、例えば、変異体 H 因子ポリペプチドをコードする RNA に対して相補的な精製アンチセンス RNA は、リスクハプロタイプと関連する H 因子遺伝子の発現を阻害するために使用することができる。最近の概説については、例えば以下を参照のこと：G o m e s ら、2005、「I n t r a o c u l a r d e l i v e r y o f o l i g o n u c l e o t i d e s」C u r r P h a r m B i o t e c h n o l . 6 : 7 - 15；および H e n r y ら、2004、「S e t t i n g s i g h t s o n t h e t r e a t m e n t o f o c u l a r a n g i o g e n e s i s u s i n g a n t i s e n s e o l i g o n u c l e o t i d e s」T r e n d s P h a r m a c o l S c i 25 : 523 - 7；およびこれらの中で引用される参考文献。

【0232】

RNA 干渉 - 二本鎖 RNA (d s RNA) 阻害法は、H F 1 の発現を阻害するためにも使用することができる。このような方法において使用される RNA は、d s RNA の少なくとも 1 つの領域が、H F 1 遺伝子の 1 つの領域に対して実質的に同一であるように設計

される；ある例において、この領域はH F 1遺伝子に対して100%同一である。哺乳動物における使用のために、dsRNAは、典型的には約19～30ヌクレオチド長であり（すなわち、低分子干渉RNA（siRNAまたはRNAi）が使用される）、最も頻繁には約21ヌクレオチド長である。dsRNAiおよびsiRNAを実施するために有用な方法および組成物は、例えば、PCT公開WO 98/53083；WO 99/32619；WO 99/53050；WO 00/44914；WO 01/36646；WO 01/75164；WO 02/44321；および米国特許第6,107,094号において議論されている。siRNAは、インビトロで合成し、患者に投与することができる。もしくは、RNAiストラテジーは、トランスフェクトされた細胞においてDNA鋳型からの低分子RNAの合成を達成するために、ベクターに基づくアプローチと首尾よく組み合わせることができる（例えば以下を参照のこと：Suiら、2002,「A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells」Proc Natl Acad Sci USA 99:5515-20；ならびにKasaharaおよびAoki、2005,「Gene silencing using adenoviral RNAi vector in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes」Methods Mol Med. 112:155-72；ならびにこれらの中で引用される参考文献）。

【0233】

リボザイム - リボザイムはRNAの特異的切断を触媒することが可能である酵素的RNA分子である。リボザイムの作用のメカニズムは、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、続いてエンドヌクレアーゼ的切断を伴う。ヒトH因子をコードする配列のエンドヌクレアーゼ的切断を特異的かつ効率的に触媒することができる操作されたハンマーヘッドモチーフリボザイムは、本発明の範囲内にある。任意の潜在的なRNA標的の中の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUUおよびGUCなどの配列を含むリボザイム切断部位について標的分子をスキャンすることによって最初に同定される。一旦同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15から20リボヌクレオチドの間の低分子RNA配列は、オリゴヌクレオチドを操作不可能にし得る二次構造の特徴について評価されてもよい。候補標的の適合性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する接近可能性を試験することによって評価されてもよい。リボザイムの特性は当該分野で周知である；一般的な説明については、Cechによる特許（US6180399；US5869254；US6025167；US5854038；US5591610；US5667969；US5354855；US5093246；US5180818；US5116742；US5037746；およびUS4987071）を参照のこと。リボザイムおよび他の阻害核酸は、リスクハプロタイプと関連する配列を有する遺伝子の発現を優先的に阻害するように設計することができる。従って、多型に及ぶ配列を認識し、GUAに隣接して切断するリボザイムは、リスク型を認識するが中性または防御型を認識せず、選択的切断を可能にする（Dawsonら、2000,「Hammerhead ribozymes selectively suppress mutant type I collagen mRNA in osteogenesis imperfecta fibroblasts」Nucleic Acids Res. 28:4013-20；Blalockら、2004「Hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor mRNA blocks transforming growth factor-beta mediated cell proliferation」Exp Eye Res. 78:1127-36）。

【0234】

三重鎖形成オリゴヌクレオチド - 三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、配列特異的な様式

で二重鎖DNAの深い溝に結合しかつDNA修復を引き起こし、標的化されたゲノムの修飾を生じる（最近の概説については、Kuanら、2004、「Targeted gene modification using triplex-forming oligonucleotides」Methods Mol Biol. 262:173-94を参照のこと）。オリゴヌクレオチドは、リスクハプロタイプと関連するH因子遺伝子における多型部位に特異的に結合するように設計することができる。リスクハプロタイプと関連する多型に及ぶ配列に結合する三重鎖形成オリゴヌクレオチドはDNA修復を引き起こし、リスクアレルから、中性または防御的アレルへの配列の修飾を生じる。

【0235】

上記と同様のアンチセンス核酸、RNA干渉、リボザイムおよび三重鎖形成オリゴヌクレオチドの方法論は、AMDの治療のために、眼においてまたは全身的に、リスク型のCFHR5のレベルを減少するために使用されてもよい。

【0236】

阻害核酸は、薬学的組成物として、または遺伝子治療方法を使用して投与することができることが理解される。

【0237】

G) 抗体治療

1つの局面において、変異体H因子ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗HF1抗体は、AMDを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。

1つの実施形態において、抗体は、野生型と変異体の両方のH因子タンパク質を認識する。1つの実施形態において、抗体は、変異体H因子タンパク質を認識するが、野生型H因子タンパク質を認識しない。別の局面において、変異体CFHR5ポリペプチドと特異的に相互作用し、その活性を中和する抗CFHR5抗体は、AMDを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。1つの実施形態において、抗体は、野生型と変異体の両方のCFHR5タンパク質を認識する。1つの実施形態において、抗体は、変異体CFHR5タンパク質を認識するが、野生型CFHR5タンパク質を認識しない。抗体は、全身的にまたは局所的に投与することができる（例えば、Gaudreaultら、2005、「Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhFabV2) after a single intravitreal administration」Invest Ophthalmol Vis Sci. 46:726-33を参照のこと）。抗HF1抗体および抗CFHR5抗体を製するための方法は当該分野で公知であり、これには以下に記載される方法が含まれる。関連する局面において、変異体のH因子ポリペプチドおよび/またはCFHR5ポリペプチドと優先的に相互作用し、その活性を減少させる薬剤は、AMDを有するか、またはそのリスクがある個体に投与される。

【0238】

H) 代替経路の調節因子

1つの局面において、本発明は、眼の中に局所的に、または全身レベルでのいずれかで、補体カスケードの代替経路（AP）を調節する薬剤（例えば、ネイティブタンパク質、組換えタンパク質、抗体、または小分子）を投与することによって、AMDを治療するための方法を提供する。1つの実施形態において、治療は、APを調節する薬剤を直接的に投与する工程を含む。1つの実施形態において、治療は、APの誘発を調節する薬剤（例えば、微生物）を投与する工程を含む。1つの実施形態において、治療は、APから下流の経路を調節する薬剤を投与する工程を含む。APを調節する例示的な薬剤は当該分野で公知であり、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：DFP、PR226、BCX-1470、FUT-175、sMCP、PS-オリゴ、コンプスタチン（Compstatin）、フカン（Fucan）、およびGCRF（例えば以下を参照のこと：Makrides、1998、「Therapeutic inhibition of the complement system」Pharmacol Rev. 50:59-87；Hollandら、2004、「Synthetic small mole

10

20

30

40

50

cule complement inhibitors」Curr Opin Invest Drugs 5:1163-73; Holersら、2004、「The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting」Mol Immunol. 41:147-52)。AP調節因子は、全身的に、または眼内注射によって、または眼への化合物の送達のために既知である他の方法によって投与することができる。

【0239】

I) リスク変異体H因子または変異体CFHR5の薬物スクリーニング/アンタゴニスト

10

本発明は、変異体タンパク質、H因子もしくはCFHR5変異体を発現する宿主細胞、またはH因子もしくはCFHR5変異体を発現するトランスジェニック動物を接触させること、およびその変異体の結合、発現、プロセッシング、または活性をモニターすることによって、AMDの治療のために有効な薬剤をスクリーニングする方法を提供する。1つの実施形態において、H因子変異体は、62位のアミノ酸にバリンを有し、および/または402位のアミノ酸にヒスチジンを有し、および/または1210位のアミノ酸にシステインを有する。1つの実施形態において、CFHR5変異体は46位のアミノ酸にセリンを有する。

【0240】

変異体H因子ポリペプチド(例えば、リスクハプロタイプと関連する変異体)のアンタゴニストは、AMDを治療するために使用することができる。アンタゴニストは、変異体H因子の発現を抑制し、活性を抑制し、またはRNAもしくはタンパク質の安定性を抑制することができる。アンタゴニストは、多くの型の化合物について段階的かつ高スループットな様式で作製することが可能である、大規模なコンビナトリアルライブラリーを作製およびスクリーニングすることによって得ることができる。このような化合物には、ペプチド、ポリペプチド、 α -ターン模倣物、ポリサッカリド、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー性N置換グリシンおよびオリゴカルバメートなどが含まれる。化合物の大規模なコンビナトリアルライブラリーは、当該分野で既知の方法によって構築することができる。例えば、WO 95/12608; WO 93/06121; WO 94/08051; WO 95/35503; WO 95/30642およびWO 91/18980を参照のこと。化合物のライブラリーは、最初に、変異体H因子ポリペプチドへの特異的結合についてスクリーニングされる。インビトロ結合活性を有する化合物はまた、変異体H因子ポリペプチドの生物学的活性、例えば、C3bまたはヘパリンへの結合と干渉するそれらの能力についてアッセイすることができる。アンタゴニスト活性は、細胞ベースの系において、または外因性変異体H因子ポリペプチドが発現されるトランスジェニック動物モデルにおいてのいずれかでアッセイすることができる。

20

30

【0241】

変異体CFHR5ポリペプチド(例えば、リスクハプロタイプと関連する変異体)のアンタゴニストはAMDを治療するために使用することができ、変異体H因子アンタゴニストについて上記に記載したように得ることができる。

40

【0242】

J) 患者特異的治療

AMDにおいて原因となる役割を有し、変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドの発現レベルおよび/または生物学的活性に対するこれらの多型の効果が説明されている、H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における特定の多型の存在に基づいて、カスタマイズされた治療を、AMDの異なる遺伝子サブタイプを有する患者の群のために考案することができる。例えば、H因子またはCFHR5における多型が、変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドの発現レベルおよび/または生物学的活性を増加させることによって動物モデルにおいてAMDを引き起こすならば、H因子ま

50

たはC F H R 5 の多型に関連するA M D は、変異体H因子ポリペプチドまたは変異体C F H R 5 ポリペプチドのアンタゴニストを患者に投与することによって治療することができる。

【0243】

K) A M D バイオマーカーを使用する治療的効力の評価

上述のように、C F H またはC F H R タンパク質の特定のフラグメントの治療的効力はまた、A M D バイオマーカーの発現に対するタンパク質の効果を試験することによって決定することができる。例示的なA M D バイオマーカーには、本明細書中上記に記載したものが含まれる。これらのA M D 関連タンパク質(バイオマーカー)は、健常個体と比較して、異なる(上昇しているかまたは減少している)レベルでA M D を有する個体中に存在する。本発明は、疾患について治療されるA M D を有する個体におけるバイオマーカーのレベルを決定する工程、およびそのバイオマーカーのレベルを、バイオマーカーのより初期に決定したレベルまたは参照レベルと比較する工程によって、A M D の治療の効力を評価する方法およびA M D の進行をモニターする方法を提供する。同時係属の仮出願番号60/715,503において記載されるように、バイオマーカーのレベルは、例えば、非限定的に、分離に基づく方法(例えば、ゲル電気泳動)、イムノアッセイ法(例えば、抗体に基づく検出)、および機能に基づく方法(例えば、酵素活性または結合活性)を含む、当該分野において既知の従来の任意の適切な方法によって決定することができる。1つの実施形態において、個体におけるA M D の治療の効力を評価する方法は、個体からサンプルを入手する工程、および二次元差ゲル電気泳動(2-dimensional difference gel electrophoresis)(DIGE)によってタンパク質を分離することによってバイオマーカーのレベルを決定する工程を含む。

【0244】

V I I I . H 因子およびC F H R 5 核酸

A) プライマーおよびプローブ

本発明は、多型部位に隣接し、またはそれに及ぶ核酸を提供する。核酸は、H因子多型を検出するためのプローブまたはプライマー(インベダー、分子ビーコンおよび他の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)型プローブを含む)として使用することができる。1つの実施形態において、プローブまたはプライマーは、イントロン2における挿入を認識するが、野生型配列を認識しない。例示的な核酸は、多型の位置がその位置のための代替的な塩基によって占められている、表1A、1B、1C、11、14および15において列挙される多型の少なくとも1つに及ぶ配列を含む。対照集団においてより頻繁に見出されるその位置についての塩基は、正常または野生型配列を意味するのに対して、対照集団において見出される頻度のより低いその位置についての代替的な塩基は、変異体配列を意味する。核酸はまた、H因子遺伝子およびC F H R 5 遺伝子において知られている他の多型、例えば、上記の表AおよびBにおいて同定される多型に及ぶ配列を含む。

【0245】

B) 発現ベクターならびにH因子およびC F H R 5 ポリペプチドの組換え産生

本発明は、H因子ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターを提供する。H因子ポリペプチドは野生型または変異体(例えば、防御的変異体)であり得、全長型(例えば、H F 1)または短縮型であり得る。核酸は、D N A またはR N A であり得、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0246】

ある核酸は、全長の変異体形態のH因子ポリペプチドをコードする。変異体H因子ポリペプチドは、H因子遺伝子において既知である任意の非同義語多型の位置の1つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のH因子とは異なり得る。1つの実施形態において、変異体H因子ポリペプチドは、表1A、表1Bおよび/または表1Cに示される非同義語多型の位置の1つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のH因子ポリペプチドとは異なる。その多型の位置は表1A、表1Bおよび/または表1Cに示されるアミノ酸によって占められる。H因子遺伝子

における複数の多型部位において代替的なアミノ酸を有する変異体H因子ポリペプチドをコードする変異体H因子遺伝子が生成されてもよいことが理解される。

【0247】

本発明は、CFHR5ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターを提供する。CFHR5ポリペプチドは、野生型または変異体（例えば、防御的変異体）であり得る。核酸は、DNAまたはRNAであり得、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0248】

ある核酸は、全長の変異体形態のCFHR5ポリペプチドをコードする。変異体CFHR5ポリペプチドは、CFHR5遺伝子において既知である任意の非同義語多型の位置の1つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のCFHR5とは異なり得る。1つの実施形態において、変異体CFHR5ポリペプチドは、表14および表15に示される非同義語多型の位置の1つを含むコドンによってコードされるアミノ酸において、正常または野生型のCFHR5ポリペプチドとは異なる。その多型の位置は表14および表15に示されるアミノ酸によって占められる。CFHR5遺伝子における複数の多型部位において代替的なアミノ酸を有する変異体CFHR5ポリペプチドをコードする変異体CFHR5遺伝子が生成されてもよいことが理解される。

【0249】

組換えタンパク質およびペプチドの産生のための発現ベクターは周知である（Ausubelら、2004、Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New Yorkを参照のこと）。このような発現ベクターは、DNAの転写を駆動し、かつ原核生物（例えば、E. coli）宿主および真核生物（例えば、酵母、昆虫または哺乳動物細胞）宿主における発現のために適合される、プロモーターなどの調節エレメントに連結された、H因子ポリペプチドをコードする核酸配列を含む。変異体H因子またはCFHR5ポリペプチドは、変異体H因子またはCFHR5遺伝子がプロモーターに作動可能に連結されている発現ベクターにおいて発現可能である。通常、プロモーターは哺乳動物細胞中での発現のための真核生物プロモーターである。通常、転写調節配列は、異種プロモーターおよび任意にエンハンサーを含み、これは、宿主細胞によって認識される。市販の発現ベクターを使用することができる。発現ベクターは、宿主に認識される複製系、増幅可能な遺伝子、選択可能なマーカー、宿主ゲノムへの挿入のために有用な宿主配列などを含むことができる。

【0250】

適切な宿主細胞には、E. coliなどの細菌、酵母、糸状菌、昆虫細胞、ならびに典型的には不死化されている、マウス、ハムスター、ヒト、およびサルの細胞株を含む哺乳動物細胞、ならびにこれらの派生物が含まれる。宿主細胞は、変異体H因子またはCFHR5の遺伝子産物をプロセッシングして、適切にプロセッシングされた成熟ポリペプチドを産生することが可能であり得る。このようなプロセッシングは、グリコシル化、ユビキチン化、ジスルフィド結合形成などを含んでもよい。

【0251】

変異体のH因子またはCFHR5の遺伝子を含む発現構築物は、特定の構成および標的宿主に依存して、宿主細胞に導入される。適切な方法、および原核生物細胞と真核生物細胞の両方の宿主細胞は、当該分野において周知である。組換え全長ヒトH因子は、Sf9昆虫細胞中で研究目的のために発現されてきた（SharmaおよびPangburn、1994、Biologically active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system, Gene 143: 301-2を参照のこと）。ヒトH因子の組換えフラグメントは、種々の細胞型において研究目的のために発現されてきた（例えば、以下を参照のこと：Chengら、2005、「Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer」Clin Chem. 5:

856-63; Vaziri-Saniら、2005, 「Factor H binds to washed human platelets」J Thromb Haemost. 3:154-62; Gordonら、1995, 「Identification of complement regulatory domains in human factor H」J Immunol. 155:348-56)。組換え全長ヒトCFHR5は、Sf9昆虫細胞中で研究目的のために発現されてきた(McRaeら、2001, Human Factor H-related Protein 5 (FHR-5), J. Biol. Chem. 276:6747-6754を参照のこと)。

【0252】

変異体のH因子またはCFHR5ポリペプチドは、実質的に純粋な生成物を得るために、タンパク質生化学および精製の従来の手段によって単離されてもよい。一般的な方法については、Jacoby, Methods in Enzymology 第104巻, Academic Press, New York (1984); Scopes, Protein Purification, Principles and Practice, 第2版, Springer-Verlag, New York (1987); および Deutscher (編) Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 第182巻 (1990) を参照のこと。H因子またはCFHR5のような分泌タンパク質は、宿主細胞が培養されている培地から単離することができる。変異体のH因子またはCFHR5ポリペプチドが分泌されない場合、これは細胞溶解物から単離することができる。

【0253】

1つの実施形態において、ベクターは、表1A、1Bおよび/または1Cに示される1つ以上の多型部位において野生型ではない配列を有する配列を有する変異体H因子タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【0254】

1つの実施形態において、ベクターは、H因子の防御的変異体の配列を有する変異体H因子タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【0255】

1つの実施形態において、ベクターは、表14および15に示される1つ以上の多型部位における野生型ではない配列を有する配列を有する変異体CFHR5タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【0256】

1つの実施形態において、ベクターは、H因子の防御的変異体の配列を有する変異体CFHR5タンパク質の産生のための発現ベクターである。

【0257】

C) 遺伝子治療ベクター

遺伝子治療のためのH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドの発現のための方法は既知であり、上記のIV(A)節において記載される。

【0258】

XI. 抗体

本発明は、正常もしくは野生型H因子ポリペプチド、または1つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がH因子コード領域中に存在する変異体H因子ポリペプチドを認識し得るH因子特異的抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明は、変異体H因子ポリペプチドまたはそのフラグメントを特異的に認識するが、多型部位において変異を有しないH因子ポリペプチドを認識しない抗体を提供する。

【0259】

本発明はまた、正常もしくは野生型CFHR5ポリペプチド、または1つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がCFHR5コード領域中に存在する変異体CFHR5ポリペプチドを認識し得るCFHR5特異的抗体を提供する。1つの実施形態において、本発明は、変異体CFHR5ポリペプチドまたはそのフラグメントを特異的に認識す

10

20

30

40

50

るが、多型部位において変異を有しないCFHR5ポリペプチドを認識しない抗体を提供する。

【0260】

抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、標準的なプロトコールに従って作製される。抗体は、変異体H因子または変異体CFHR5ポリペプチド、またはそのフラグメント、またはその合成ペプチドフラグメントを適切な動物に注射することによって作製することができる。モノクローナル抗体は、標準的なプロトコールに従ってスクリーニングされる(KoehlerおよびMilstein 1975, Nature 256:495; Dowerら、WO 91/17271およびMcCaffertyら、WO 92/01047; ならびにVaughanら、1996, Nature Biotechnology, 14:309; ならびに以下に提供される参考文献)。1つの実施形態において、モノクローナル抗体は、変異体のH因子またはCFHR5ポリペプチドとの特異的免疫反応性についてアッセイされるが、それぞれ対応する野生型のH因子またはCFHR5ポリペプチドについてはアッセイされない。変異体ポリペプチドに特異的に結合するが、対応する野生型ポリペプチドに結合しない抗体を同定するための方法は、当該分野において周知である。抗体のスクリーニングおよび差し引きの方法を含む方法については、以下を参照のこと: HarlowおよびLane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1988); Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1999, 2005までの補遺を含む); Goding, Monoclonal Antibodies, Principles and Practice (第2版) Academic Press, New York (1986); Burioniら、1998, 「A new subtraction technique for molecular cloning of rare antiviral antibody specificities from phage display libraries」, Res Virol. 149(5):327-30; Amesら、1994, Isolation of neutralizing anti-C5a monoclonal antibodies from a filamentous phage monovalent Fab display library. J Immunol. 152(9):4572-81; Shinoharaら、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。免疫付与またはスクリーニングは、全長変異体タンパク質に対して、または代替的には(およびしばしばより好都合に)、変異体形態と野生型の間で異なるエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドフラグメントに対して、向けることができる。特定の変異体には、CFHおよびHFL1のY402HまたはI62V変異体、CFHのR1210C変異体、CFHR5のP46S変異体、およびCFHの短縮型が含まれる。1つの実施形態において、HFL1が測定される。上記に議論したように、1つの実施形態において、HFL1およびCHFの比率が測定される。変異体のH因子ポリペプチドまたはCFHR5ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体(すなわち、野生型タンパク質には結合しないか、またはより低い親和性で結合する)は、変異体形態のH因子もしくはCFHR5の検出のための診断アッセイにおいて、または薬学的組成物中の活性成分として有用である。

【0261】

本発明は、医薬品製造品質管理基準(GMP)要件に従って製造および試験される抗体を含む、患者への投与のために適切な組換えポリペプチドを提供する。例えば、FDA認可に従う組換え抗体は、効力および同一性について試験されなければならない、滅菌されなければならない、外来性の物質を含んではならず、製品中のすべての成分(すなわち、保存

10

20

30

40

50

剤、希釈剤、アジュバントなど)が、純度、品質の規準に合致しなければならず、患者に対して有害であってはならない。

【0262】

本発明は、H因子またはCFHR5ポリペプチド(例えば、正常もしくは野生型のH因子ポリペプチドまたは変異体H因子ポリペプチド、あるいは正常もしくは野生型のCFHR5ポリペプチドまたは変異体CFHR5ポリペプチド)を特異的に認識する抗体、および薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリアを含む組成物を提供する。

【0263】

関連する局面において、本発明は、治療的に受容可能なH因子特異的またはCFHR5特異的抗体を含む滅菌容器、例えば、バイアルを提供する。1つの実施形態において、これは凍結乾燥製剤である。

【0264】

関連する局面において、本発明は、患者への投与のための、ヒトまたはヒト化抗H因子抗体または抗CFHR5抗体の薬学的製剤を提供する。ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体からの可変領域フレームワーク残基(アクセプター抗体と呼ばれる)および実質的にマウス抗体からの相補性決定領域(ドナー免疫グロブリンといわれる)を有する。以下を参照のこと: Peterson、2005、Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins, ILAR J. 46:314-9、Kashmiriら、2005、SDR grafting - a new approach to antibody humanization, Methods 356:25-34、Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989)、WO 90/07861、米国特許第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、同第5,530,101号、およびWinter、同第5,225,539号。存在する場合、定常領域もまた、実質的にまたは完全にヒト免疫グロブリン由来である。ヒト可変ドメインは、通常はヒト抗体から選択され、そのフレームワーク配列は、CDRがそこから導き出されたマウス可変領域ドメインと高度な配列同一性を示す。重鎖および軽鎖の可変領域フレームワーク残基は、同じまたは異なるヒト抗体配列に由来し得る。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であり得、またはいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Carterら、WO 92/22653を参照のこと。ヒト可変領域フレームワーク残基からの特定のアミノ酸は、CDRコンホメーションおよび/または抗原への結合に対するそれらの考えられる影響に基づいて、置換のために選択される。このような考えられる影響の研究は、モデリング、特定の位置におけるアミノ酸の特徴の試験、または特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異生成の効果の経験的観察による。

【0265】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と、選択されたヒト可変領域フレームワーク残基の間でアミノ酸が異なるならば、そのアミノ酸が、(1)直接的に抗原に非共有結合的に結合し、(2)CDR領域に隣接し、(3)さもなくばCDR領域と相互作用し(例えば、CDR領域の約6Å以内に存在する)、または(4)VL-VH界面に関与することが合理的に予測される場合には、ヒトフレームワークアミノ酸は、通常、マウス抗体からの等価なフレームワークアミノ酸によって置換されるべきである。

【0266】

置換のための他の候補は、その位置においてヒト免疫グロブリンについて異常なアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価な位置から、またはより典型的なヒト免疫グロブリンの等価な位置からのアミノ酸で置換することができる。置換のための他の候補は、その位置においてヒト免疫グロブリンについて異常なアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは、通常、ヒト可変領域フレームワーク配列またはこのような配列のコンセンサスに対して少なくとも85%の配列同一性を示す。

【0267】

IX. リスク、防御的、および中性の変異およびハプロタイプの同定

本発明は、表1A、1B、1C、11、14および15に記載されるH因子遺伝子および/またはCFHR5遺伝子における多型部位と連鎖する多型部位についてのスクリーニングの方法を提供する。これらの方法は以下の工程を包含する：H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型部位と連鎖している遺伝子における多型部位を同定し、ここで、H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型部位の多型型がAMDと関連している（例えば、リスクの増加または減少）工程、および連鎖した多型部位が、AMD表現型と相関するH因子遺伝子またはCFHR5遺伝子の多型型と平衡または不平衡にある多型型を有するか否かを示すために個体の集団におけるハプロタイプを決定する工程。

10

【0268】

H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型、例えば、表1A、1B、1C、11、14および15に示されるものは、目的の形質と関連する遺伝子座と、形質と関連しないが形質の原因である遺伝子座とは物理的に近接でありかつそれと同時分離される多型マーカーとの間の物理的な連鎖を確立するために使用することができる。目的の形質と関連する遺伝子座をマッピングすることは、当該分野において周知である手順に従って形質の原因である遺伝子をクローニングすることを容易にする。

【0269】

H因子遺伝子またはCFHR5遺伝子における多型、例えば、表1A、1B、1C、11、14および15に示されるものは、治療が必要な個体を決定するため、および治療の効力を決定するために、多型が表現型形質と同時分離されることを決定するための家族連鎖研究において使用することができる。

20

【0270】

連鎖は、LOD（オッズのlog）スコアの計算によって分析され、これは、マーカーと遺伝子座について、2つが組換え割合シートに位置するときに、2つが連鎖しない（独立して分離する）状況に対して、観察された分離データを得ることの尤度の比率のlog₁₀である。ThompsonおよびThompson, Genetics in Medicine（第5版、W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991）ならびにStrachan, 「Mapping the human genome」The Human Genome（Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford）Chapter 4）所収を参照のこと。3のLODスコアは、見かけの観察される連鎖に対する1000対1のオッズが偶然の一致であることを示す。+3以上のLODスコアは、2つの遺伝子座が連鎖していることの明確な証拠と見なされるのに対して、-2以下のLODスコアは、連鎖ではないことの明確な証拠と見なされる。

30

【0271】

X. トランスジェニック非ヒト動物

本発明は、ヒト変異体H因子またはCFHR5ポリペプチドを発現可能であるトランスジェニック非ヒト動物を提供する。トランスジェニック非ヒト動物は、不活性化された内因性H因子またはCFHR5遺伝子のアレルの一方または両方を有し得る。外因性変異体H因子またはCFHR5遺伝子の発現は、通常、プロモーターおよび選択的にエンハンサーに遺伝子を作動可能に連結すること、次いで、標準的なプロトコールに従って接合子に構築物をマイクロインジェクションすることによって達成される。Hoganら「Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratoryを参照のこと。内因性H因子またはCFHR5遺伝子は、当該分野において既知の方法によって不活性化することができる（Capecci, 1989）。H因子欠損マウスは、外因性ヒト変異体H因子遺伝子の導入のために利用可能である。ヒトまたは非ヒト変異体H因子またはCFHR5ポリペプチドを発現するトランスジェニック動物は、有用な薬物スクリーニングシステムならびにAMDおよび他の補体関連疾患のモデルを提供する。トランス

40

50

ジェニック動物はまた、本発明の組換えCFHR5タンパク質およびCFHR5タンパク質の産生のために使用されてもよい（例えば、米国特許第6,066,725号；同第6,013,857号；同第5,994,616号；および同第5,959,171号；Lillicoら、2005；Houdebine、2000を参照のこと）。

【0272】

XI. キット

本発明は、H因子およびCFHR5の多型およびハプロタイプを検出する試薬、デバイス、およびキットを提供する。AMDを発症するリスクについてスクリーニングするために、および/または被験体におけるAMDを予防または改善するための適切な治療を同定するために特に適しているが、特定の実施形態において、これらの試薬、デバイス、およびキットは、MPGNIまたは任意の他の補体関連の病気を発症するリスクを決定することを含むがこれらに限定されない任意の目的のために、H因子およびCFHR5の多型およびハプロタイプの分析のために使用可能であることが理解される。

【0273】

多数のアッセイシステムが当該分野において既知であり、AMDと関連する変異の存在を決定するための手段に到達することは当該技術の技能の範囲内である。複数のプライマー、複数のプローブ、プライマーの組み合わせ、またはプローブの組み合わせなどであるキットの試薬は、診断またはスクリーニングのためのそれらの使用の前に別々の容器に含まれてもよい。1つの実施形態において、このキットは、本明細書に記載される第1のCFHまたはCFHR5のアレルについてのプローブ、プライマー、またはプライマー対を含む第1の容器、および本明細書に記載される第2のCFHまたはCFHR5のアレルについてのプローブ、プライマー、またはプライマー対を含む第2の容器を含む。

【0274】

1つの実施形態において、本発明は、H因子またはCFHR5の遺伝子における特異的多型にハイブリダイズする少なくとも1つのH因子またはCFHR5のアレル特異的オリゴヌクレオチドを含むキットを提供する。これらのキットは、異なる型の多型にハイブリダイズするH因子またはCFHR5アレル特異的オリゴヌクレオチドの1つ以上の対を含んでもよい。H因子またはCFHR5のアレル特異的オリゴヌクレオチドは、H因子またはCFHR5の遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。H因子またはCFHR5のアレル特異的オリゴヌクレオチドは基材上に固定化されて提供されてもよい。この基材は、表1A、1B、1C、11、14および15に示される多型、ならびに/またはH因子もしくはCFHR5の遺伝子における他の多型（例えば、SNPデータベースにおいて見出される上記に列挙した多型を含む）の少なくとも2個、3個、4個、5個、5個より多く（例えば、少なくとも6個、7個、または8個）を検出するためのH因子またはCFHR5のアレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを含んでもよい。1つの実施形態において、このキットはAMDを診断するために使用される。関連する実施形態において、このキットはH因子またはCFHR5の遺伝子における変異と関連する別の疾患についてスクリーニングするために使用される。

【0275】

このキットは、H因子またはCFHR5遺伝子における特異的多型にわたって、またはそれに隣接してハイブリダイズする少なくとも1つのH因子またはCFHR5特異的プライマーを含んでもよい。H因子またはCFHR5特異的プライマーは、H因子またはCFHR5の遺伝子のコード（エキソン）または非コード（プロモーター、5'非翻訳、イントロンまたは3'非翻訳）領域に由来する配列を含んでもよい。しばしば、これらのキットは、H因子またはCFHR5遺伝子における特異的多型に隣接する核酸の逆鎖にハイブリダイズする、H因子またはCFHR5特異的プライマーの1つ以上の対を含む。適切な緩衝液および酵素の存在下で、H因子またはCFHR5特異的プライマー対は、H因子またはCFHR5の遺伝子における特異的多型を増幅する際に有用である。

【0276】

本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、H因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせは、例示のために提供され、限定のためではない。ある場合において、アッセイは、H因子またはCFHR5遺伝子における少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも6個の多型部位においてアレルを同定する。ある場合において、アッセイは、表1A、1B、1C、11、14および15に列挙されるH因子またはCFHR5の遺伝子における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはすべての多型においてアレルを同定する。1つの実施形態において、部位はrs529825；rs800292；rs3766404；rs1061147；rs1061170；およびrs203674から選択され；任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、部位はrs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；エキソン10A；rs203674；rs375046から選択され；任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、部位はrs3753394；rs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；rs2274700；rs203674；rs3753396；rs1065489から選択され；任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、部位はrs800292（I62V）；IVS2（-18insTT）；rs1061170（Y402H）；およびrs2274700（A473A）から選択される。1つの実施形態において、部位はrs9427661（-249T>C）；rs9427662（-20T>C）；およびrs12097550（P46S）から選択される。好ましい実施形態において、本発明の診断/スクリーニングアッセイは、H因子またはCFHR5遺伝子における少なくとも2つの多型部位におけるアレルを同定する。好ましい実施形態において、本発明の診断/スクリーニングアッセイは、H因子またはCFHR5遺伝子における少なくとも3つの多型部位におけるアレルを同定する。好ましい実施形態において、本発明の診断/スクリーニングアッセイは、H因子またはCFHR5遺伝子における少なくとも4つの多型部位におけるアレルを同定する。

【0277】

ある場合において、キットは、表1A、1B、1C、11、14および15に列挙されるH因子またはCFHR5の遺伝子における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはすべての多型においてアレルを同定するためのプライマーまたはプローブ（「オリゴヌクレオチド」）を含む。1つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：rs529825；rs800292；rs3766404；rs1061147；rs1061170；およびrs203674；そして任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：rs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；エキソン10A；rs203674；rs375046；そして任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、このキットは、以下の多型部位の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む：rs3753394；rs529825；rs800292；イントロン2（IVS2またはinsTT）；rs3766404；rs1061147；rs1061170；rs2274700；rs203674；rs3753396；rs1065489；そして任意にエキソン22（R120C）を含む。1つの実施形態において、部位はrs800292（I62V）；IVS2（-18insTT）；rs1061170（Y402H）；およびrs2274700（A473A）から選択される。1つの実施形態において、部位はrs9427661（-249

10

20

30

40

50

T > C) ; rs 9427662 (- 20 T > C) ; および rs 12097550 (P46 S) から選択される。

【0278】

このキットは、上記の部位の2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つにおいてアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 3766404におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 1061147におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 1061170におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825およびrs 800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 1061147、rs 1061170およびrs 203674の2つまたは3つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825およびrs 800292の少なくとも1つ；ならびにrs 3766404；ならびにrs 1061147、rs 1061170およびrs 203674の少なくとも1つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825、rs 800292、rs 3766404、rs 1061170およびrs 203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) において、ならびに (a) rs 529825 ; rs 800292 ; rs 3766404 ; rs 1061147 ; rs 1061170 ; rs 203674 ; rs 529825 rs 800292 において ; (b) rs 1061147、rs 1061170およびrs 203674の2つもしくは3つにおいて ; rs 529825およびrs 800292、rs 3766404、ならびにrs 1061147、rs 1061170およびrs 203674の2つもしくは3つにおいて ; またはrs 529825、rs 800292、rs 3766404、rs 1061170およびrs 203674においてアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825およびrs 800292の少なくとも1つ；ならびにrs 3766404；、ならびにrs 1061147、rs 1061170およびrs 203674の少なくとも1つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 529825、rs 800292、rs 3766404、rs 1061170およびrs 203674においてアレルを区別する。

【0279】

このキットは、上記の部位の2つ、または上記の部位の少なくとも3つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 1061170におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) ならびにrs 800292ならびに / またはエキソン22ならびにrs 1061170およびエキソン22におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs 800292、rs 1061170およびエキソン22 (R1210C) におけるアレルを区別する。

【0280】

10

20

30

40

50

このキットは、上記の部位の2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つにおいてアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含むことができる。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs529825におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、イントロン2 (IVS2またはinsTT) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs3766404におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs1061147におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs1061170におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs2274700におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン10Aにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs375046におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292において；イントロン2において、rs3766404において、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおいて、rs2274700において、エキソン10Aにおいて、ならびにrs375046においてアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、rs529825、rs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404、rs1061170、rs2274700、エキソン10A、rs203674、およびrs375046においてアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) において、ならびにrs529825；rs800292；イントロン2 (IVS2またはinsTT)；rs3766404；rs1061147；rs1061170；rs2274700；エキソン10A；rs203674；rs375046；rs529825；およびrs800292の任意の1つ以上においてアレルを区別する。1つの実施形態において、このプライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) において、ならびに(a) rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つもしくは3つにおいて；(b) rs529825およびrs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404において、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つもしくは3つ、rs2274700、エキソン10A、rs375046において；またはrs529825、rs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404、rs1061170、rs2274700、エキソン10A、rs203674、およびrs375046においてアレルを区別する。

【0281】

1つの実施形態において、このキットは、H因子遺伝子における少なくとも1つの変異を検出するためのプローブまたはプライマー、ならびにCFHR-5遺伝子における少なくとも1つの変異を検出するためのプローブまたはプライマーを含む。この実施形態において、このキットは、H因子およびCFHR-5の遺伝子のいずれかまたは両方における2つ以上の変異、例えば、2つ、3つまたは4つ以上の変異を検出するためのプローブまたはプライマーを任意に含む。

【0282】

ハプロタイプを決定するための多数のアッセイ形式が既知であり、これらは本発明に適

10

20

30

40

50

合させることができる。例えば、Goergensら、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ら、2005、「Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis.」Mutat Res. 573:195-204を参照のこと。

10

【0283】

1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは以下においてアレルを区別する：(a) rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; および rs203674 のいずれか1つ以上; (b) イントロン2 (IVS2 もしくは insTT); rs2274700; エキソン10A; および rs375046 のいずれか1つ以上; (c) rs529825 および rs800292 の一方もしくは両方; (d) rs1061147、rs1061170 および rs203674 の1つ以上; (e) rs529825 および rs800292 の少なくとも1つ; ならびに rs3766404; ならびに rs1061147、rs1061170 および rs203674 の少なくとも1つ; (f) 少なくとも rs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170、および rs203674; (g) エキソン22 (R1210C); (h) エキソン22 (R1210C) および (a) ~ (g) のいずれか; または (i) rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674; イントロン2 (IVS2 もしくは insTT); rs2274700; エキソン10A; rs375046; および エキソン22 (R1210C) のいずれか1つ以上、ならびに rs9427661、rs9427662 および rs12097550 のいずれか1つ以上。1つの実施形態において、このキットは、デバイスの状況において以下に列挙される部位におけるアレルの任意の組み合わせを区別するために十分なオリゴヌクレオチドを含む。

20

30

【0284】

このキットは、H因子またはCFHR5ポリペプチドを特異的に認識する抗体を含んでもよい。このH因子またはCFHR5に特異的な抗体は、正常な機能的H因子もしくはCFHR5ポリペプチド、または、1つ以上の非同義語一ヌクレオチド変異多型(SNP)がH因子もしくはCFHR5コード領域に存在する変異体H因子もしくはCFHR5ポリペプチドを認識し得る。

【0285】

XII. 診断デバイス

診断方法、予後診断方法、薬物スクリーニング方法、および他の方法のために有用であるデバイスおよび試薬が提供される。1つの局面において、1つ以上のH因子および/またはCFHR5の多型部位に特異的な固定化プライマーまたはプローブを含むデバイスが提供される。1つの実施形態において、H因子および/またはCFHR5の多型部位は、AMDと関連すると本明細書で記載されているものである。

40

【0286】

1つの局面において、1つ以上のH因子および/またはCFHR5の遺伝子産物(ポリヌクレオチドまたはタンパク質)に特異的な固定化プライマーまたはプローブを含むデバイスが提供される。プライマーまたはプローブは、ポリヌクレオチド(例えば、特異的多型部位へのハイブリダイゼーションに基づいて)またはポリペプチド(例えば、変異体ポリペプチドへの特異的結合に基づいて)に結合することができる。

【0287】

50

1つの実施形態において、複数の（少なくとも2つ、通常は少なくとも3つ以上の）異なるプライマーまたはプローブが固定化されているアレイ形式が使用される。「アレイ」という用語は、その通常の意味において使用され、通常は基材に固定化されている複数のプライマーまたはプローブの各々が、例えば、基材上の規定された位置（アドレス）を有することを意味する。アレイ上のプライマーまたはプローブの数は、デバイスの性質および用途に依存して変化し得る。例えば、ディップスティック形式アレイは、わずか2つの別個のプライマーまたはプローブを有することができるが、通常は、3つ以上のプライマー、しばしばさらに多くが存在する。表面に核酸を結合するための1つの方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレイを作製することによる（Fodorら、1991、Science 251: 767-73; Lockhartら、1996、Nature Biotech 14: 1675; ならびに米国特許第5,578,832号; 同第5,556,752号; および同第5,510,270号を参照のこと）。ある実施形態において、単一の固定化プローブを含むデバイスを使用することができることもまた意図される。

【0288】

1つの実施形態において、複数の（少なくとも2つ、通常は少なくとも3つ以上の）異なるプライマーまたはプローブが固定化されているアレイ形式が使用される。「アレイ」という用語は、その通常の意味において使用され、通常は基材に固定化されている複数のプライマーまたはプローブの各々が、例えば、基材上の規定された位置（アドレス）を有することを意味する。アレイ上のプライマーまたはプローブの数は、デバイスの性質および用途に依存して変化し得る。

【0289】

1つの実施形態において、固定化プローブは、抗体または他のH因子もしくはCFHR5結合部分である。

【0290】

本開示により指導される当業者には、種々の多型およびハプロタイプを、H因子関連の病気を発症する個体の性向を評価するために検出することができることが明らかである。以下の例および組み合わせは、例示のために提供され、限定のためではない。ある場合において、アレイは、表1A、1B、1C、11、14および15に列挙されるH因子またはCFHR5の遺伝子における1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはすべての多型においてアレルを同定するためのプライマーまたはプローブを含む。1つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：rs529825; rs800292; rs3766404; rs1061147; rs1061170; rs203674の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン22(R1210C)を含む。1つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：rs529825; rs800292; イントロン2(IVS2またはinsTT); rs3766404; rs1061147; rs1061170; エキソン10A; rs203674; rs375046の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン22(R1210C)を含む。1つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：(a) rs3753394; (b) rs529825; (c) rs800292; (d) イントロン2(IVS2またはinsTT); (e) rs3766404; (f) rs1061147; (g) rs1061170; (h) rs2274700; (i) rs203674; (j) rs3753396; (j) rs1065489の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含み、任意にエキソン22(R1210C)を含む。1つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：rs800292(IVS2(-18insTT)); rs1061170(Y402H); およびrs2274700(A473A)の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマーまたはプローブを含む。1つの実施形態において、アレイは、以下の多型部位：rs9427661(-249T>C); rs9427662(-20T>C); およびrs12097550(P46S)の少なくとも1つにおけるアレルを決定するためのプライマー

10

20

30

40

50

またはプローブを含む。

【0291】

アレイは、上記の部位の2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも6個におけるアレルを決定するプライマーまたはプローブを含むことができる。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs3766404におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061147におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061170におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン22(R1210C)におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292において、rs3766404において、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおいてアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170およびrs203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン22(R1210C)において、およびrs529825において；rs800292において；rs3766404において；rs1061147において；rs1061170において；rs203674において；rs529825およびrs800292において；rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つもしくは3つにおいて；rs529825およびrs800292、rs3766404、およびrs1061147、rs1061170およびrs203674の2つもしくは3つにおいて；またはrs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170およびrs203674においてアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、(a) rs529825；rs800292；rs3766404；rs1061147；rs1061170；およびrs203674のいずれか1つ以上；(b) イントロン2(IVS2もしくはinsTT)；rs2274700；エキソン10A；およびrs375046のいずれか1つ以上；(c) rs529825およびrs800292の一方もしくは両方；(d) rs1061147、rs1061170およびrs203674の1つ以上；(e) rs529825およびrs800292の少なくとも1つ；ならびにrs3766404；ならびにrs1061147、rs1061170およびrs203674の少なくとも1つ；(f) 少なくともrs529825、rs800292、rs3766404、rs1061170、およびrs203674；(g) エキソン22(R1210C)；(h) エキソン22(R1210C)および(a)~(g)のいずれか；または(i) rs529825；rs800292；rs3766404；rs1061147；rs1061170；rs203674；イントロン2(IVS2もしくはinsTT)；rs2274700；エキソン10A；rs375046；およびエキソン22(R1210C)のいずれか1つ以上、ならびにrs9427661、rs9427662およびrs12097550のいずれか1つ以上においてアレルを区別する。

【0292】

アレイは、上記の部位の2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個または少なくとも6個におけるアレルを決定するプライマーまたはプローブを含むことができる。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825における

10

20

30

40

50

アレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、イントロン2 (IVS2またはinsTT) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs3766404におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061147におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061170におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン10Aにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs2274700におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs203674におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs375046におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825およびrs800292において、イントロン2において、rs3766404において、rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおいて、エキソン10Aにおいて、rs2274700において、ならびにrs375046において、アレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、rs529825、rs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404、rs1061170、エキソン10A、rs2274700、rs203674、およびrs375046におけるアレルを区別する。1つの実施形態において、プライマーまたはプローブは、エキソン22 (R1210C) において、ならびに、rs529825において；rs800292において；イントロン2 (IVS2またはinsTT) において；rs3766404において；rs1061147において；rs1061170において；rs2274700において、エキソン10Aにおいて；rs203674において；rs375046において；rs529825およびrs800292において；rs1061147、rs1061170およびrs203674の2つまたは3つにおいて；rs529825およびrs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404において；rs1061147、rs1061170およびrs203674、rs2274700、エキソン10A、およびrs375046の2つもしくは3つにおいて；またはrs529825、rs800292、イントロン2 (IVS2またはinsTT)、rs3766404、rs1061170、rs2274700、エキソン10A、rs203674、およびrs375046のいずれかにおいてアレルを区別する。1つの実施形態において、このデバイスは、キットの状況において上記に列挙される部位におけるアレルの任意の組み合わせを区別する。

【0293】

1つの実施形態において、基材は、約1000個未満の別個のプライマーまたはプローブ、しばしば約100個未満の別個のプライマーまたはプローブ、約50個未満の別個のプライマーまたはプローブ、または約10個未満の別個のプライマーまたはプローブを含む。この状況において使用される場合、プライマーは、2つのプライマーが同じポリヌクレオチド（すなわち、異なる遺伝子についてのcDNAプライマーなど）に特異的に結合しない場合に2つ目のプライマーとは「別個である」。この状況において使用される場合、プローブは、2つのプローブが同じポリペプチドまたはポリヌクレオチド（すなわち、異なる遺伝子についてのcDNAプローブなど）に特異的に結合しない場合に2つ目のプローブとは「別個である」。プライマーまたはプローブはまた、同じ遺伝子の異なるアレル（すなわち、CFHまたはCFHR5）を認識する場合に、別個であると記載されてもよい。従って、1つの実施形態において、本発明の診断デバイスは、CFHのみ、CFH

10

20

30

40

50

R 5 のみ、C F H および C F H R 5 のみ、または C F H、C F H R 5、ならびに 20 個まで、好ましくは 10 個まで、または好ましくは 5 個までの C F H および / または C F H R 5 以外の遺伝子のアレルを検出する。すなわち、このデバイスは、A M D および関連する補体関連疾患についてのスクリーニングに特に適している。1 つの実施形態において、このデバイスは、C F H および / または C F H R 1 ~ 5 の 1 つ以上のみを認識するプライマーまたはプローブを含む。関連する実施形態において、このデバイスは、20 個まで、好ましくは 10 個まで、または好ましくは 5 個までの C F H または C F H R 1 ~ 5 以外の遺伝子のためのプライマーまたはプローブを含む。

【0294】

1 つの実施形態において、固定化プライマーは、H 因子または C H R F 5 の遺伝子中の多型部位においてアレル間を区別することができるアレル特異的プライマーである。H 因子遺伝子中の多型部位におけるアレルを同定するための例示的なアレル特異的プライマーは、表 16 A に示される。固定化アレル特異的プライマーは、プライマーに対して相補的である配列を有する、RNA または DNA のいずれかである核酸に優先的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、蛍光検出を伴う塩基伸長、オリゴヌクレオチドライゲーショナッセイなどを含む、種々の方法によって検出されてもよい (Shi, M. M., 2001, 「Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies」 Clin. Chem. 47 (2): 164 - 172 を参照のこと)。多型部位を検出するためのマイクロアレイに基づくデバイスは市販されており、これには、Affymetrix (Santa Clara, CA)、Protogene (Menlo Park, CA)、Genometrix (The Woodland, TX)、Motorola BioChip Systems (Northbrook, IL)、および Perlegen Sciences (Mountain View, CA) が含まれる。

【0295】

1 つの実施形態において、固定化プローブは、H 因子または C F H R 5 の遺伝子中の多型部位においてアレル間を区別することができるアレル特異的プローブである。H 因子遺伝子中の多型部位におけるアレルを同定するための例示的なアレル特異的プローブは、表 16 B に示される。固定化アレル特異的プローブは、プローブに対して相補的である配列を有する、RNA または DNA のいずれかである核酸に優先的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイズした核酸の蛍光を含む、種々の方法によって検出されてもよい (Shi, M. M., 2001, Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clin. Chem. 47 (2): 164 - 172 を参照のこと)。多型部位を検出するためのマイクロアレイに基づくデバイスは市販されており、これには、Affymetrix (Santa Clara, CA)、Protogene (Menlo Park, CA)、Genometrix (The Woodland, TX)、Motorola BioChip Systems (Northbrook, IL)、および Perlegen Sciences (Mountain View, CA) が含まれる。

【0296】

特定の実施形態において、特定の SNP および変異のために特異的なプローブまたはプライマーは、本発明のキットまたはデバイスから除外される。例えば、ある実施形態において、以下の SNP の 1 つ以上を含まないキットまたはデバイスは除外することができる: (i) rs 529825; (ii) rs 900292; (iii) イントロン 2 (IVS 2 または ins TT); (iv) rs 3766404; (v) rs 1061147; (vi) rs 1061170; (vii) rs 2274700; (viii) エキソン 10 A; (ix) rs 203674; (x) rs 375046; (xi) rs 3753396

; (x i i) r s 1 0 6 5 4 8 9 ; または (x i i i) エキソン 2 2 (R 1 2 1 0 C) 。

【実施例】

【 0 2 9 7 】

X I I I . 実施例

実施例 1

H 因子遺伝子における共通のハプロタイプ (H F 1 / C F H) は個体を加齢性黄斑変性に対して素因化する

加齢性黄斑変性 (A M D) は、先進国における高齢者の不可逆的な失明の最も頻繁な原因であり、世界中で 5 千万人を超える個人に罹患している。本発明者らの以前の研究は、A M D の特徴的な病変である、眼ドレーゼンの形成における代替補体経路の活性化を関連付けた。本発明者らはまた、A M D 患者における黄斑ドレーゼンが、補体カスケードの代替経路の制御されない活性化によって特徴付けられる疾患である I I 型膜性増殖性糸球体腎炎 (M P G N I I) を有する患者における早期の年齢において形成するものと区別不可能であることを示した。ここで本発明者らは、代替補体経路の主要な阻害剤である H 因子タンパク質 (H F 1) が、ドレーゼン中に蓄積し、網膜色素上皮によって局所的に合成されることを示す。以前の連鎖分析は染色体 1 q 2 5 - 3 2 を同定し、これは、主要な A M D 感受性遺伝子座として H 因子遺伝子 (H F 1 / C F H) を有する。本発明者らは、約 9 0 0 例の A M D の症例および 4 0 0 例の適合させた対照から構成される 2 つの独立するコホート中の遺伝子の変異について、H F 1 を分析した。本発明者らは、これらのコホート中で、A M D との 8 つの共通の H F 1 S N P の高度に有意な関連性を見出している； 2 つの共通のミスセンス変異体は、高度に有意な関連性を示す (I 6 2 V ; $\chi^2 = 3 6 . 1$ 、 $p = 3 . 2 \times 1 0^{-7}$ および Y 4 0 2 H ; $\chi^2 = 5 4 . 4$ 、 $p = 1 . 6 \times 1 0^{-13}$) 。ハプロタイプ分析は、複数の H F 1 変異体が A M D のリスクの増加または減少のいずれかを付与することを示唆する。1 つの共通のアットリスクハプロタイプは、A M D の症例の 4 9 % の頻度で存在し、対照において 2 6 % の頻度で存在する (O R = 2 . 6 7、9 5 % C I [1 . 8 0 - 2 . 8 5]) 。このハプロタイプについてのホモ接合性は症例の 2 2 . 1 %、および対照の 5 . 1 % を占める (O R = 5 . 2 6、9 5 % C I [2 . 8 4 - 9 . 7 6]) 。いくつかの防御的ハプロタイプもまた同定される (O R = 0 . 4 4 - 0 . 5 5) 。これらのデータをさらに強化するのは、7 0 % の M P G N I I 患者におけるリスクハプロタイプの発見である。本発明者らは、補体系の調節因子における遺伝子によってあらかじめ決定された変異が、感染などの誘発性の事象と組み合わせられたときに、ヒト集団における A M D の主要な割合の根底にあることを示唆する。

【 0 2 9 8 】

序論

加齢性黄斑変性 (A M D) は、6 0 歳を超えた個人の 1 5 % に罹患し、または 6 億人の個人が見積もられている、先進国における不可逆的な失明の主要な原因である (K l e i n ら、2 0 0 4 ; v a n L e e u w e n ら、2 0 0 3 を参照のこと) 。A M D は、神経網膜とその下にある脈絡膜との間の界面で発生する変性的かつ新生血管性の変化に起因する中心視の進行性の喪失によって特徴付けられる。この位置には光受容体、隣接する網膜色素上皮 (R P E) 、ブルーフ膜、B M として知られる基底膜複合体、および脈絡膜毛細血管のネットワークが存在する。

【 0 2 9 9 】

現在広く行き渡っている見解は、A M D は、複数の遺伝的および環境的リスク因子の相互作用に起因されるべき複雑な障害であるということである (K l e i n ら、2 0 0 3 ; T u o ら、2 0 0 4) 。家族集積性研究は、遺伝子成分は症例の 2 5 % もにおいて同定することができることを示す (K l a v e r ら、1 9 9 8) 。このようにして、A M D は、単一遺伝子障害の蓄積ではなく、むしろ、複数の感受性遺伝子座の相互作用の産物であるらしい。関与する遺伝子座の数、付与される起因し得るリスク、および種々の遺伝子座間の相互作用は不明瞭なままである。

【 0 3 0 0 】

10

20

30

40

50

連鎖分析および候補遺伝子スクリーニングは、AMDの遺伝学に限られた洞察を提供してきた。リスクの増加を伴う1つの遺伝子、*ABCA4* (*Allikmet*sら、1997; *Allikmet*s、2000) およびリスクの減少を伴う1つの遺伝子、*ApoE4* (*Klaver*ら、1998、*Souied*ら、1998) の信頼できる関連性が報告されてきた。いくつかのグループは、ゲノム規模での連鎖分析の結果を報告している (*Tuo*ら、2004; *Weeks*ら、2001)。今日まで、特定の染色体領域、1q25-q31に対する1つのAMD表現型 (*ARM1:MIM 603075*) の連鎖が実証されている (*Klein*ら、1998)。*Fib16* としても知られる *HEMICENTIN-1* は、原因遺伝子であることが暫定的に同定されてきたが (*Schultz*ら、2003)、これは有意な疾患負荷を説明しない (*Abecasis*ら、2004; *Hayashi*ら、2004)。いくつかのグループによる染色体1q上の重複する遺伝子座の同定 (*Weeks*ら、2001; *Iyengar*ら、2003) は、この遺伝子座が主要なAMD関連遺伝子を保有していると思われることを示す。

【0301】

AMD、ならびにアルツハイマー病 (*Akiyama*ら、2000)、アテローム性動脈硬化症 (*Torzewski*ら、1997) および糸球体腎炎 (*Schwartz*ら、2001) などの多くの他の疾患において、特徴的な病変および沈着が疾患の機序および疾患の進行に寄与する。これらの疾患の分子的な機序は多様であり得るが、沈着は、部分的には、局所的な炎症、および生得的な免疫系における宿主防御の主要な要素である補体カスケードの活性化に起因する、多くの共有される分子成分を含む。ドルーゼンは初期のAMDと関連する特徴的な沈着であり、最近の研究は、それらの形成において、局所的炎症および補体カスケードの活性化を同様に関連付けてきた (*Hageman*ら、1999; *Espinosa-Heidman*ら、2003)。ドルーゼンは、種々の補体の活性化因子、阻害因子、活性化特異的補体フラグメント、および終末経路の成分を含み、これには、膜攻撃複合体 (*MAC*)、補体活性化の結果として形成された溶解複合体が含まれる。*MAC* は、宿主細胞および組織ならびに外来性病原体に対して致死性的となり得る。

【0302】

補体の代替活性化経路の制御されない全身的な活性化によって特徴付けられるまれな腎臓疾患である *II型膜性増殖性糸球体腎炎* (*MPGNII*) を有する多くの個体もまた、AMDにおけるものと組成および外見において区別できない、黄斑における眼ドルーゼンを発症する (*Mullins*ら、2001; *O'Brien*ら、1993; *McAvoy*ら、2004)。さらに、*MPGNII* と診断された1人の患者は、補体活性化の代替経路の主要な阻害因子である *HF1* (*HF1*) に変異を有する (*Zipfel*、私信)。さらに、関連する障害である *MPGNIII* を有するいくつかの大家族における個体は、AMDについてのゲノム規模の連鎖研究において同定された遺伝子座に重なる、1q31-32にマッピングされた染色体の領域 (*Neary*ら、2002) への連鎖を示す。まとめると、これらの知見は、*HF1* がAMDおよび *MPGNII* の発症に関与するか否かを試験するための推進力を提供した。

【0303】

本研究において、本発明者らは、AMDおよび *MPGNII* 患者および適合させられた対照における *HF1* 配列変異体の頻度を決定し、そして疾患表現型とのそれらの関連を分析した。本発明者らはまた、正常ドナーおよびAMDドナーからの黄斑 *RPE* - 脈絡膜複合体において、*HF1* 転写および *HF1* タンパク質の分布を試験した。

【0304】

方法

患者、表現型決定およびDNA - 2つの独立したAMD症例の群および年齢を適合させた対照をこの研究に使用した。すべての参加した個体は、60歳を超えたヨーロッパアメリカ人血統であり、インフォームドコンセントに従って *IRB* 認可プロトコールの下で登録された。これらの群は、アイオワ大学からの臨床的に記録されたAMDを有する404例の血縁関係のない患者 (平均年齢 79.5 ± 7.8 歳) および131例の血縁関係のない

い対照患者（平均年齢 78.4 ± 7.4 歳；年齢および民族によって適合させた）、ならびにコロンビア大学からの臨床的に記録されたAMDを有する550例の血縁関係のない患者（平均年齢 71.32 ± 8.9 歳）および275例の血縁関係のない、年齢および民族によって適合させた対照患者（平均年齢 68.84 ± 8.6 歳）から構成された。患者は、網膜フェローシップ訓練された眼科医による間接検眼鏡検査および細隙灯顕微鏡検査によって調べた。

【0305】

Caroline Klaver博士、および後にはKlaver博士によって訓練された個人が、標準化された国際分類システムに従って、両方の機関において基底部の写真を等級付けした（Birdら、1995）。対照患者は、彼らが黄斑疾患のいかなる際立った徴候も示さず、またはAMDの既知の家族歴を有しなかった場合に、選択されかつ含められた。AMD患者は、彼らが研究に参加した時点での彼らの最も重篤な眼の分類に基づいて、以下の表現型のカテゴリーに下位分類された - 初期AMD（eAMD）、地図状萎縮症（GA）、および滲出性（CNV）AMD。アイオワ大学のeAMDおよびGAの症例は、さらに、別個の表現型（RPE変化単独、>10黄斑硬性ドルーゼン、黄斑軟性ドルーゼン、BB（表皮）ドルーゼン、PED、「チェロキー」萎縮症、半島地図状萎縮症、およびパターン地図状萎縮症）に下位分類された。すべての症例についての最初期の記録可能な表現型もまた、分析において記録および利用した。

【0306】

ゲノムDNAは、QIAamp DNA Blood Maxiキット（Qiagen, Valencia, CA）を使用して、症例および対照の被験体から採取した末梢白血球から生成した。

【0307】

ラパヌイ - the Unidad de Bioetica, Ministerio de Salud (Santiago, Chile) によって認可されたインフォームドコンセントプロセスに従って、447名（66%女性；34%男性）のイースター島住民に、拡張眼底検査を含んだ完全な眼の検査を受診させた。医学的な家族歴および眼科歴が取られ、地域の医師および地域社会の指導者からの記録および援助を使用して、被験体の民族性を分類した。これらの試験した患者の49%が純粋なラパヌイであり、9%は混血であり（ラパヌイおよびヨーロッパ人、チリ人、マピューチおよび/または最近のポリネシア人の混血）、42%が大陸系（大部分がチリ系ヨーロッパ人）であった。末梢静脈血および血清を、高齢の201例の個体から採取した；これらの個体のうち114例が純粋なラパヌイであった（108例は>50歳；89例は>60歳）。65歳より上である、60例の純粋なラパヌイ住民および13例のチリ人居住者からのDNAを本研究において使用した。

【0308】

ヒトドナーの眼 - ヒトドナーの眼を、the Iowa Lions Eye Bank (Iowa City, IA)、the Oregon Lions Eye Bank (Portland, OR) および the Central Florida Lions Eye and Tissue Bank (Tampa, FL) から、死亡の5時間以内に入手した。これらの肉眼的病理特徴、ならびに、利用可能な場合、基底部写真および血管造影図を、網膜の専門家によって読み取りかつ分類した。基底部を、国際的AMD等級付けシステム（Birdら、1995）の改変バージョンに従って、少なくとも2名の個人によって等級付けした。

【0309】

総RNAを、網膜、RPE/脈絡膜、および眼に由来するRPE細胞から、RNeasy Miniキット（Qiagen, Valencia, CA）を使用して調製した。ゲノムDNAは、QiaShredder（Qiagen, Valencia, CA）を使用して剪断し、残渣のゲノムDNAはDNase（Promega）を用いて消化した。RNAの完全性は、Agilent BioAnalyzerを使用して評価した。

【0310】

臨床的にAMDであると実証された38例の血縁関係のないドナーに由来するDNA（平均年齢 81.5 ± 8.6 ）、および19例の血縁関係のない対照ドナー（平均年齢 80.5 ± 8.8 ；年齢および民族性を適合させた）をSSCP分析のため、および潜在的な遺伝子型-表現型相関を評価するために利用した。

【0311】

免疫組織化学-鋸状縁および黄斑を含む後極のくさび状生検(wedges)を固定し、以前に記載されたように処理した(Hagemanら、1999)。ある後極は事前の固定なしでOCT中に直接的に包埋した。組織を、クライオスタット上で $6 \sim 8 \mu\text{m}$ の厚さに切片化し、免疫標識を以前に記載されたように実施した(Hagemanら、1999)。隣接する切片を、対照に供するために、二次抗体単独とインキュベートした。いくつかの免疫標識試料を調製し、以前に記載されたように共焦点レーザー走査顕微鏡によって観察した(Andersonら、2002)。

【0312】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)-第1鎖cDNAを、総RNAから、Superscript逆転写酵素(Gibco BRL)およびランダムヘキサマーを使用して合成した。PCR反応は、以下のプライマーセットを使用して実行した：FH1(エキソン8からエキソン10まで)5'-GAACATTTTGAAGACTCCGTC-3' [配列番号324] および5'-ACCATCCATCTTTCCCAC-3' [配列番号325]；FH1(エキソン9からエキソン10まで)5'-TCCCTGGCTACGCTCTCTC-3' [配列番号326] および5'-ACCATCCATCTTTCCCAC-3' [配列番号325]；HFL1(エキソン8からエキソン10まで)5'-TCCGTCAGGAAGTTACTGG-3' [配列番号327] および5'-AGTCACCACTACTCAGGACCC-3' [配列番号328]；HFL1(エキソン9からエキソン10まで)、5'-GGCTACGCTCTTCCAAAAG-3' [配列番号329] および5'-AGTCACCATACTCAGGACCC-3' [配列番号330]。PCRプライマー(IDT, Coralville, IA)は、MacVectorソフトウェア(San Diego, CA)を使用して設計した。反応パラメーターは、94で3分間の1サイクル、94で45秒間、51.4 (FH1)/55 (HFL1)で1分間、72で1分間の40サイクル、および72で3分間の1サイクルであった。PCR産物は2%アガロースゲル上で泳動させ、Quantity One(登録商標)ソフトウェア(Bio-Rad, Hercules, CA)を伴うGel Doc 2000(商標)Documentation Systemを使用して記録した。

【0313】

マイクロアレイ分析：DNAマイクロアレイ分析は、死亡の5時間未満に採取したネイティブなヒトRPEまたはRPE-脈絡膜複合体から抽出した(RNeasy miniキット, Qiagen, Valencia, CA)総RNAを使用して実施した。3つの異なるプラットフォーム：18,380個の非重複DNAマイクロアレイ(Incyte Pharmaceuticals; St. Louis, MO)；Affymetrix遺伝子チップシステム；および全ヒトゲノムまたはヒト1A V2オリゴ-マイクロアレイ(Agilent Inc., Palo Alto, CA)を使用した。個々のプロトコールは、製造業者の説明書に従った。Incyte分析のために、黄斑および中央の末梢領域の6mmパンチに由来するcDNAを、ランダムプライミング反応において33-Pで標識し、精製し、18,380個の非重複cDNAを含むナイロンベースのアレイにハイブリダイズした。メンブレンをリン画像化し、シグナルを標準化し、データを、Genome Discoveryソフトウェアパッケージを使用して分析した。Affymetrix分析については、RPEおよびRPE/脈絡膜(6~8mm黄斑および末梢パンチ)cRNAを、標準的なプロトコールを使用して、Affymetrix Gene Chips(HG-U133A)に直接的にハイブリダイズした。これらの手順は、流体

工学ステーションおよびGene Arrayスキャナーを備えた、アイオワ大学のDNA中核設備によって実施された。Agilentデータは、黄斑および中央の末梢領域のパンチから入手した。黄斑および末梢RPE / 脈絡膜に由来するCY3およびCY5標識された増幅されたcRNAは、Agilent Low Input RNA増幅キットを使用して、同じドナーからの黄斑および末梢のRNAを使用して生成した。Agilentアレイデータは、3例の正常若年ドナー、3例のAMDドナー、および3例の年齢を適合させた非AMD対照から、Vers Arrayスキャナーを使用して収集した；データは、Vers Array Analyzerソフトウェア(BioRad)を使用して定量した。各スポットの正味のメジアン強度は、グローバルバックグラウンド減算を使用して計算し、データは局所的回帰法を使用して標準化した。

10

【0314】

変異のスクリーニングおよび分析 - HF1のコード領域および隣接するイントロン領域(転写されて短縮型FHL1アイソフォームを生成するエキソン10Aを含む)を、一本鎖コンホメーション多型(SSCP)分析、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)および直接的配列決定を使用して、変異体について試験した。残りのSNPは5'ヌクレアーゼ(Taqman, ABI)方法論によって決定した。Taqman遺伝子型決定および関連する分析は、記載されたように(Goldら、2004)実施した。SSCP、DHPLCおよびDNA配列決定分析のためのプライマー(表5)は、MacVectorソフトウェア(San Diego, CA)を使用して、各エキソンおよびその隣接するイントロン領域を増幅するように設計した。PCR由来のアンプリコンは、以前に記載されたように(Allikmettsら、1997; Hayashiら、2004)、SSCPおよびDHPLCによって配列の変異についてスクリーニングした。SSCPおよびDHPLCによって検出されるすべての変化は、標準的なプロトコールに従う二方向性配列決定によって確認した。統計学的分析は、カイ二乗(²)およびフィッシャーの直接確率検定を使用して実施した。

20

【0315】

結果

RPE - 脈絡膜界面におけるH因子

黄斑および黄斑外からのRPE - 脈絡膜複合体におけるH因子タンパク質の分布は、初期のAMDの病歴を有する6例のドナー、およびAMDまたはドルーゼンを有しない同様の年齢の3例のドナーから得た眼において評価した(図1A~1L)。AMDを有するドナーにおいては、強烈なHF1免疫反応性(IR)が、ドルーゼン、RPEの下(すなわち、RPEの下の空間)、および脈絡膜毛細血管の周囲において存在する(図1A~1D、1E、1G)。一次抗体の非存在下では、RPE / 脈絡膜における標識は存在しない(図1F)。H因子抗体のすべてが、ある程度まで、均質な様式でドルーゼンを標識した(図1Cおよび1E)。1つの抗体はまた、ドルーゼン中の下位構造エレメントを標識した(図1Aおよび1B)。このような構造は、HF1を結合する活性化された補体成分C3b/iC3bに対する抗体を使用して標識される(Andersonら、2004; Johnsonら、2001)。H因子の免疫反応性は、年齢を適合させた対照と比較して、AMDを有するドナーにおいてより強固である；これはまた、末梢におけるよりもAMDドナーの黄斑においてより顕著である(図1Gおよび1H)。黄斑中の抗HF1パターン(図1G)は、抗C5b-9パターンと高度に類似している(図1Iおよび1K)；両方の場合において、標識は、典型的には、脈絡膜毛細血管を含む。黄斑外局在は、はるかにより少ない抗C5b-9免疫反応性を示す(図1J)。RPE - 脈絡膜におけるC5b-9の免疫反応性がほとんどないこと、または全くないことが、50歳よりも下でかつAMDを有しないドナーにおいて観察される(図1L)。

30

40

【0316】

図1の説明

(A~B) 萎縮性AMDと診断された84歳の男性ドナーからの高倍率共焦点免疫蛍光画像。ドルーゼンおよびRPE下空間における下位構造エレメントの抗HF1(Adv a

50

nced Research Technologies) 標識 (白矢印) は、Cy2 / フルオレセインチャンネル上で画像化する。RPE 下空間は、基底 RPE 表面とブルーフ膜の内部コラーゲン層の間の細胞外区画である。このようなエレメントもまた、補体活性化表面に共有結合する C3 フラグメント (iC3b、C3d、C3dg) に対して指向されるモノクローナル抗体を使用して免疫反応性 (IR) を示す (Johnson ら、2001; 2003)。このドナーからの脈絡膜毛細血管の内腔における強烈な抗 H 因子標識 (星印) は、血流中での HF 1 の高い循環レベルを反映する可能性が最も高い。RPE 細胞質における自己蛍光リポフスチン顆粒は、Cy3 / テキサスレッドチャンネルで標識する。拡大バー、A) 5 μm ; B) 3 μm 。

【0317】

10

(C ~ D) 異なる HF 1 ポリクローナル抗体 (Quidel) を使用する、AMD を有する 83 歳男性におけるドルーゼンおよび RPE 下空間中での HF 1 の共焦点免疫蛍光局在 (Cy2 / フルオレセインチャンネル; 緑色)。C) このドナーの眼においては、ドルーゼン (Dr) 標識パターンは均質である。D) RPE - 脈絡膜の低倍率画像。抗 HF 1 IR は、脈絡膜の全体を通して、および RPE 下空間において存在し (矢印)、これは、ドルーゼンおよび他の沈着物が加齢および AMD 型に関連する解剖学的な区画である。リポフスチン自己蛍光 (Cy3 チャンネル; 赤色)。拡大バー、C) 10 μm ; D) 20 μm 。

【0318】

20

(E ~ F) ドルーゼン中の HF 1 の免疫組織化学的局在。E) 紫色のアルカリホスファターゼ反応生成物によって示される抗 HF 1 モノクローナル抗体 (Quidel) 標識は、ドルーゼン中で、ブルーフ膜に沿って、および脈絡膜毛細血管壁上で明白である (矢印)。F) 同じ眼からの対照切片。一次抗体の非存在下では標識が存在しない。RPE 細胞質および脈絡膜における茶色の色素形成はメラニンである。拡大バー = 10 μm 。

【0319】

(G ~ H) 黄斑における HF 1 の免疫局在。G) 広範な標識が、AMD を有するドナーにおいて、BM、脈絡膜毛細血管壁、および毛細血管間柱 (矢印) に沿って存在する。H) AMD を有しないドナーの黄斑からの対照切片; はるかに少ない標識が、同じ構造中で明白である。拡大バー = 20 μm 。

【0320】

30

(I ~ J) 同じ AMD ドナーの眼からの黄斑 (図 1 I) および黄斑外 (図 1 J) の根底にある RPE - 脈絡膜における補体膜攻撃複合体 (C5b - 9) の免疫組織化学局在。黄斑において、強烈な抗 C5b - 9 標識が、ドルーゼン、ブルーフ膜、および脈絡膜毛細血管内皮と関連する。黄斑の外側の抗 C5b - 9 標識は、ブルーフ膜の近傍における狭いゾーンに制限されている。RPE 細胞質および脈絡膜における茶色の色素はメラニン色素形成を表す。拡大バー = 20 μm 。

【0321】

(K - L) AMD を有するドナー (図 1 K) および AMD を有しない第 2 のドナー (図 1 L) からの黄斑における C5b - 9 の免疫組織化学局在。RPE 細胞質および脈絡膜における茶色の色素形成はメラニンを表す。抗 C5b - 9 標識は、脈絡膜毛細血管壁 (黒色矢印) および毛細血管間柱 (白色矢印) と主として関連する。標識は、AMD 眼においてはるかにより強烈である。図 G に示されるように、同じドナーからの黄斑における抗 HF 1 標識パターンとの強力な類似性に注目のこと。拡大バー、K = 15 μm ; L = 20 μm 。

40

【0322】

網膜色素上皮は H 因子の局所的供給源である

RPE、RPE / 脈絡膜および網膜における HF 1 および FHL 1 の発現は、RT - PCR および DNA マイクロアレイ分析によって評価した。両方の遺伝子産物についての適切なサイズの PCR 産物が、AMD を有するかまたは有しないドナー由来のヒトの眼における、新たに単離された RPE および RPE / 脈絡膜複合体において存在するが、神経網

50

膜には存在しない(図2)。プライマーは、HF1コード配列のエキソン8、9、10A(このエキソンは短縮型アイソフォームFHL1を生成するために利用される)および10の中で選択した。PCR反応は、AMDの病歴が臨床的に記録されていたドナーに由来する、ヒト感覚神経網膜(レーン2)、RPE、および脈絡膜(レーン3)、および新たに単離したRPE細胞(レーン4)から抽出したRNAから調製したcDNAを用いて実施した。ゲノムDNAは、増幅のための鋳型として利用した(レーン5);レーン6に示される混合物には鋳型を加えなかった。レーン1は100bpラダーを含む。HF1のエキソン8からエキソン10まで(左のパネル)、およびエキソン9からエキソン10まで(右のパネル)、ならびに、FHL1のエキソン8からエキソン10Aまで(左のパネル)、およびエキソン8からエキソン10Aまで(右のパネル)に及ぶアンプリマーは、予想したサイズ(それぞれ、376、210、424および248bp)であった。FHR1-5についての転写物は、RPEまたはRPE/脈絡膜において検出されないが、FHR1-4は、RT-PCRによって神経網膜において検出される(データ示さず)。

【0323】

3つのプラットフォームから導き出された遺伝子発現アレイデータは、HF1およびFHL1転写物はRPEおよび脈絡膜細胞によって局所的に発現されるが、HF1関連タンパク質転写物は、もしあるとしても、RPEおよび脈絡膜細胞によって局所的に発現されることはほとんどない(FHR1が考えられる例外である)ことを確認する。AMDを有する9例のドナーおよび3例の年齢を適合させた対照に由来するRPE/脈絡膜cDNAでプローブしたIncycyteアレイから導き出されたデータは、AMDを有するドナーにおけるHF1 mRNAのレベルの平均2~3倍の上昇レベルを示す。黄斑外領域と比較して、黄斑領域においてわずかにより高いレベルに向かう傾向もまた存在するが、この違いは統計学的に有意ではない。Affymetrixアッセイを使用して、AMDを有する2例のドナーおよび2例の年齢を適合させた対照ドナーから単離されたRPEおよび隣接するRPE/脈絡膜製剤の試験から生じた結果は、これらの組織間でのHF1転写物の存在を確認し、HF1メッセージの有意な割合がRPE層の中に存在することを示す(データ示さず)。

【0324】

HF1における変異体はAMDおよびMPGN IIと関連する

HF1遺伝子のアレル変異体がAMDと関連するか否かを試験するために、アイオワ大学の404例のAMD患者および131例の適合させた対照のコホートにおいて、22個すべてのコードエキソン配列および50~100bpの隣接するイントロン配列をスクリーニングした。全体で26個の配列変異体を検出する;5個の同義語置換および12個の非同義語置換を含むコード領域における17個のSNP(cSNP)、および9個のイントロンSNPである(変異体のいくつかを図3に示す)。図3は、分析において使用される11個のSNP、20個の短いコンセンサスリピート(SCR)、および連鎖不均衡(LD)ブロックのおよその位置を示し、病原体および他の基質についてのおよその結合部位は、以前に公開されたデータに基づいてダイアグラムの下に示される(Zipfelら、2002;Rodriguez de Cordobaら、2004)。cSNPは、以前に記載された一般的な非同義語変異体、例えば、エキソン2におけるI62V、エキソン9におけるY402H、およびエキソン18におけるD936Eを含んだ(図3)。潜在的な機能的効果を有する一般的なイントロンSNPの例は、IVS2-18insTT変異体である。5個のまれな(<0.5%)変異体もまた、AMD患者と対照の両方において検出され(データ示さず)、疾患表現型がHF1レアアレルによって引き起こされる(すなわち、疾患が引き起こす突然変異の)可能性を除外した。詳細な遺伝子型決定データは、404例の患者および131例の対照の数人または全員において6個のSNPについて得られ(表4および6A~6C)、関連分析は、症例-対照研究設計を使用して実施した。高度に有意な関連性は、I62V($\chi^2 = 15.0$, $P = 1.1 \times 10^{-4}$)およびY402H($\chi^2 = 49.4$, $p = 2.1 \times 10^{-12}$)を含むいくつかの個体変異体を用いて見出される。このコホートにおいてAMDとの最も強い関連は、エキソン10

における同義語 A 4 7 3 A 変異体について観察され、これは、3 . 4 2 のオッズ比 (O R) (9 5 % 信頼区間 (C I) [2 . 2 7 - 5 . 1 5]) を生じる。

【 0 3 2 5 】

これらの結果は、コロンビア大学、ニューヨークにおいて得られた A M D 患者 (n = 5 5 0) および適合させた対照 (n = 2 7 5) の独立したコホートにおいて確認された (表 4)。同じ 2 つの非同義語 S N P がまた、この第 2 のコホートにおいて A M D と高度に関連している (I 6 2 V ; $\chi^2 = 3 6 . 1$, $p = 3 . 2 \times 1 0^{-7}$ および Y 4 0 2 H ; $\chi^2 = 5 4 . 4$, $p = 1 . 6 \times 1 0^{-13}$)。加えて、いくつかの他のイントロン S N P が、市販のアッセイの頻度および利用可能性に基づいて選択された (全体で 1 1 個の S N P について)。このコホートにおける最も強い関連は、イントロン 1 0 における S N P r s 2 0 3 6 7 4 を用いて観察される ($\chi^2 = 6 6 . 1$, $p = 4 . 2 9 \times 1 0^{-16}$)。この変異体は、A M D との 2 . 4 4 の O R を示す (9 5 % C I = 1 . 9 7 - 3 . 0 3)。O R は控えめであるが、変異体は非常に一般的である ; 症例の 3 0 . 5 % がアレル B についてホモ接合性であるが、対照ではわずか 1 2 . 9 % である。エキソン 1 3 および 1 8 における Q 6 7 2 Q および D 9 3 6 E アレルは、統計学的に有意な関連を示さず、病原体および基質分子認識に関与するドメインを含む H F 1 の N 末端の半分における変異 (図 3、以下もまた参照のこと) は、A M D と関連することを示唆する。2 セットのデータは、遺伝子型決定した S N P が、高度に有意な様式で A M D と関連するのみならず、関連の頻度および程度が 2 つのコホートにおいて非常に類似しているという点で著しく類似している (表 4 および 6)。

【 0 3 2 6 】

関連は、全体の A M D 患者コホートが対照と比較されるときに高度に有意である (表 4)。A M D の主要な下位表現型、例えば、初期 A M D (e A M D、黄斑ドルーゼンおよび / または色素的異常によって特徴付けられる)、C N V (新生血管膜および / または円板状瘢痕)、および G A (地図状萎縮症) が別々に分析されるときに、関連は、e A M D および C N V の症例においてとりわけ顕著である。G A 群は、ある場合において、とりわけ、エキソン 1 3 (Q 6 7 2 Q) および 1 8 (D 9 3 6 E) アレルによって規定されるハプロタイプについて、一般的な傾向からのある程度の逸脱を示す (データ示さず)。この逸脱は、様々な機序について有意であり得るが、おそらくは G A を有する比較的少ない数の患者に起因して、統計学的な有意さにまで到達しなかった。

【 0 3 2 7 】

連鎖不均衡 (L D) 分析は、全体の H F 1 遺伝子にわたる広範な L D を示した (表 2 および図 3)。エキソン 2 ~ 3 領域における 3 つの S N P は、エキソン 7 および 9 における A 3 0 7 A および Y 4 0 2 H 変異体、ならびにエキソン 1 3 および 1 8 における Q 6 7 2 Q および D 9 3 6 E 変異体のように、実質的に完全な L D にある (表 6 および図 5)。症例および対照におけるハプロタイプの見積もりは、対照のわずか 2 6 % のみに対して、症例の 4 9 % において最も頻繁なアットリスクハプロタイプを同定した (O R = 2 . 9 3 9 5 % C I [2 . 2 9 - 3 . 7 4])。このハプロタイプについてのホモ接合性は、コロンビアの症例の 2 2 . 1 % および対照の 5 . 1 % に存在する (O R = 5 . 2 6、9 5 % C I [2 . 8 4 - 9 . 7 6])。2 つの一般的な防御的ハプロタイプは、対照の 3 0 % および症例の 1 8 % において見出される (O R = 0 . 4 7 6 9 5 % C I [0 . 3 4 9 - 0 . 6 5 0] および O R = 0 . 4 7 2、9 5 % C I [0 . 3 2 0 - 0 . 6 9 8])。これらのハプロタイプは、エキソン 2 ~ 3 遺伝子座 S N P およびイントロン 1 0 S N P においてのみ異なる。図 4 および表 2 に示されるように、これらの防御的ハプロタイプは互いに密接に関連し、両方ともリスクハプロタイプとは少なくとも 5 段階離れている。興味深いことに、以前に H U S と関連することが示された 3 つの S N P (プロモーター - 2 5 7 C > T、A 4 7 3 A、および D 9 3 6 E) は、すべてが A M D のリスクについて中性である 1 つの比較的一般的なハプロタイプ (1 2 %) 上にある。各 S N P について、本発明者らは、コンセンサスチンパンジーゲノムに存在する塩基を同定した。生成したハプロタイプは、可能性のある祖先のヒトハプロタイプを表し、防御的ハプロタイプと密接に関連する

(データ示さず)。

【0328】

SNP IVS2-18insTTおよびY402Hもまた、20例の血縁関係のないMPGNI患者、52例のラパヌイネイティブ、ならびにヒスパニック系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、およびヨーロッパ系アメリカ人の小さなコホートにおいて遺伝子型決定した(表7)。アットリスクハプロタイプの頻度は、Y402H変異体および/またはIVS10遺伝子座の遺伝子型からの異なる集団からのサンプル中で見積もった。これらには、65歳を超えるラパヌイネイティブ(このイースター島集団においては、AMDは極度にまれであり、存在しない可能性が最も高い)、コロンビア大学からの対照(年齢>65歳)、ヒスパニック一般集団、アイオワ大学からの対照(年齢>65歳)、アフリカ系アメリカ人一般集団、コロンビア大学からのAMD症例、ヨーロッパ系アメリカ人一般集団、アイオワ大学からのAMD症例、およびMPGNIを有する個体が含まれる。N=個体の数である。MPGNIコホートにおいて、リスクハプロタイプの頻度はおよそ70%である。加えて、リスクハプロタイプは、AMDのより低い発生率を有する群である、ヒスパニック系アメリカ人およびアフリカ系アメリカ人において頻度がより低いようである(35~45%)。しかし、これらの集団にタイプ分けされたサンプルの数は小さい。イースター島のラパヌイ集団は、顕著に低いレベルのAMDを有する。65歳を超える52例のAMDを有しないラパヌイネイティブの分析から、本発明者らは、リスクハプロタイプの頻度がわずかに19%であると見積もっている。

【0329】

考察

H因子多型およびAMD

本明細書に提示されるデータは、補体調節遺伝子、H因子(HF1/CFH)における特異的多型に、2つの独立したコホート中のAMD症例の主要な集団を関連付ける(Zipfel, 2001; Rodriguez de Cordobaら, 2004)。ハプロタイプ分析は、対照の約25%と比較して、AMDを有する個体のほぼ半数において、最も高頻度のアットリスクハプロタイプが存在することを示す。SNPの関連性の頻度および程度は、2つのコホートで非常に類似しており、遺伝子型決定したSNPは、各々においてAMDとの高度に有意な関連性を示す。この関連性は初期のAMDまたは脈絡膜新血管形成の症例においてとりわけ顕著であり、地図状萎縮症についてはそれほど顕著でない。AMDとの特異的HF1ハプロタイプの観察された関連の規模は、以前にAMDと関連付けられた遺伝子の異常と比較した場合に顕著である。

【0330】

特異的HF1ハプロタイプがAMD疾患表現型についてのリスクの増加を付与するという結論のさらなる裏付けは、患者が初期の発症である黄斑ドレーゼンを発現する、HF1突然変異と関連した腎臓疾患であるMPGNIを有する20例の血縁関係のない患者において、および、もしあっても顕著に低いAMDの発生率を有する人種である52例のラパヌイネイティブにおいて、SNP IVS2-18insTTおよびY402Hの遺伝子型決定によって得られた。MPGNI患者のおよそ70%およびラパヌイの19%が、本研究において、アットリスクハプロタイプであるHF1を有することが見出された。より大きなサンプルセットの分析は、これらの結果を確認するために必要とされるが、データは、AMDとのHF1の関連が、ヨーロッパ人に由来する集団に制限されない可能性があることを確かに示唆する。本発明者らは、HF1機能を、AMDの根底にある病源性メカニズムにおいてさらに関連付けて、防御的ハプロタイプを同定した。

【0331】

H因子多型の機能的意味合い

ヒトにおけるH因子欠損は、MPGNIおよび非定型的溶血性尿毒症性症候群(aHUS)と関連付けられている。(Zipfelら, 2001)。HF1欠損は、小胞体におけるタンパク質の保持を生じる、タンパク質短縮化またはアミノ酸置換に導く突然変異から生じる。血漿HF1のレベルの減少が続いて起こり、同時に起こるC3および他の

補体成分の消費を伴う、代替補体経路の制御されない活性化に導く。対照的に、aHUSに導くHF1突然変異は、典型的には、細胞表面におけるFH1の補体阻害機能を制限するミスセンス突然変異である。最近の研究は、FH1突然変異を有する個体とFH1突然変異を有しない個体の両方における、3つの一般的なSNPとaHUSとの間の結合を明らかにしている(Caprioliら、2003)。さらに、感染などの侵襲は、aHUSの出現を誘発することが実証されている。

【0332】

遺伝子型決定されたHF1のSNPの大部分は、コードされるタンパク質の重要な機能的ドメインの中に位置し(図3)、これは、60アミノ酸の20個の短いコンセンサスリピート(SCR)からなる。SCRは、C3b(SCR1-4、SCR12-14およびSCR19-20)、ヘパリン、シアル酸(SCR7、SCR13およびSCR19-20)およびC反応性タンパク質(CRP)(SCR7)についての結合部位を含む。それゆえに、SNPは、機能的ドメインの中に位置するが、一般的に、おそらく、発現レベル、結合効率、および他の分子特性の変動性を通してタンパク質機能に影響を与える。例えば、エキソン2 I62V変異体はSCR2に位置し、これは第1のC3b結合部位に含まれ、エキソン9 Y402H変異体はSCR7ドメイン中にあり、これはヘパリンおよびCRPの両方を結合する。イントロンSNP、例えば、IVS2-18insTT変異体はスプライシングに影響を与え得る。例えば、TT挿入の効果の分析は(<https://splice.cmh.edu/server>において)、天然のアクセプター部位の6bp上流の新規な潜在性スプライシングアクセプター6の作製を示唆した(データ示さず)。研究されたSNPのいくつかはHF1アイソフォームの発現に影響を与えることもまた可能である。例えば、I62Vは、予測されたエキソンスプライシングエンハンサー中に存在する(Wangら、2004)(データ示さず)。

【0333】

一般的なSNPの機能的な結果は控えめであり得る。なぜなら、これらは、後期に発生した表現型に含まれ、(厳格な)進化の制約に供されていないからである。より実質的な効果、すなわち、疾患を引き起こす突然変異を有するHF1変異体は、初期の発症、重篤な(劣性の)疾患、例えば、HF1欠損およびaHUSに関わるとされる(Zipfelら、2002; Rodriguez de Cordobaら、2004; Caprioliら、2003; Zipfel、2001)。関心が持たれるものは、真の疾患を引き起こす突然変異は、HF1遺伝子の完全なスクリーニング後に、HUS患者の約25%~35%のみにおいて同定されているという事実である(Caprioliら、2003)。同時に、変異体-257C>T(プロモーター)、A473A(エキソン13)およびD936E(エキソン18)によって規定された疾患関連ハプロタイプが、HUS患者において、優勢には、疾患を引き起こす突然変異を有しないヒトにおいて同定されてきた(Caprioliら、2003)。さらに、同じ研究は、罹患した発端者が、一方の親から突然変異したアレルを、およびもう一方の親から感受性のアレルを遺伝したいくつかの血統を同定した。対照的に、疾患を引き起こす突然変異のキャリアである、罹患した発端者の健常な同胞は、防御的アレルを遺伝した。これらの血統からの罹患した個体において、症例の>60%における細菌またはウイルスの感染として特定される、疾患誘発効果は、すべての症例の>80%において、および見かけの疾患関連変異を伴わない症例の>90%において同定された(Caprioliら、2003)。

【0334】

まとめると、これらのデータは、感染性誘発事象と組み合わせたアットリスクHF1ハプロタイプが、疾患の出現のために十分であることを強く示唆する。興味深いことに、HUS中の(主としてC末端の)アットリスクHF1ハプロタイプは、AMDおよび/またはMPGNI Iにおけるアットハプロタイプと重複せず(表2)、MPGNI IおよびAMDとは反対に、HUSにおける異なるトリガーを示唆する。HUSではなく、MPGNI Iにおける初期の発症のドルーゼンの観察およびAMDにおける同じ組成物のそれらの観察は、これらの疾患についての異なる機序を裏付ける。

【0335】

H F 1 における疾患を引き起こす突然変異は、M P G N I I においてはまれであり、A M D においては報告されておらず、また本研究における広範なスクリーニング後に本発明者らもそれらの突然変異を見出していない。しかし、本発明者らは、M P G N I I を有する患者の70%の頻度で、およびA M D を有する患者のおよそ50%の頻度で、同じアットリスクハプロタイプを観察した。これらのデータは、感染性因子によって誘発される場合、ヒトの疾患に対する感受性を実質的に増加するアットリスクH F 1 ハプロタイプと一貫している。これらの因子の組み合わせた効果は、A M D からM P G N I I までの範囲で、得られる表現型の重篤度を決定する。

【0336】

H F 1 ハプロタイプの進化分析は、リスクハプロタイプが、チンパンジーにおいて見出される先祖ハプロタイプから有意に進化したことを示す。図4は、ハプロタイプの間の関連性を示すH F 1 S N P のハプロタイプネットワークダイアグラムを示し、円のサイズがハプロタイプの頻度に比例している。大きな黒丸は主要なリスクハプロタイプを表し、垂直線を付した円は2つの有意な防御的ハプロタイプであり、大きな白丸は非定型的溶血性尿毒症性症候群(H U S)と関連する3つのS N P を含むハプロタイプであり、これはA M D リスクについては中性である。推定の先祖ハプロタイプもまた示す。異なる型のH F 1 遺伝子が病原体に应答して出現し、これが代替補体経路を活性化することが可能である。弱く作用するH F 1 ハプロタイプは、補体阻害の減少および細菌感染に対する強力な防御を提供し得る。しかし、このような弱いアレルは、個体に素因を与えることの結果から、補体系の機能不全の結果までを有し得る。A M D リスクハプロタイプは、全長のH F 1 タンパク質とF H L 1 タンパク質の両方を産生する遺伝子の5'末端において原理的に異なっていることが興味深い。対照的に、遺伝子の3'部分におけるH U S 突然変異クラスターは、H F 1 においてのみ見出される。それゆえに、疾患におけるこれら2つの型のタンパク質の役割を決定することが重要である。

【0337】

A M D におけるH因子機能不全の生物学的モデル

補体系の主要な機能の1つは、このような感染因子に対する防御を提供することである。これは、オプソニン作用および微生物の溶解、外来性粒子の除去、炎症性細胞の補充、抗体産生の調節、および免疫複合体の排出を媒介する(M o r g a n ら、1991; K i n o s h i t a、1991)。補体系の活性化は、連続的な、増幅する、タンパク質分解カスケードを誘発し、これは表面を活性化する修飾を生じ、炎症性細胞を刺激する可溶性アナフィラトキシンの放出を生じ、そして最終的には、膜貫通ポアの形成を通して細胞の溶解を促進する高分子複合体である、膜攻撃複合体(M A C)の形成を生じる。補体の制御されない活性化は、宿主細胞および組織に対するバイスタンダー損傷を導き得る。結果として、H F 1、ならびに他の循環タンパク質および膜結合タンパク質は、補体系を調節するように進化してきた(M o r g a n、1999)。

【0338】

補体成分のスペクトルは、ドルーゼン(および/またはそれに隣接するかまたはそれに重層するR P E 細胞)中、ブルーフ膜に沿って、および/または脈絡膜内皮細胞膜上のいずれかで同定されてきた(H a g e m a n ら、2001; M u l l i n s ら、2000; M u l l i n s ら、2001; A n d e r s o n ら、2002; J o h n s o n ら、2000; J o h n s o n ら、2001; C r a b b ら、2002; J o h n s o n ら、2002; M u l l i n s ら、1997)。これらには、終末経路補体成分、終末経路の活性化特異的フラグメント、ならびに種々の補体調節因子が含まれる。細胞媒介事象もまたこのプロセスに寄与し得るという証拠が存在する(P e n f o l d ら、2001; S e d d o n ら、2004; M i l l e r ら、2004)。

【0339】

本発明者らは、ここで、A M D の前歴を有するヒトドナーにおいて、H F 1 もまたドルーゼンの構成成分であることを示す。第2に、本発明者らは、H F 1 が、ドルーゼンの中

で、アミロイド含有下位構造エレメント中のそのリガンドC3bとともに同時局在することを示し、候補補体活性化因子としてのこれらの構造をさらに関係付ける(Ander sonら、2004; Johnsonら、2002)。本発明者らはまた、C5b-9免疫反応性によって示されるように、HF1およびMACがRPE-脈絡膜界面に同時分布すること、ならびにこれらの沈着物がAMDの前歴を有するドナーからの眼においてより強固であることを実証する。最後に、HF1およびC5b-9免疫反応性は、同じ眼からのより末梢の位置と比較して、黄斑においてより強い。これらの知見のすべては、AMD病理が黄斑において主として現れるという事実と一致し、ブルー膜のレベルにおける補体活性化が、ドルーゼンの形成のプロセスにおける主要な要素であり、ならびにAMDの病因に寄与する因子であるという結論と一致する(Hagemanら、2001; Andersonら、2002)。

10

【0340】

RPE-脈絡膜界面におけるHF1の分布は、C5b-9のそれと著しく類似しており、有意な量のMACが生成され、RPE-脈絡膜界面に沈着されることを暗示する。このことは、アットリスクHF1ハプロタイプと関連するタンパク質が、補体活性化を減弱するその正常な能力の減少を受ける可能性があることを示唆する。従って、AMDと関連するHF1変異体は、RPEおよび脈絡膜細胞を、代替経路媒介補体攻撃の持続的なリスク、ドルーゼン形成、および後期段階の新生血管AMDと関連するブルー膜の完全性の破壊にさらす可能性がある。ブルー膜は、他の箇所よりも黄斑中で有意に薄いので(Chongら、2005)、これは引き続く新生血管の侵襲に対してより感受性である可能性がある。ブルー膜は末梢におけるよりも黄斑において有意に薄いので、これは、新生血管の侵襲に対して感受性である程度まで、分解される可能性がより高い。

20

【0341】

要約すると、本研究の結果は、HF1中の一般的なハプロタイプが個体をAMDに対して素因化するという強い証拠を提供する。本発明者らは、補体系を活性化する事象と組み合わせた、補体カスケードの代替経路を調節する遺伝子における変化が、ヒト集団中のAMDの多くの割合の根底にあることを示唆する。

【0342】

実施例2

補体調節遺伝子H因子(CFH)およびH因子関連5(CFHR5)における変異はI型膜性増殖性糸球体腎炎(高密度沈着疾患)と関連する

30

序論

膜性増殖性糸球体腎炎は多様な疾患であり、しばしば、病因がはっきりせず、小児および成人のネフローゼ症候群の主要な腎臓性の原因の4%および7%をそれぞれ占める(Orthら、1998)。腎臓の免疫病理学および超構造研究に基づいて、3つのサブタイプが認められている。I型およびIII型膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)は、免疫複合体媒介疾患の変種であり;対照的に、MPGNIIの免疫複合体との関連は知られていない(Appelら、2005)。

【0343】

MPGNIIは、小児におけるMPGNの症例の20%未満を占め、成人においては症例のわずかなパーセンテージのみを占めている(Orthら、1998;Habibら、1975;Habibら、1987)。両性が等しく罹患し、診断は、通常、血尿、タンパク尿、急性腎炎症候群またはネフローゼ症候群のような非特異的な所見を呈する5~15歳間の年代の小児においてなされる(Appelら、2005)。MPGNIIを有する患者の80%より多くがまた、血清C3腎炎因子(C3NeF)、C3bBbに対して指向される自己抗体、補体カスケードの代替経路のコンバーターゼについて陽性である(Schwartzら、2001)。C3NeFは、I型およびIII型MPGNを有する人の半数にも見出され、そしてまた健常個体においても見出され、MPGNIIの決定的な診断のために必要な糸球体基底膜(GBM)における高密度の沈着の電子顕微鏡的な実証を行う(Appelら、2005)。この形態学的な特徴はMPGNIIに特徴的で

40

50

あるので、この疾患はより正確には高密度沈着疾患 (MPGN II / DDD) と呼ばれる (図 12)。

【0344】

MPGN II / DDD の自発的な寛解は一般的ではない (Habibら、1975; Habibら、1987; Cameronら、1983; Barbiano di Belgiojosoら、1977)。より一般的な結果は、10年以内の診断において患者の約半数において末期の腎臓疾患 (ESRD) に導く腎機能の慢性的な低下である (Barbiano di Belgiojosoら、1977; Swainsonら、1983)。ある患者において、タンパク尿の急速な変動が、明白な誘発事象の非存在下で急性の腎臓変質のエピソードを伴って起こり; 他の患者においては、持続的なタンパク尿にも関わらず、疾患は何年間も安定したままである。

10

【0345】

C3NeFは、50%を超えるMPGN II / DDDを有する患者において疾患の経過を通して持続する (Schwertzら、2001)。その存在は、典型的には、補体活性化の証拠、例えば、C50の減少、C3の減少、C3dg / C3dの増加、および補体カスケードの代替経路の持続的に高いレベルの活性化と関連する。血清中に最も豊富な ($\sim 1.2 \text{ mg/ml}$) 補体タンパク質であるC3は、通常、チックオーバーとして知られるプロセスにおけるチオエステルの加水分解による低いレベルの連続的自己活性化を受ける。C3加水分解は、タンパク質の大きなコンホメーションの変化を誘導し、C3 (H_2O) を、C3の切断生成物であるC3bと類似にする。C3 (H_2O) はB因子と結合してC3 (H_2O) Bbを形成し、これは、C3を消費してC3bBb²を産生する増幅ループ中でC3をC3bに切断する (図 13)。

20

【0346】

MPGN II / DDDにおいては、C3NeFはC3bBb (またはアセンブルしたコンバーゼ) に結合して、この酵素の半減期を延長し、C3bBbおよび補体活性化のレベルを制御するための正常な調節メカニズムを圧倒する持続的なC3消費を生じる (Appelら、2005)。正常な制御は少なくとも7種のタンパク質を含み、その4種は血清中に存在し (補体H因子 (CFH)、補体H因子様タンパク質1 (CFHL1)、補体I因子 (CFI) およびC4結合タンパク質 (C4BP))、その3種は細胞膜結合型 (膜コファクタータンパク質 (MCP、CD46)、分解促進因子 (DAF、CD55) および補体受容体1 (CR1、CD35)) である (Appelら、2005; Meriら、1994; Pascualら、1994)。

30

【0347】

MPGN II / DDDと特に関連があるものはH因子であり、これはH因子ファミリーにおける7つのタンパク質の1つである。ブタおよびマウスにおいては、その欠損は、光学顕微鏡または電子顕微鏡のレベルにおいてMPGN II / DDDに類似する腎臓疾患の発症と関連し、ヒトにおいては、その欠損ならびにH因子遺伝子の突然変異は、MPGN II / DDDを有する患者において報告されてきた (Meriら、1994; Dragen-Dureyら、2004; Zipfelら、2005) (図 14)。

40

【0348】

H因子ファミリーの他の6種のメンバーには、H因子のスプライシングアイソフォームであるFHL1、および別個の遺伝子 (CFHR1~5) によってコードされる5種のCFH関連タンパク質が含まれる。後者の5種のタンパク質についてはほとんど知られていないが、これらは、H因子に対する種々の程度の構造類似性を示す (Appelら、2005)。MPGN II / DDDに関連して、この群の中で最も興味深いものはCFHR5である。なぜなら、これは、H因子に対して最高の類似性を示し、かつ他の型の糸球体腎炎を有する患者の腎生検において実証されたからである (Appelら、2005; Murphyら、2002)。インビトロ研究はまた、Vが、補体攻撃に曝される表面上に存在することを示し、補体カスケードにおける考えられる役割を示唆する (Murphyら、2002)。

50

【0349】

Factor H / C F H R 5 と M P G N I I / D D D との間の可能性のある関係は、M P G N I I / D D D を有する患者がドルーゼンと呼ばれる眼表現型を発症するという観察によってさらに強化される。ドルーゼンは、網膜色素上皮の下目のブルー膜の中の網膜における異常な細胞外沈着物の沈着から生じる。M P G N I I / D D D のドルーゼンは、高齢者の視力障害の最も一般的な型である加齢性黄斑変性 (A M D) (K l e i n ら、2004; v a n L e e u w e n ら、2003) における型のドルーゼンと、臨床的かつ組成的に区別不可能である (M u l l i n s ら、2001; A n d e r s o n ら、2002)。これらの2つの型のドルーゼンを区別する唯一の特徴は、発症の年齢であり、M P G N I I / D D D におけるドルーゼンは早期に、しばしば、10歳代において発症するのに対して、A M D におけるドルーゼンは高齢者において見出される。

10

【0350】

4つの最近の研究は、因子の特異的アレル変異体をA M D と関連付けており、補体の代替経路のH因子媒介調節におけるかすかな違いが、A M D の症例のかなりの割合において役割を果たし得ることを示唆する (H a g e m a n ら、2005; E d w a r d s ら、2005; H a i n e s ら、2005; K l e i n ら、2005)。これらの研究の1つはまた、M P G N I I / D D D 患者およびA M D 患者が、同じH因子リスクアレルのいくつかを分離することを示した (H a g e m a n ら、2005)。本研究において、本発明者は、H因子およびC F H R 5 のアレルの変異の、M P G N I I / D D D との関連を絞り込むことを追求した。

20

【0351】

材料および方法

患者および対照。生検で判明したM P G N I I / D D D を有する患者は、腎臓病学部門において確認され、I R B 認可ガイドラインの下で本研究に加入させた。対照群は、眼科的試験によってA M D が除外された、民族的に適合させられたが、年齢が一致しない、血縁関係のないヒトから確認した。

【0352】

変異のスクリーニングおよび分析。H因子およびC F H R 5 のコード領域および隣接するイントロン領域を、94 変性、61 アニーリングおよび70 伸長における各々30秒間の35サイクルでP C R 増幅した。H因子およびC F H R 5 のコード配列を増幅するために使用したプライマーの配列は、表10および11にそれぞれ示す。産物の生成は、アガロースゲル電気泳動によって確認し、次いで、M P G N I I / D D D を有する患者におけるアンプリコンを二方向的に配列決定した。データマイニング (E n s e m b l e d a t a b a s e , d b S N P , A p p l i e d B i o s y s t e m s) を通して同定したすべての新規なおよび報告されたS N P を、変性高速液体クロマトグラフィー (D H P L C) によって、対照集団中で型決定した (表9および10)。手短に述べると、各アンプリコンのD H P L C 分析は、3つの異なる温度で実施した。アンプリコンは、W a v e m a k e r ソフトウェアを使用して分析し、最適温度、実行時間およびアセトニトリル勾配を見積もった。予測温度は+/-2 で括弧書きし、感度を最適化し、新規な突然変異が検出される確率を最大化した (P r a s a d ら、2004)。

30

40

【0353】

ハプロタイプ分析。ハプロタイプの分布を有するブロック構造の構築は、t h e W h i t e h e a d I n s t i t u t e において開発された公的に利用可能なソフトウェアプログラムであるH a p l o v i e w (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (B a r r e t t らを参照のこと) を使用して完成した。1つは各対照の性別および遺伝子型からなり、他方はS N P 同定および染色体位置を含むマーカー情報を記載する2つのデータセットを、エクセルファイル中で同じにし、これをH a p l o v i e w プログラムにアップロードした。出力は、連鎖不均衡 (L D) プロットおよび交叉のパーセンテージを伴う対応する集団の頻度からなった。

【0354】

50

統計学的分析。カイ二乗独立性検定を、M P G N I I / D D D を有する患者と対照との間の S N P 頻度の違いを検出するために使用した。P 値 0 . 0 5 を有意と見なした。H 因子および C F H R 5 についての L D プロットは対照集団を使用して作製した。

【 0 3 5 5 】

結果

患者および対照。生検で判明した M P G N I I / D D D を有する 2 2 例の患者および 1 3 1 例の A M D を有しない人を本研究に参加させた。対照群の平均年齢は 7 8 . 4 歳であり、A M D を除外するための本発明者らの確認判断基準を反映した。

【 0 3 5 6 】

H 因子、C F H R 5 および M P G N I I / D D D 。 M P G N I I / D D D 患者群および対照集団において遺伝子型決定した 7 つの H 因子 S N P のうちの 4 つのアレル頻度が、 $p < 0 . 0 5$ で M P G N I I / D D D 疾患表現型との有意な関連を示した。これらの S N P は、エキソン 2 1 6 2 V、I V S 2 - 1 8 i n s T T、エキソン 9 Y 4 0 2 H およびエキソン 1 0 A 4 7 3 A を含んだ。エキソン 7 A 3 0 7 A、エキソン 1 3 Q 6 7 2 Q およびエキソン 1 8 D 9 3 6 E についてのアレル頻度は、群間で有意な違いはなかった (表 1 1 ~ 1 3)。

【 0 3 5 7 】

1 つの非同義語 S N P (エキソン 2 P 4 6 S) 2 つのプロモーター S N P (- 2 4 9 T > C、- 2 0 T > C) および 2 つのイントロン S N P (I V S 1 + 7 5 T > A、I V S 2 + 5 8 C > T) を含む、5 つの C F H R 5 S N P を、M P G N I I / D D D 患者群および対照集団において遺伝子型決定した。3 つの S N P - エキソン 2 P 4 6 S、- 2 4 9 T > C および - 2 0 T > C - のアレル頻度は、 $p < 0 . 0 5$ で群間で有意な違いがあった (表 1 4 および 1 5)。

【 0 3 5 8 】

ハプロブロック。ハプロタイプブロックは、A 3 0 7 A および Y 4 0 2 H が H 因子において連鎖不均衡にあるのに対し、- 2 4 9 T > C および - 2 0 T > C は C F H R 5 において連鎖不均衡にあることを示した (図 1 5)。

【 0 3 5 9 】

考察

補体の代替経路は、病原体から人を防御するための洗練された系を表す。その中心的な成分である C 3 は、血漿中で高濃度で循環し、体液全体に分配される (Walport、2001)。その活性化は、外来性の表面を損傷させる毒性の局所的環境を作製し、微生物の除去を生じる。制限されない補体活性化を妨害するために、宿主細胞および組織表面は、表面結合および膜結合の補体の調節因子の組み合わせを使用して、増幅ループをダウンレギュレートする。ある宿主細胞は高コピー数で単一の補体の膜結合調節因子を発現するのに対して、他の細胞は、いくつかの膜結合調節因子を発現し、また可溶性流体相調節因子を結合する。いくつかの組織は膜結合調節因子を欠き、可溶性調節因子の結合のみに依存している (Appelら、2005)。

【 0 3 6 0 】

腎臓においては、内皮細胞およびメサンギウム細胞が、2 種の膜結合の補体の調節因子、M C P および D A F を発現する (van den Dobbelsteenら、1994; Timmermanら、1996)。有足細胞は 4 種：M C P、D A F、C R 1 および C D 5 9 を発現する。メサンギウム細胞と有足細胞の両方はまた、可溶性調節因子、H 因子を分泌し、これは、補体活性化および炎症にตอบสนองして、膜性腎症においてアップレギュレートされる (Angakuら、1998; Baoら、2002)。H 因子は、分泌メサンギウム細胞および有足細胞に直接的に結合することによって、オートクリン様式で作用する。

【 0 3 6 1 】

G B M は、対照的に独特である。これは、補体媒介損傷からこれを防御するための内因性膜結合調節因子を欠くが、その高度に負に荷電した表面は H 因子を結合しかつ吸収する

10

20

30

40

50

(Zipfelら、2005)。局所的補体制御のためのH因子へのGBMの依存性は、MPGNII/DDDを有する数人の人のH因子における病理学的突然変異の知見と一貫している(Aultら、1997; Dragen-Dureyら、2004)。

【0362】

MPGNII/DDDと関連しているH因子およびCFHR5のいくつかのアレル変異体を同定する本発明者らのデータは、補体制御がこの疾患の病因において役割を果たすという仮説と一致している。報告されたAMDのデータと、本発明者らのデータの比較は、さらなる裏付けを加える。本発明者らがH因子において観察した同定されたアットリスクSNP変異体の各々についてのアレル頻度は、AMD患者コホートにおいてよりも、MPGNII/DDD患者コホートにおいてより高く、強力な証拠がAMD中でH因子を関係付ける(Hagemanら、2005; Edwardsら、2005; Hainesら、2005; Kleinら、2005)。H因子のエキソン2および9のアミノ酸変化が機能に影響を与えるか否かは未知であるが、これらの変化は、C3bおよびヘパリンと相互作用するドメイン中に見出され、C3b/C3dおよびヘパリンの結合における違いは、別の腎臓疾患、非定型的溶血性尿毒症性症候群と関連するH因子のいくつかのアミノ酸変化を用いて実証された。(Manuelianら、2003)(表12および13)。

【0363】

H因子を例外として、H因子関連ファミリーの他のメンバーの機能は大部分が未知であり、それらの発現パターンは探索されていないが、CFHR5の研究は、これがヘパリン、CRPおよびC3b結合を含む、H因子に類似する特性を有することを示した(Murphyら、2002)(図14)。この類似性は、H因子と同様に、CFHR5がMPGNII/DDDにおいて役割を果たすことを示唆する。これは、MPGNII/DDDを有する2例の患者からの腎生検におけるCFHR5発現の本発明者らの知見と一致する(データ示さず)。

【0364】

本発明者らの遺伝子型決定データは、CFHR5のいくつかのアレル変異体が、MPGNII/DDD疾患表現型と優先的に関連することを示す。CFHR5のプロモーター領域中に2つのSNPが含まれ、これらは、1つはC/EBP β についての結合部位を除去することによって、他方はGATA-1結合部位を加えることによって、転写に影響を与え得る。他の有意な関連は、エキソン2におけるプロリンをセリンに変化する。CFHR5のエキソン1および2は、ヘパリンおよびCRP結合のために完全である、H因子の短いコンセンサスリピート6(SCR6)に対して相同なドメインをコードするので、この変化は、補体の活性化および制御に影響を与え得る。

【0365】

実施例3

H因子タンパク質の防御型の産生

例示的な防御型のヒト補体H因子(CFH)を、ハプロタイプH2に基づいて調製した(図5)。手短に述べると、RNAは、4例のドナーの眼組織(RPE/脈絡膜複合体)から単離した。RNAは、以下のプライマーを使用して、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅した：

5' - GAAGATTGCAATGAACCTTCCTCCAAG - 3' [配列番号331]

5' - AAGTTCTGAATAAAGGTGTGC - 3' [配列番号332]

RT-PCR反応は、製造業者(Invitrogen, Carlsbad, CA)によって記載されるように、Superscript III One-Step High Fidelity with Platinum Taqを使用して実施した。適切なサイズの産物(3,769bp)をアガロースゲルから切り出し、スピンカラムを使用して単離した。

【0366】

PCR産物を、製造業者(Invitrogen)によって推奨されるように、TOP

O-TAクローニングシステムを使用して、ベクターpCR2.1-TOPOにクローニングした。4例の各々の患者に由来するクローンの完全な遺伝子配列を、直接的配列決定によって決定した。1例の患者(患者番号498-01)に由来するDNAは、例示的な保護的参照配列(H2)のそれと比較して、最も少ない数のヌクレオチド多型を有したが、このDNAは、402位のアミノ酸(ヒスチジン)のリスク配列をコードし、62位のアミノ酸にバリンをコードしていた。防御型のCFHをコードする遺伝子を調製するために、本発明者らは、QuickChange Mutagenesisシステム(Stratagene, La Jolla, CA)を使用して、62位のアミノ酸をコードする塩基がイソロイシンをコードするように、402位のアミノ酸をコードする塩基がチロシンをコードするように変化させ、配列番号335を得た。このタンパク質の1210位のアミノ酸はアルギニンである。利用したオリゴヌクレオチドは以下の通りであった(および適切なアンチセンスバージョン):

62: 5' - T A T A G A T C T C T T G G A A A T A T A A T A A T G G T A T G C A G G - 3' [配列番号333]

402: 5' - A T G G A T A T A A T C A A A A T T A T G G A A G A A A G T T T G T A C - 3' [配列番号: 334]

導入した突然変異の忠実度は、遺伝子全体の直接的配列決定によって確認した。得られた防御的遺伝子は、真核生物発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)に、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下でクローニングした。この発現ベクターは、Exgen 500トランスフェクション試薬(Fermentas, Hanover, MD)を使用して、ヒト肺癌腫細胞株A549(ATCC, Manassas, VA)にトランスフェクトした。トランスフェクションに続き、細胞を無血清培地(Hybridoma-SFM, Invitrogen)中で増殖させた。

【0367】

上清をトランスフェクションの48時間後に採取し、ウェスタンブロット分析に供した。適切なサイズの産物(約150kDa)の存在を、ヒトCFHに対して指向されるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体(Quidel, San Diego, CA)を使用して確認した。

患者番号498-01(62I、402Y)CFH遺伝子[配列番号335]

【0368】

10

20

30

【化 3】

AGTTAGCTGGTAAATGTCCTCTTAAAAGATCCAAAAATGAGACTTCTAG
CAAAGATTATTTGCCTTATGTTATGGGCTATTTGTGTAGCAGAAGATTGC
AATGAACCTTCCTCCAAGAAGAAATACAGAAATTCTGACAGGTTCTGGTC
TGACCAAACATATCCAGAAGGCACCCAGGCTATCTATAAATGCCGCCCTG
GATATAGATCTCTTGGAAATATAATAATGGTATGCAGGAAGGGAGAATGG
GTTGCTCTTAATCCATTAAGGAAATGTCAGAAAAGGCCCTGTGGACATCC
TGGAGATACTCCTTTTGGTACTTTTACCCTTACAGGAGGAAATGTGTTTG
AATATGGTGTAAGCTGTGTATACATGTAATGAGGGGTATCAATTGCTA
GGTGAGATTAATTACCGTGAATGTGACACAGATGGATGGACCAATGATAT
TCCTATATGTGAAGTTGTGAAGTGTTACCAGTGACAGCACCAGAGAATG
GAAAAATTGTCAGTAGTGCAATGGAACCAGATCGGGAATACCATTTTGG
CAAGCAGTACGGTTTGTATGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAAGGAGATGA
AGAAATGCATTGTTTCAGACGATGGTTTTGGAGTAAAGAGAAACCAAAGT
GTGTGGAAATTTTCATGCAAATCCCCAGATGTTATAAATGGATCTCCTATA
TCTCAGAAGATTATTTATAAGGAGAATGAACGATTTCAATATAAATGTAA
CATGGGTTATGAATACAGTGAAAGAGGAGATGCTGTATGCACTGAATCTG
GATGGCGTCCGTTGCCTTCATGTGAAGAAAAATCATGTGATAATCCTTAT
ATTCCAAATGGTGACTACTCACCTTTAAGGATTAAACACAGAACTGGAGA
TGAAATCACGTACCAGTGTAGAAATGGTTTTTATCCTGCAACCCGGGGAA
ATACAGCAAATGCACAAGTACTGGCTGGATACCTGCTCCGAGATGTACC
TTGAAACCTTGTGATTATCCAGACATTAAACATGGAGGTCTATATCATGA
GAATATGCGTAGACCATACTTTCCAGTAGCTGTAGGAAAATATTACTCCT
ATTACTGTGATGAACATTTTGAGACTCCGTCAGGAAGTTACTGGGATCAC
ATTCATTGCACACAAGATGGATGGTCGCCAGCAGTACCATGCCTCAGAAA
ATGTTATTTTCCTTATTTGGAAATGGATATAATCAAATTTATGGAAGAA
AGTTTGTACAGGGTAAATCTATAGACGTTGCCTGCCATCCTGGCTACGCT
CTTCCAAAAGCGCAGACCACAGTTACATGTATGGAGAATGGCTGGTCTCC
TACTCCCAGATGCATCCGTGTCAAACATGTTCCAAATCAAGTATAGATA
TTGAGAATGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATATGCCTTAAAAGAA
AAAGCGAAATATCAATGCAAACCTAGGATATGTAACAGCAGATGGTGAAAC
ATCAGGATCAATTACATGTGGGAAAGATGGATGGTCAGCTCAACCCACGT
GCATTAAATCTTGTGATATCCCAGTATTTATGAATGCCAGAACTAAAAAT
GACTTCACATGGTTTAAAGCTGAATGACACATTGGACTATGAATGCCATGA
TGGTTATGAAAGCAATACTGGAAGCACCCTGGTTCCATAGTGTGTGGTT
ACAATGGTTGGTCTGATTTACCCATATGTTATGAAAGAGAATGCGAACTT

10

20

30

【 0 3 6 9 】

【化 4】

CCTAAAATAGATGTACACTTAGTTCCTGATCGCAAGAAAGACCAGTATAA
AGTTGGAGAGGTGTTGAAATTCCTGCAAACCAGGATTTACAATAGTTG
GACCTAATTCGGTTCAGTGCTACCACTTTGGATTGTCTCCTGACCTCCCA
ATATGTAAAGAGCAAGTACAATCATGTGGTCCACCTCCTGAACTCCTCAA
TGGGAATGTTAAGGAAAAACGAAAGAAGAATATGGACACAGTGAAGTGG
TGAATATTATTGCAATCCTAGATTTCTAATGAAGGGACCTAATAAAATT
CAATGTGTTGATGGAGAGTGGACAACCTTACCAGTGTGTATTGTGGAGGA
GAGTACCTGTGGAGATATACCTGAACTTGAACATGGCTGGGCCAGCTTT
CTTCCCCTCCTTATTACTATGGAGATTGAGTGAATTCAATTGCTCAGAA
TCATTTACAATGATTGGACACAGATCAATTACGTGTATTGAGGATG
GACCAACTTCCCCAGTGTGTGGCAATAGATAAACTTAAGAAGTGCAAT
CATCAAAATTAATTATACTTGAGGAACATTTAAAAACAAGAAGGAATTC
GATCATAATTCTAACATAAGGTACAGATGTAGAGGAAAAGAAGGATGGAT
ACACACAGTCTGCATAAATGGAAGATGGGATCCAGAAGTGAAGTGTCAA
TGGCACAAATACAATTATGCCACCTCCACCTCAGATTCCTCAATTCTCAC
AATATGACAACCACTGAATTATCGGGATGGAGAAAAAGTATCTGTTCT
TTGCCAAGAAAATTATCTAATTCAGGAAGGAGAAGAAATTACATGCAAAG
ATGGAAGATGGCAGTCAATACCACTCTGTGTTGAAAAAATTCATGTTCA
CAACCACCTCAGATAGAACACGGAACCATTAATTCATCCAGGTCTTCACA
AGAAAGTTATGCACATGGGACTAAATTGAGTTATACTTGTGAGGGTGGTT
TCAGGATATCTGAAGAAAATGAAACAACATGCTACATGGGAAAATGGAGT
TCTCCACCTCAGTGTGAAGGCCTTCCTTGTAAATCTCCACCTGAGATTC
TCATGGTGTGTAGCTCACATGTCAGACAGTTATCAGTATGGAGAAGAAG
TTACGTACAAATGTTTTGAAGGTTTTGGAATTGATGGGCCTGCAATTGCA
AAATGCTTAGGAGAAAAATGGTCTCACCTCCATCATGCATAAAAACAGA
TTGTCTCAGTTTACCTAGCTTTGAAAATGCCATACCCATGGGAGAGAAGA
AGGATGTGTATAAGGCGGGTGAGCAAGTGAAGTACACTTGTGCAACATAT
TACAAAATGGATGGAGCCAGTAATGTAACATGCATTAATAGCAGATGGAC
AGGAAGGCCAACATGCAGAGACACCTCCTGTGTGAATCCGCCCACAGTAC
AAAATGCTTATATAGTGTGAGACAGATGAGTAAATATCCATCTGGTGAG
AGAGTACGTTATCAATGTAGGAGCCCTTATGAAATGTTTGGGGATGAAGA
AGTGATGTGTTTAAATGGAACTGGACGGAACCACTCAATGCAAAGATT
CTACAGGAAAATGTGGGCCCCCTCCACCTATTGACAAATGGGGACATTACT
TCATTCCTGTTGTCAGTATATGCTCCAGCTTCATCAGTTGAGTATCAATG
CCAGAACTTGTATCAACTTGAGGGTAACAAGCGAATAACATGTAGAAATG
GACAAATGGTCAGAACCAACAAAATGCTTACATCCGTGTGTAATATCCCGA
GAAATTATGGAAAATTATAACATAGCATTAAGGTGGACAGCCAAACAGAA
GCTTTATTCGAGAACAGGTGAATCAGTTGAATTTGTGTGTAAACGGGGAT
ATCGTCTTTCATCACGTTCTCACACATTGCGAACAACATGTTGGGATGGG
AACTGGAGTATCCAACCTTGTGCAAAAAGATAGAATCAATCATAAAGTGC
ACACCTTTATTCAGAACTT

10

20

30

【 0 3 7 0 】

【表 1 A】

表 1A

dbSNP 番号	位置	多型に及ぶ配列	配列 番号	アミノ 酸 変化	アレル頻度、対照	アレル頻度、AMD	カイ2およびP値
rs3753394	7' DE-9- 1	GGGTTTCTGGGATGTAAT [A/G] ATGTTTCAGTCTTTTGACCTT CCCCAAGACCCCTACATTA [T/C] TACAGTCACAAACTGGAA	9		1-0.944 : 2-0.056	1-0.96 : 2-0.04	
rs3753394	7' DE-9- 4	TTATGAAATCCAGAGGATAT [C/T] ACCAGCTGCTGATTTGCACA AATACTTTAGTCTCTCTATA [G/A] TGGTCCAGGACTAAACGTGT	10		1-0.31 : 2-0.69	1-0.25 : 2-0.75	6.485 : 0.039
rs529825	1' H/D 1	AGTCCAAAGTTACAGCTAC [G/A] APAGATTACCATTTGCCAA TCAGGTTCAAAATGCTGCTCAG [C/T] TATCTGAATGGSTAAACGTT	11		1-0.74 : 2-0.26	1-0.84 : 2-0.16	26.07 : 2.18E-06
rs800292	1' H/D 2	GATATGATCTCTCTGGAAAT [G/A] TAATAATGGTATGCCAGGAAG CTATATCTAGAGAACCTTTA [C/T] ATTATTAACCTATAGTCTCTTC	12	162V	1-0.78 : 2-0.22	1-0.91 : 2-0.09	16.19 : 5.74E-05
	1' H/D 2	TAATTCATTAACCTTTTCTTTT [-/TT] CGTTTTCAGAAAGGCCCTGTG ATTAAAGTATTGAAAAAARAA [-/AA] GCRAAATCTTTCCGGGACAC	13		1-0.77 : 2-0.23	1-0.89 : 2-0.11	22.19 : 2.47E-06
rs3766404	1' H/D 6	AAAGGATACATTTAGGACT [C/T] ATTGGAAGTTAGTGTCAACA TTTCCTTATGTAAATCCCTGA [G/A] TAAACTCATCATCAGTTGT	14		1-0.83 : 2-0.17	1-0.91 : 2-0.09	23.82 : 6.71E-06
rs1061147	1' H/D 7	CAACCCGGGAAATACAGC [A/C] AAATGCAAGTACTGGCTG GTTGGGCCCTTTATCTCG [T/G] TTTACGTTCTCATGACCGAC	15	A307A	1-0.34 : 2-0.66	1-0.59 : 2-0.41	50.39 : 1.26E-12
rs1061170	1' H/D 9	AAATGGATATATTCATAAT [T/C] ATGGAAGAAAGTTTGTACAG TTTACCTATATTAAGTTTA [A/G] TACCTTCTTTTCAAAACATGTC	16	Y402H	1-0.66 : 2-0.34	1-0.46 : 2-0.54	55.20 : 1.03E-12
rs2274700	1' H/D 10	TATGCCCTTAAAGAAAGG [G/A] AAATATCAATGCCAACTAGG ATACGGAAATTTCTTTTTCG [C/T] TTTATAGTACGTTGTATCC	17	A47SA	1-0.54 : 2-0.46	1-0.80 : 2-0.20	36.48 : 1.55E-09
	1' H/D 10A	CAGCTTCAGTGGATCAAGA [-/N] TCACAAGGGCCATGGAACC GTGGAATCTACCTAGTTTCT [-/N] ACTGTTCCGGTTACCTTGG	18		1-1.00 : 2-0.00	1-0.933 : 2-0.067	
rs203674	1' H/D 10	ACGGTACCTATTTTATAGTA [G/T] ATCTATATCAATTAAGCTTTT TGCCATGGATTAATAATCAT [C/A] TAGATAGTTATTTCCGAAA	19		1-0.66 : 2-0.34	1-0.44 : 2-0.56	66.97 : 2.86E-15
rs203674	1' H/D 10*	AAAAGCTTTATGTATTAGAT [A/C] TACTAATAAATAGTACCGT	63		1-0.66 : 2-0.34	1-0.44 : 2-0.56	66.97 : 2.86E-15
rs3753396	1' H/D 13	AAGGACCTAATAAATTTCA [A/G] TCTGTTGATGGAGCTGGAC TTCCCTGGATTTATTTAAGT [T/C] ACACACTACCTCTCCTCG	20	Q672Q	1-0.84 : 2-0.16	1-0.86 : 2-0.14	0.308 : 0.579
rs375046	1' H/D 15	TTTTTATTTTATTTATATA [-/C] ATTAATATATATTTTAAATAT AAAAATAAATAAATAATTT [G/T] TAAATTAATAAATAATTAATA	21		1-0.67 : 2-0.31	1-0.85 : 2-0.14	
rs1065489	1' H/D 18	CCTTGTAAATCTCCACCTGA [G/T] ATTTCTCATGCTGTGTGAGC GGACATTTAGAGGTGGACT [C/A] TAAAGGTACCAACAACATCG	22	D936E	1-0.87 : 2-0.13	1-0.85 : 2-0.15	0.165 : 0.694
	1' H/D 22	GGGGAATACGCTTTTCATCA [C/T] GTTCTCACACATTTGGACAA CCCTATAGCAGAAAGTAGT [G/A] CAAAGGTGCTGTAAGCTTGT	23	R1210C	1-1.00 : 2-0.00	1-0.95 : 2-0.05	

(*) ゲノム配列の非コード領域を示す

【 0 3 7 1 】

10

20

30

40

【表 1 B】

表 1B

SNP 名	置換配列	配列番号	変異位置	位置	AA
rs3753394	AAATCCAGAGGATATTC/TACAGCTGCTGATTT	24	C	7 位	
rs529825	AATGGTAAGTCTATTC/TGACTGTGTAACCTT	25	T	1 位	
rs800292	TGCATACCATTAATTAATTC/TATTCAGAGATCT	26	T	2 位	I 62V
rs3766404	ACATACATTAATCATAAC/TCTTTTTCGTTTAG	27	C	2 位	
rs1061147	CCGGGGAATACAGC/CATAATGACACAGTACT	28	A	6 位	A307A
rs1061170	GGATAAATCAAAATTC/TATGGAAGAAAGTTTG	29	T	7 位	Y402H
rs2274700	CTTAAAGAAAGAGCG/AAATATCATATGCAAA	30	G	9 位	A473A
rs203674	CTTATGATTAGATG/TACTAATAAATAGGT	31	A	10 位	
rs3753396	ACCTAATAAAATTCAG/GTGTGATGGAGAG	32	A	10 位	
rs1065488	TAAATCTCCACCTGA/GTATTTCTCATGGTGT	33	G	13 位	Q672Q
		34	G	18 位	D936E

(1)

(2)

SNP 名	749-1777-749-または AOD 番号	配列番号	変異位置	位置	配列番号
rs3753394	C 2530387 10				
rs529825	C 2250476 10				
rs800292	C 2530382 10				
rs3766404	ACTTGTTCCTCCCTCTAC	35	CCTCTTTCTGATGGACTAC		36
rs1061147	C 1189065 10				
rs1061170	TGAAATCAGTACCGAGTGAGAAATGG	37	CAGGTATCCAGCCAGTACTTGT		38
rs2274700	CTTATTTATCATGTTATGCTCTAGGAAATGTTATTT	39	GGCAGGCAACGCTATAGATTACG		40
rs203674	TCACCATCTGCTGTACATATCTTAGT	41	TGGGTTTATTTCTGAATCTCAGTATACATATGC		42
rs3753396	C 2530311 10				
rs1065488	C 2530296 10				
	C 2530274 10				

(3)

SNP 名	VIC 749-7	配列番号	FAM 749-7	配列番号
rs1061147	AATACAGCAAAATGC	43	ATACAGCCAAATGC	46
rs1061170	TTCTTCCATGATTTTG	44	TTCTTCCATGATTTTG	47
rs2274700	AAGAAAAAGCGAAATAT	45	AAGAAAAAGCAAAATAT	48

【 0 3 7 2 】

10

20

30

40

【表 1 C】

表 1C

位置	多型に及び配列	アミノ酸位置	配列番号
エキソン 2	CCAGGCTATCTATAAATGCC [G/A] CCCTGGATATAGATCTCTTG	R53H	49
エキソン 3	TTGGTACTTTTACCCCTTACA [G/T] GAGGAAATGTGTTTGAATAT	G100R	50
エキソン 5	ACGATGGTTTTGGAGTAA[G/G ^{ではない}]JAGAAACCAAAGTGTTGGGT	201	51
エキソン 6	TTATTTATAAGGAGAAATGAA [C/C ^{ではない}]GATTTCAATATAAATGTAAC	R232X	52
エキソン 6	CACTGAATCTGGATGGCGTC [C/C ^{ではない}]GTTGCCTTCATGTGAAG (終了 エキソン 6)	258	53
エキソン 8	AAGATGGATGGTCGCCAGCA [G/C] [-/C] TACCATGCCCTCA (終了 エキソン 8)	V383L	54
エキソン 16	ACAATTATGCCCCACCTCCAC [C/G] TCAGATCCCAATTCACACA	815	55
エキソン 17	CAACCACCTCAGATAGAACA [C/T] GGAACCATTAATTCATCCAG	H878H	56
エキソン 17	GTCTTCACAAGAAAGTTATG [C/T] ACATGGGACTAAATTGAGTT	A892V	57
エキソン 18	CACATGTCAGACAGTTATCA [G/T] TATGGAGAAGAAGTTACGTA	Q950H	58
エキソン 18	TCAGTATGGAGAAGAAGTTA [C/T] GTACAAATGTTTTGAAGTT	S956L	59
イントロン 18	(開始 IVS18) GTATGG [G/T] GCATTGAAATTTTATTATATG		60
エキソン 20	(開始 エキソン 20) ACACCTCCTGTGTG [A/T] ATCCGCCCCACAGTACAAAAT	N1050Y	61
エキソン 21	CTTGTATCAACTTGAGGGTA [-/N] A [-/N] CAAGCGAATAACATGTAGAAA	1147	62

【 0 3 7 3 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

AMD 症例および対照における HF1 SNP のハプロタイプ分析

プロモーター	IVS1	162V	IVS6	Y402H	IVS10	Q672Q	D936E	OR 見極もり	P	症例	対照
C	C	C	T	C	C	A	G	2.67	<0.000001	0.49	0.28
G	G	C	G	T	A	A	G	0.48	<0.000011	0.06	0.12
C	T	T	T	T	A	A	G	0.63	0.00035	0.12	0.18
C	C	C	T	C	A	A	G	2.88		0.49	0.26
G	G	C	T	T	A	A	G	0.50		0.06	0.12
G	T	T	T	T	A	A	G	0.62		0.12	0.18
C	C	C	T	C	A	A	G	2.65		0.49	0.26
G	G	C	T	T	A	A	G	0.50		0.06	0.12
C	T	T	T	T	A	A	G	0.6		0.12	0.18
C	C	C	T	C	A	A	G	2.56		0.49	0.27
G	G	C	T	T	A	A	G	0.49		0.06	0.12
G	T	T	T	T	A	A	G	0.6		0.12	0.19
C	C	C	T	C	A	A	G	2.33		0.51	0.31
G	G	C	T	T	A	A	G	0.51		0.06	0.12
C	T	T	T	T	A	A	G	0.56		0.13	0.21
C	C	C	T	C	A	A	G	2.54		0.51	0.29
G	G	C	T	T	A	A	G	0.48		0.07	0.14
T	T	T	T	T	A	A	G	0.58		0.12	0.19
C	C	C	T	C	A	A	G	2.55		0.51	0.29
G	G	C	T	T	A	A	G	0.48		0.07	0.14
T	T	T	T	T	A	A	G	0.58		0.12	0.19
C	C	C	T	C	A	A	G	2.46		0.51	0.30
G	G	C	T	T	A	A	G	0.47		0.07	0.14
T	T	T	T	T	A	A	G	0.56		0.12	0.20
C	C	C	T	C	A	A	G	2.47		0.51	0.30
G	G	C	T	T	A	A	G	0.48		0.07	0.14
T	T	T	T	T	A	A	G	0.55		0.12	0.20
C	C	C	T	C	A	A	G	2.12		0.75	0.60
G	G	C	T	T	A	A	G	0.51		0.08	0.14
T	T	T	T	T	A	A	G	0.53		0.13	0.21
C	C	C	T	C	A	A	G	2.49		0.52	0.30
G	G	C	T	T	A	A	G	0.45		0.23	0.47
T	T	T	T	T	A	A	G	0.58		0.12	0.19

【 0 3 7 4 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

rs3753394 プロモーター	rs529825 4bp	rs3766404 4bp	rs203674 4bp	rs3753396 5bp	rs1065489 5bp	ハプロタイプ	頻度、対照	頻度、AMD
1	1	1	2	1	1	111211	0.28436	0.478059
1	2	1	1	1	1	121111	0.210856	0.131313
2	1	1	1	2	2	211122	0.149247	0.126697
1	1	2	1	1	1	112111	0.129893	0.061917
2	1	1	1	1	1	211111	0.094861	0.07125
2	1	1	2	1	1	212111	0.046438	0.06834
1	2	2	1	1	1	122111	0.026677	0.014859
2	1	2	1	1	1	212111	0.012731	0.01473
1	1	1	1	1	1	111111	0.012686	0.007305
1	2	1	2	1	1	121211	0.012684	0.004723
1	2	1	1	2	2	121122	0.009249	0.000945
1	1	1	1	2	2	111122	0.007487	0.008705
2	1	2	1	2	1	212121	0.002049	0.000488
1	2	2	2	1	1	122111	0.00078	0.000488
2	1	2	1	2	2	212122	0.000001	0.002175
2	1	1	2	1	2	211212	0.001869	0.001869
2	1	1	1	1	2	211112	0.00169	0.00169
2	2	1	1	1	1	221111	0.001061	0.001061
2	1	2	2	1	2	212211	0.00096	0.00096
1	2	1	2	2	2	121222	0.00095	0.00095
1	1	2	1	1	2	112112	0.00095	0.00095
2	1	1	1	2	1	211121	0.00069	0.00069
2	1	2	2	1	2	212212	0.000322	0.000322
2	2	1	2	1	1	221211	0.000001	0.000001
1	2	2	1	1	2	122112		

【 0 3 7 5 】

10

20

30

【表 4】

表 4

HFI SNP の加齢性黄斑変性との関連

	プロモーター rs3753394	エキソン 2		エキソン 6		エキソン 7/9		エキソン 10		エキソン 13		エキソン 18	
		IVS1 rs529825	IVS2 insTT	IVS6 rs3768404	IVS10 rs203674	A307AY402H A473A	A307AY402H A473A	A473A	rs203674	Q672Q	Q672Q	D936E	D936E
アイオワ	対照数	68	126	131	68	129	67	129	67	129	67	129	67
	症例数	228	390	404	221	404	223	404	223	404	223	404	223
	X ²	15	22.21	49.4	35.14	49.4	0.64	0.21	0.64	0.21	0.64	0.8	0.64
	P	0.000108	2.44X10 ⁻⁰⁶	2.09X10 ⁻¹²	3.07X10 ⁻⁰⁹	2.09X10 ⁻¹²	0.8	0.65	0.8	0.65	0.8	0.89	0.8
	OR	2.79	2.38	2.82	3.42	2.82	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	0.89	1.12
コロンビア	対照数	1.67-4.65	1.65-3.44	2.11-3.78	2.27-5.16	2.11-3.78	0.76-1.64	0.76-1.64	0.76-1.64	0.76-1.64	0.76-1.64	0.51-1.56	0.51-1.56
	症例数	261	273	271	264	272	264	264	264	265	265	264	264
	X ²	546	549	546	542	549	545	545	545	545	545	536	536
	P	36.12	28.4	23.04	66.1	54.4	66.1	66.1	66.1	2.05	2.05	0.53	0.53
	OR	3.21X10 ⁻⁰⁷	9.87X10 ⁻⁰⁸	1.59X10 ⁻⁰⁶	1.60X10 ⁻¹¹	1.64X10 ⁻¹³	4.29X10 ⁻¹⁶	4.29X10 ⁻¹⁶	4.29X10 ⁻¹⁶	0.15	0.15	0.46	0.46
各 SNP からのアレル 1 およびアレル 2 の頻度は、症例と対照との間で比較し、 Yates のイ 2 乗 (X ²) および P 値をオッズ比 (OR) および 95% 信頼区間 (95% CI) とともに計算した。各遺伝子型の実際のカウントは表 6 A ~ 6 C に示す。	対照数	1.51-2.52	1.57-2.63	1.56-2.85	1.69-2.61	1.79-2.75	1.97-3.03	1.97-3.03	1.97-3.03	0.937-1.65	0.937-1.65	0.846-1.49	0.846-1.49
	症例数	2.042	2.042	2.105	2.10	2.25	2.44	2.44	2.44	1.24	1.24	1.12	1.12
	X ²	1.95	2.042	2.105	1.69-2.61	1.79-2.75	1.97-3.03	1.97-3.03	1.97-3.03	0.937-1.65	0.937-1.65	0.846-1.49	0.846-1.49
	P	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
	OR	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01

各 SNP からのアレル 1 およびアレル 2 の頻度は、症例と対照との間で比較し、 Yates のイ 2 乗 (X²) および P 値をオッズ比 (OR) および 95% 信頼区間 (95% CI) とともに計算した。各遺伝子型の実際のカウントは表 6 A ~ 6 C に示す。

【表 5】

表 5

SSCP, DHPLC および配列決定プライマー

エクソン	領域	フォワードプライマー (5'-3')	配列番号	リバースプライマー (5'-3')	配列番号
1	5' 上流 -int1	GCAAAAGTTTCTGATAGGC	64	AATCTTACCTTCTGCTACAC	65
2	int1-int2	TTAGATAGACCTGTGACTG	66	TCAGGCATAATTGCTAC	67
3	int2-int3	ACTTGTTCCTCCACTC	68	CCTCTTTTCGTATGGACTAC	69
	int2-ex3	TTGTTCCCCCACTCCTAC	70	ACACATTTCTCCTGTAAAGG	71
	ex3-int3	CCCTGTGGACATCCTGG	72	AACCTCTTTTCGTATGGACTAC	73
4	int3-ex4	ATGCTGTTTCATTTTCC	74	CCATCCATCTGTGTCAC	75
	ex4-int4	ATTACCGTGAATGTGAC	76	TTGTATGAGAAAAAAAAC	77
5	int4-int5	TCCAATCTATCCTGAGG	78	TCTTACCCACACACTTTG	79
6	int5-ex6	GTCCTGGTCACAGTCC	80	GCATACAGCATCTCCTC	81
	ex6-int6	GCACTGAATCTGGATG	82	ATGAACCTTGAACACAG	83
7	int6-ex7	CGGATACTTATTTCTGC	84	CGTGATTTCATCTCCAG	85
	ex7-int7	AGAAGTGGAGATGAAATC	86	TGAATGGAACCTACAGG	87
8	int7-ex8	GTGAAACCTTGTGATTATC	88	TCCCAGTAACTTCCTG	89
	ex8-int8	CTGTGATGAACATTTGAG	90	TGCTCTCCTTTCTTCG	91
9	int8-int9	CATTGTTATGGTCTTAGG	92	ACATGCTAGGATTTACAGAG	93
10	int9-ex9	CTTTTCTTATTTCTTCCC	94	TCACCATCTGCTGTTAC	95
	ex9-int10	TGTAACAGCAGATGGTG	96	CCCACAAAAAGACTAAAG	97
11	int10-ex11	GGGAAATACTCAGATTG	98	ATGGCATTTCATAGTCC	99
	ex11-int11	CCAGAACTAAAAATGACTTC	100	GGTAAATCAGACCAACC	101
	ex11-int11	ATAGTGTGTGTTACAATG	102	GTTTATGTCAAATCAGGAG	103
12	int11-int12	CAAGAAAGAGAATGCGAAC	104	AGATTACAGGCAATGGG	105
13	int12-ex13	TTGATTGTTTAGGATGC	106	TTGAGGAGTTCAGGAGGTGG	107
	ex13-int13	CTGAACTCCTCAATGG	108	ATTACCAATACACACTGG	109
14	int13-int14	TTACATAGTGGAGGAGAG	110	TGGAAATGTTGAGGC	111
15	int14-int15	AGTTGGTTTGATTCCTATC	112	TTGAGCAGTTCACCTCTG	113
16	int15-ex16	TTATGCCACCTCCAC	114	ATACACTACTGACCAACAC	115
	ex16-int16	GTCTATGAGAATACAAGCC	116	GAATCTGAGGTGGAGG	117
17	int16-ex17	CCCTTTGATTTTCATTC	118	AGAACTCCATTTTCCC	119
	ex17-int17	CACAACCACTCAGATAG	120	GCCTAACCTTCACACTG	121
18	int17-ex18	GTCATAGTAGCTCCTGTATTG	122	ACGTAACCTCTCTCCATAC	123
	ex18-int18	CTTCCITGTAAATCTCCAC	124	CAATGCACCATACTTATGC	125
19	int18-ex19	TAAAGATTTGCGGAAC	126	GGCTCCATCCATTTTG	127
	ex19-int19	TTACAAAATGGATGGAG	128	AAGTGCTGGGATTACAGGCG	129
20	int19-ex20	CTACTCAAAATGAACACTAGG	130	TTAACCCCTGCTATACTCC	131
	ex20-int20	TAAATGGAACTGGACG	132	ACCCTATTACTTGTGTTCTG	133
21	int20-int21	GTGTTTGCGTTTGCC	134	GAGATTTTCCAGCCAC	135
22	int21-ex22	TCTCACACATTGCGAAC	136	ACCGTTAGTTTCCAGG	137
	ex22-3' 下流	GGTTTGGATAGTGTTTTGAG	138	ATGTTGTTCCGAATGTG	139

【 0 3 7 7 】

【表 6 - 1】

表 6

コホート 1	プロテクト	rs3753394	イントロ 1	IVS1	rs529825	イントロ 2	rs800292	イントロ 2	IVS2	insTT
コホート 2										
合計										
頻度、7/11										
頻度、7/12										
AMD 関連										
加2乗値										
カント、7/11										
カント、7/12										
Yates χ^2 値										
OR/95%CI										
コホート 2										
合計										
頻度、7/11										
頻度、7/12										
カント、7/11										
カント、7/12										
Yates χ^2 値										
OR/95%CI										

【 0 3 7 8 】

10

20

30

40

【表 6 - 2】

表 6 (続き I)

コホート 1	イントロ 6	IVS6	rs378644	イキソ 7/9	A307A/ Y402H	rs1061147/ rs1061170	イキソ 7	A307A	rs1061147	イキソ 9	Y402H	rs1061170
合計 頻度、7レバ1 頻度、7レバ2 AMD 関連				AA/CC AC/CT CC/TT A/C C/T	CON 16 56 59 131 0.34 0.66 X2 50.4 2.82 88 174 48.4 2.82	AMD 146 183 75 404 0.59 0.41 P 1.2593E-12 475 333 2.08746E-12 2.11-3.78	AA AC CC A C	CON 16 56 59 131 0.34 0.66 X2 50.4 2.82 88 174 48.4 2.82	AMD 146 183 75 404 0.59 0.41 P 1.2593E-12 475 333 2.08746E-12 2.11-3.78	CC CT TT C T	CON 16 56 59 131 0.34 0.66 X2 50.4 2.82 88 174 48.4 2.82	AMD 146 183 75 404 0.59 0.41 P 1.2593E-12 475 333 2.08746E-12 2.11-3.78
コホート 2 合計 頻度、7レバ1 頻度、7レバ2	11 TT 12 CT 22 CC T C	CON 186 76 9 271 0.83 0.17	全 AMD 452 88 5 546 0.91 0.09		CON 16 56 59 131 0.34 0.66 X2 50.4 2.82 88 174 48.4 2.82	AMD 146 183 75 404 0.59 0.41 P 1.2593E-12 475 333 2.08746E-12 2.11-3.78	CC AC AA C A	CON 120 109 33 262 0.67 0.33	全 AMD 114 275 158 547 0.46 0.54	TT CT CC T C	CON 122 113 37 272 0.66 0.34	全 AMD 118 271 160 549 0.46 0.54
カウント、7レバ1 カウント、7レバ2 Yates χ^2 /P 値 OR/95%CI		23.82449569 448 94 23.04 2.105	6.70774E-06 993 99 1.58668E-06 1.66-2.85									55.198 38 357 187 54.4 2.25

【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

【表 7】

表 7

AMDを有するかまたは有しない種々の民族群におけるアットリスクアレルの頻度

ラスカワ・ロワイ	ラパ・ヌイ	コロンビア対照	ヒスパニック	アフリカ対照	アフリカ対照	コロンビア症例	ヨーロッパ系 アメリカ人	アフリカ症例	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

アットリスクハプロタイプの頻度は、Y402H変異
体およびまたはIVS10遺伝子座の遺伝子型から
の異なる集団からのサンプル中で累積もった。
これらには以下が含まれる：65歳を超えたラバヌイ
ネイティブ（AMDは、このイースター島集団におい
ては極度にまれであり、存在しない可能性が高い
）、コロンビア大学からの対照（年齢>65歳）、ヒ
スパニック一般集団、アイオワ大学からの対照（年齢
>65歳）、アフリカ系アメリカ人一般集団、コロン
ビア大学からのAMD症例、ヨーロッパ系アメリ
カ一般集団、アイオワ大学からのAMD症例、およびM
PGNIIを有する個体。N=個体数。

【 0 3 8 1 】

10

20

30

40

【表 8】

表 8

H因子ディプロタイプ

	I62V	IVS2-18	Y402H	D936E	IVS20
リスク	GG	SS	CC	GG	TT
防御的	AA	LL	TT	GG	CC
防御的	AA	LL	CT	GG	CC
	AA	LL	TT	GG	CC
	AA	LL	TT	GT	TT
	AA	LL	TT	GT	CC
	AA	LS	CT	GG	CC
	AA	SS	CC	GG	TT
	GA	LS	CT	GG	TT
	GA	LS	CT	GG	CT
	GA	LS	CT	GG	CC
	GA	LS	CT	GG	CC
防御的	GA	LS	CT	GT	CT
	GA	LS	TT	GG	CT
	GA	LS	TT	GG	CC
	GA	LS	TT	GG	TT
	GA	LS	TT	GT	CC
	GA	LS	TT	TT	CC
	GA	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	TT	GT	TT
	GG	SS	TT	TT	CT
リスク	GG	LL	TT	GG	TT
	GG	SS	CC	GG	TT
	GG	SS	CT	GG	CT
	GG	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GG	CC
	GG	SS	CT	GT	TT
	GG	SS	CT	GT	CT
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	CT	GT	CC
	GG	SS	CT	TT	CT
リスク	GG	SS	TT	GG	TT
	GG	SS	TT	GG	CT
	GG	SS	TT	GT	TT
	GG	SS	TT	GT	CT
	GG	SS	TT	GT	GT
	GG	SS	TT	GT	CC
	GG	SS	TT	TT	CT
	GG	SS	TT	TT	CC
	GG	SS	CC	GG	TT
	GG	SS	CT	GG	TT
	GG	SS	CT	GT	CC

10

20

30

40

G、A、T、Cは示される多型におけるヌクレオチドをいう。S、Lはイントロン2多型の短いアレルおよび長いアレル（2つのTヌクレオチドの挿入）をいう。

【0382】

【表 9】

表 9

H 因子コード配列を増幅するために使用されるプライマー

エキソン	フォワード	配列番号	リバース	配列番号
1	TGGGAAGTGCAGTGAGAATTG	140	GCTAATGATGCTTTTCACAGGA	141
2	CCTGTGACTGTCTAGGCATTTT	142	TATGCCTGAATTATATCACTATTGCC	143
3	GCTTTGCTATGTTTAATTTTCCTT	144	AACTATGATGGAAATAATTAAATCTGG	145
4	TGCATATGCTGTTTCATTTTC	146	GTCTTACATTAAAATATCTTAAAGTCTC	147
5	TTCCTCCAATCTTATCCTGAG	148	CGTTTCACTTAAGGAATATCAGCA	149
6	CCTGATGGAAACAACATTTCG	150	AACAGGGCCAGAAAAGTTCA	151
7	TGTTTCATTTTAATGCCATTTTG	152	AGTTTTCGAAGTTGCCGAAA	153
8	CCTAGAAACCCTAATGGAATGTG	154	TGTTCAAGCAAAGTGACCAAAA	155
9	TGAGCAAATTTATGTTTCTCATT	156	ATGTCACCTTGTTTTACCAATGG	157
10	TGAATGCTTATGGTTATCCAGGT	158	AAAACCTGCAGGAACAAAGC	159
11	TCTTAGAATGGGAAATACTCAGATTG	160	TGGTTTTTCAGAAATTCATTTTCA	161
12	ATGTAAAATTAACCTTGGCAATGA	162	TTGCTGAAATAAGAATTAGAATTG	163
13	TGAATAAAAGAAGAAAATCTTTCCA	164	ATCTAAAACACATACATCATGTTTCA	165
14	AAAACACATACATCATGTTTTCACAA	166	GATATGCCTCAACATTTCCAGTC	167
15	GTGGTTTGATTTCCTATCATTG	168	TTGGAAAAGTAATAGGTATGTGTGTC	169
16	CTATGAGAATACAAGCCAAAAGTTC	170	TCTCTTGCTTCGTGTAAACAA	171
17	AACCCCTTTGATTTTCAITCTTCA	172	TCAAAGTGAGGGGAATAATTGA	173
18	AATTTATGAGTTAGTGAAACCTGAAT	174	TCTTCATTCAAAGTGTAAGTGGTACC	175
19	ACAAAATGGCTAATATATTTTCTCAAG	176	TAATGTGTGGGCCAGCC	177
20	CAAAATGAACACTAGGTGGAACC	178	ATTTTGGGGGAGTATAGCAGG	179
21	CTGTGTTTGCCTTTCCTTA	180	TTCACGTGGCTGGAAAAATC	181
22	TTGAAAACCTGAAAGTCTATGAAGA	182	TCAATCATAAAGTGCACACCTTT	183

【0383】

【表 10】

表 10

CFHR5 コード配列を増幅するために使用されるプライマー

エキソン	フォワード	配列番号	リバース	配列番号
1	CAGTCCCATTCTGATTGTTCCA	184	GCTGAGGATAATTGAAGGGG	185
2	GTGATTTCATCGATGTAGCTCTTT	186	AATGACCAGAGGAGCCTGGAA	187
3	TGATGTCAGTTTCAAAAGTTTCC	188	ACCACTCTCTCAGTTTTGCTAATTAT	189
4	CACATTAATTTGTTTCTGCAATGA	190	AGAAAGTGATGAAACAAGAATTGA	191
5	CCATTTAAGCATTATTTATGGTTTC	192	AAACAGGACAGTTACTATTACTTTGCA	193
6	AAATATTTTCAGAGTAAGCACTCATTT	194	TTATCATTTTGATTGGGATTGT	195
7	TGCAGATATTTATTGACATAATTGTT	196	GTTGATCTTGTTGCTTCTTTACAAGA	197
8	CCATTTTCTGAAACACTACCC	198	TCTGTTGCACTGTACCCCAA	199
9	AATTATTTGAATTTCCAGACACCTT	200	TTTGGACTAATTCATAGAATAACCC	201
10	CTTAAATGCAATTTCACTATTCTATGA	202	TAGCCATTATGTAGCC	203

【0384】

【表 12】

表 12

対照に対する22例のMPGNII患者における
H因子SNP頻度の比較
(f1およびf2として与えられるアレル頻度)

SNP	f1 MPGNII	f2 MPGNII	f1 対照	f2 対照	P-値
エクソン 2 I62V	42 (G)	2 (A)	202 (G)	60 (A)	0.0051
IVS2 -18insTT	42 (短)	2 (長)	194 (短)	68 (長)	0.0018
エクソン 7 A307A	16 (C)	28 (A)	88 (A)	174 (C)	0.72
エクソン 9 Y402H	28 (H)	16 (Y)	88 (H)	174 (Y)	0.00014
エクソン 10 A473A	40 (G)	4 (A)	74 (G)	62 (A)	0.000013
エクソン 13 Q672Q	35 (A)	9 (G)	217 (A)	41 (G)	0.45
エクソン 18 D936E	35 (D)	9 (E)	115 (D)	19 (E)	0.32

10

【0386】

【表 13】

表 13

20

MPGNIIと関連するコードSNPおよびH因子
の関連する短いコンセンサスリピート (SCR)

SNP	SCR	SCR の機能
エクソン 2 I62V	1	C3b との相互作用
エクソン 9 Y402H	7	ヘパリン結合 C反応性タンパク質との相互作用
エクソン 10 A473A	8	C反応性タンパク質との相互作用

30

【0387】

【表 1 4】

表 14

MPGNII で分離する、22例の患者における CFHR5 SNP
(アレル頻度 (f1 および f2) および遺伝子型に
よる患者の数を示す)

	7例患者 -249T>C rs9427661	7例患者 -20T>C rs9427662	IVS1	75T>A rs3748557	IVS2	P46S rs12097550	IVS2	58C>T rs12097550
1	TT	TT	TT	16	CC	19	CC	16
2	TC	TC	TA	5	CT	3	CT	5
3	CC	CC	AA	1	TT	0	TT	1
4				.84T		.93P		.84C
5				.16A		.07S		.16T
6	f1							
7	f2							
8	7例患者の合計	T	T	T	C	C	C	C
MPGN2-02	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-03	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-07	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-09	T,T	T,T	A,T	A,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-10	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-11	T,T	T,T	A,T	A,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-12	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-13	T,T	T,T	A,T	A,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-14	T,T	T,T	A,A	A,A	C,C	C,T	T,T	T,T
MPGN2-15	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-16	C,T	C,T	A,T	A,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-17	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,T	C,T
MPGN2-18	T,T	T,T	A,T	A,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-19	T,T	T,T	T,T	T,T	C,T	C,C	C,C	C,C
MPGN2-20	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-21	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-22	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-23	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-24	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-27-2	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-29	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C
MPGN2-30	T,T	T,T	T,T	T,T	C,C	C,C	C,C	C,C

10

20

30

40

【表 15】

表 15

対照に対する22例のMPGN II患者におけるCFHR5 SNP頻度の比較
(f1およびf2として与えられるアレル頻度)

SNP	f1 MPGN II	f2 MPGN II	f1 対照	f2 対照	P-値
プロモーター -249T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28 (A)	0.033
プロモーター -20T>C	43 (T)	1 (C)	178 (G)	28 (A)	0.033
IVS1 +75T>A	37 (T)	7 (A)	161 (A)	41 (C)	0.38
エクソン 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

10

【0389】

【表 16 - 1】

表 16A

SNP 名	位置	グループ			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
rs3753394	7'側-4	5'-TCTGGGATGTAATAATG-3'	204	5'-TCTGGGATGTAATGATG-3'	205
		5'-GAACATTATTACATCC-3'	206	5'-GAACATCATACATCCC-3'	207
		5'-CAGAGGATATCACCAGC-3'	208	5'-CAGAGGATATTACCAGC-3'	209
		5'-AGCAGCTGGTGATATCC-3'	210	5'-AGCAGCTGGTAATATCC-3'	211
rs529825	1'側-1	5'-TACACAGTACGATAGAC-3'	212	5'-TACACAGTACAATAGAC-3'	213
		5'-TAAAGTCTATCGTACTGT-3'	214	5'-TAAAGTCTATTGTACTGT-3'	215
rs800292	1'側-2	5'-TCTTGGAAATGTAATAA-3'	216	5'-TCTTGGAAATATAATAA-3'	217
		5'-ACCATTTATTACATTTCC-3'	218	5'-ACCATTTATTATATTTCC-3'	219
rs3766404	1'側-2	5'-TTTTTTTTTTCGTTTTAG-3'	220	5'-TTTTTTTTTTTCGTTTT-3'	221
		5'-CTTTCTAAACGAAAAA-3'	222	5'-TTCTAAACGAAAAAAA-3'	223
		5'-TTTAGGACTCAATTGAA-3'	224	5'-TTTAGGACTTAATTGAA-3'	225
		5'-TAACTTCAAAATGAGTCC-3'	226	5'-TAACTTCAAAATAAGTCC-3'	227
rs1061147	1'側-7	5'-GAAATACAGCAAAATGCG-3'	228	5'-GAAATACAGCCAAATGCG-3'	229
		5'-ACTTGTGTCATTTTGTG-3'	230	5'-ACTTGTGCAITTTGGCTG-3'	231
rs1061170	1'側-9	5'-TAAATCAAAATTTATGGAA-3'	232	5'-TAAATCAAAATCATGGAA-3'	233
		5'-TTTCTTCCATAAATTTTG-3'	234	5'-TTTCTTCCATGATTTTG-3'	235
rs2274700	1'側-10	5'-AAGAAAAAGCGAAATAT-3'	236	5'-AAGAAAAAGCAAAATAT-3'	237
		5'-TTGATATTTCGCTTTT-3'	238	5'-TTGATATTTTTCCTTTT-3'	239
	1'側-10A	5'-GGATCAAAAGA[-]TGACAA-3'	240	5'-GGATCAAAAGAN]TGACAA-3'	241
		5'-GCCCTTGTCA[-]TCTTTG-3'	242	5'-GCCCTTGTCA[N]TCTTTG-3'	243
rs203674	1'側-10	5'-TTTATTAGTAGATCTAA-3'	244	5'-TTTATTAGTATATCTAA-3'	245
		5'-TTGATTAGATCTACTAA-3'	246	5'-TTGATTAGATATACTAA-3'	247
rs3753396	1'側-13	5'-ATAAAAATTCAGTGTGTT-3'	248	5'-ATAAAAATTCAGTGTGTT-3'	249
		5'-CCATCAACACATTTGAAT-3'	250	5'-CCATCAACACACTGAAT-3'	251
rs375046	1'側-15	5'-TTTATTATAACATTAAAT-3'	252	5'-TTTATTATAAAATTAAT-3'	253
		5'-TATAAATTAATGTTATAA-3'	254	5'-TATAAATTAATTTTATAA-3'	255

【表 1 6 - 2】

SNP 名	位置	グループ			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
rs1065489	147718	5'-CTCCACCTGAGATTCT-3'	256	5'-CTCCACCTGATATTCT-3'	257
		5'-CATGAGAGAAATCTCAGGT-3'	258	5'-CATGAGAGAAATATCAGGT-3'	259
		5'-TCTTTTCATCACGTTCTC-3'	260	5'-TCTTTTCATCATGTTCTC-3'	261
	147722	5'-GTGTGAGAACGTGATGA-3'	262	5'-GTGTGAGAACATGATGA-3'	263

表 1 6 A (続き)

【表 16 - 3】

表 16B

プライマー							
SNP 名	位置	参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号		
rs3753394	プロミナー 4	5'-TTTCTGGGATGTAATA-3' (747-1')	264	5'-TTTCTGGGATGTAATG-3' (747-1')	265		
		5'-CAAAACACACTGAACAT-3' (747-1')	266	5'-CAAAACACACTGAACATC-3' (747-1')	267		
		5'-AAATCCAGAGGATATC-3' (747-1')	268	5'-AAATCCAGAGGATAT-3' (747-1')	269		
		5'-AAATCAGCAGCTGGTG-3' (747-1')	270	5'-AAATCAGCAGCTGGTA-3' (747-1')	271		
rs529825	イントロン 1	5'-AAGTTTACACAGTACG-3' (747-1')	272	5'-AAGTTTACACAGTACA-3' (747-1')	273		
		5'-AATGGGTAAGTCTATC-3' (747-1')	274	5'-AATGGGTAAGTCTATT-3' (747-1')	275		
		5'-AGATCTCTTGGAAATG-3' (747-1')	276	5'-AGATCTCTTGGAAATA-3' (747-1')	277		
		5'-TGCATACCATTAATAC-3' (747-1')	278	5'-TGCATACCATTAAT-3' (747-1')	279		
rs800292	イントロン 2	5'-TCATAAAGCTTTTCTT-3' (747-1')	280	5'-ATAACTTTTCTTTT-3' (747-1')	281		
		5'-GGGCTTCTTCTAAACG-3' (747-1')	282	5'-GCCCTTCTAAACGAA-3' (747-1')	283		
		5'-AATACATTAAGGACTC-3' (747-1')	284	5'-AATACATTTAGGACTT-3' (747-1')	285		
		5'-ACACTAACTTCAAAATG-3' (747-1')	286	5'-ACACTAACTTCAAAATA-3' (747-1')	287		
rs1061147	エキソン 7	5'-CCGGGGAATACAGCA-3' (747-1')	288	5'-CCGGGGAATACAGCC-3' (747-1')	289		
		5'-AGTACTTGTGCATT-3' (747-1')	290	5'-AGTACTTGTGCATTG-3' (747-1')	291		
		5'-GGATATAATCAAAAT-3' (747-1')	292	5'-GGATATAATCAAAATC-3' (747-1')	293		
		5'-CAAACTTCTTCCATA-3' (747-1')	294	5'-CAAACTTCTTCCATG-3' (747-1')	295		
rs2274700	エキソン 10	5'-CTTAAAGAGAAAGCG-3' (747-1')	296	5'-CTTAAAGAGAAAGCA-3' (747-1')	297		
		5'-TTTGCATTGATATTC-3' (747-1')	298	5'-TTTGCATTGATATTT-3' (747-1')	299		
		5'-TGAGTGGATCAAAAGAT-3' (747-1')	300	5'-TGAGTGGATCAAAAGATN-3' (747-1')	301		
		5'-CATTTGGCCCTTGTCA-3' (747-1')	302	5'-CATTTGGCCCTTGTCAN-3' (747-1')	303		
rs203674	イントロン 10	5'-ACCTATTATTAGTAG-3' (747-1')	304	5'-ACCTATTATTAGTAT-3' (747-1')	305		
		5'-CTTTATTTGATTAGATC-3' (747-1')	306	5'-CTTTATTTGATTAGATA-3' (747-1')	307		
		5'-ACCTAATAAATTCAG-3' (747-1')	308	5'-ACCTAATAAATTCAG-3' (747-1')	309		
		5'-CTCTCCATCAACACAT-3' (747-1')	310	5'-CTCTCCATCAACACAC-3' (747-1')	311		
rs375046	イントロン 15	5'-TATTTTATTATAAC-3' (747-1')	312	5'-TATTTTATTATAAAA-3' (747-1')	313		
		5'-AAAAATATAATTAATG-3' (747-1')	314	5'-AAAAATATAATTAATT-3' (747-1')	315		

【表 16 - 4】

SNP 名	位置	プライマー			
		参照アレル	配列番号	変異体アレル	配列番号
rs1065489	エキソン 18	5'-TAAATCTCCACCTGAG-3' (747-1')	316	5'-TAAATCTCCACCTGAT-3' (747-1')	317
		5'-AACACCCATGAGAAATC-3' (748'-λ)	318	5'-AACACCCATGAGAAATA-3' (748'-λ)	319
		5'-TATCGTCITTCATCAC-3' (747-1')	320	5'-TATCGTCITTCATCAT-3' (747-1')	321
	エキソン 22	5'-GCAATGTGTGAGAACG-3' (748'-λ)	322	5'-GCAATGTGTGAGAACG-3' (748'-λ)	323

表 16 B (続き)

X V . 参考文献

著者および日付で引用される参考文献についての完全な引用が以下に提供される。

【 0 3 9 3 】

10

20

30

40

【化5】

[0386] 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).

[0387] Akiyama et al. "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* 2000; 21:383-421.

[0388] Allikmets et al. "Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." *Science* 1997; 277:1805-1807.

10

[0389] 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).

[0390] Ambati et al. "Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Surv Ophthalmol* 2003; 48(3):257-293.

[0391] Anderson et al. "A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye." *Am J Ophthalmol* 2002, 134:411-431.

20

[0392] Anderson et al. "Characterization of beta-amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2004; 78:243-256.

[0393] Angaku-. "Complement regulatory proteins in glomerular diseases." *Kidney Int* 1998; 54:1419-1428.

[0394] Appel et al. "Membranoproliferative glomerulonephritis type II (Dense Deposit Disease): an update." *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1392-1403.

[0395] 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.

30

[0396] 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.

[0397] Barbiano di Belgiojoso et al. "The prognostic value of some clinical and histological parameters in membranoproliferative glomerulonephritis." *Nephron* 1977;19:250-258.

[0398] Barrett et al. "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." *Bioinformatics* 2004;21:263-5.

【0394】

40

【化 6】

- [0399] Bennett et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis type 2 (dense deposit disease): Clinical features of progressive disease." *Am J Kidney Dis* 1989; 13:469-476.
- [0400] 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.
- [0401] 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. 10
- [0402] 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.
- [0403] 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. 20
- [0404] Capecchi. *Science* 1989; 244:1288-1292.
- [0405] 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).
- [0406] 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).
- [0407] 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. 30
- [0408] Compton. *Nature* 1991; 350:91-91.
- [0409] 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).
- [0410] 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.
- [0411] de Jong. "Risk profiles for ageing macular disease." *Ophthalmologia* 2004; 218 Suppl 1:5-16. 40

【 0 3 9 5 】

【化 7】

- [0412] Diamond JR, Karnovsky MJ. 1986. Nonanticoagulant Protective Effect of Heparin in Chronic Aminonucleoside Nephrosis. *Renal Physiol. Basel* 9:366-374.
- [0413] 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.
- [0414] Droz et al. "Évolution a long terme des glomérulonéphrites membranoproliférative de l'adulte: remissionspontanée durable chez 13 malades avec étude de biopsies rénales itératives dans 5 cas." *Nephrologie* 1982;3:6-11. 10
- [0415] Duvall-Young et al. "Fundus changes in (type II) mesangiocapillary glomerulonephritis stimulating drusen: a histopathological report." *Br J Ophthalmol* 1989a; 73(4):297-302.
- [0416] Duvall-Young et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: clinical and fluorescein angiographic findings." *Br J Ophthalmol* 1989b; 73(11):900-906.
- [0417] Edwards et al. "Complement factor H Polymorphism and age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:421-424. 20
- [0418] 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.
- [0419] Espinosa-Heidman et al. "Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44:3586-3592.
- [0420] 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. 30
- [0421] 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.
- [0422] Frueh et al. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(4):452-461.
- [0423] Gibbs. *Nucl Acids Res* 1989; 17:2427-2448.
- [0424] Girardi G, Redecha P, Salmon JE. 2004. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nature Medicine* 10:1222-1226. 40

【 0 3 9 6 】

【化 8】

- [0425] Girardi G. 2005. Heparin treatment in pregnancy loss: Potential therapeutic benefits beyond anticoagulation. *J. Reproduc. Immunol.* 66:45-51.
- [0426] Gold et al. "Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk." *Cancer Res* 2004; 64:8891-8900.
- [0427] Habib et al. "Dense deposit disease. A variant of membranoproliferative glomerulonephritis." *Kidney Int* 1975; 7:204-15.
- [0428] Habib et al. "Glomerular lesions in the transplanted kidney in children." *Am J Kidney Diseases* 1987;10:198-207. 10
- [0429] 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.
- [0430] Hageman et al. "Common haplotype in the complement regulatory gene, factor H (*HF1/CFH*), predisposes individuals to age-related macular degeneration." *Proc Nat Acad Sci* 2005; 102: 7227-32. 20
- [0431] 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.
- [0432] Haines et al. "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." *Science* 2005;308:419-421.
- [0433] 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).
- [0434] Houdebine, 2000, Transgenic animal bioreactors, *Transgenic Res.* 9:305-20 30
- [0435] Holers. "The complement system as a therapeutic target in autoimmunity." *Clin Immunol* 2003; 107:140.
- [0436] Holz, et al. "Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease." *Am J Ophthalmol* 2004;137:504-510.
- [0437] Huang et al. "Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis." *Retina* 2003; 23(3):429-431.
- [0438] 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. 40

【 0 3 9 7 】

【化 9】

- [0439] Jansen et al. "In situ complement activation in porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Kidney Int* 1998; 53(2):331-349.
- [0440] Johnson et al. "A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation." *Exp Eye Res* 2000; 70:441-449.
- [0441] Johnson et al. "Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age-related macular degeneration." *Exp. Eye Res.* 2001; 73:887-896.
- [0442] 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). 10
- [0443] Kinoshita. "Biology of complement: the overture." *Immunol.Today* 1991; 12:291.
- [0444] Klaver et al. "Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study." *Arch Ophthalmol* 1998a; 116:1646-1651.
- [0445] Klaver et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 1998b; 63:200-206. 20
- [0446] Klein et al. "Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q." *Arch Ophthalmol* 1998; 116:1082-1088.
- [0447] Klein et al. "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* 2005; 308:385-389.
- [0448] Klein et al. "Genetics of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin North Am* 2003; 16(4):575-582.
- [0449] Klein et al. "Prevalence of age-related maculopathy." *Ophthalmol* 1992; 99(6):933-943.
- [0450] Klein et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 2004; 137(3):504-510. 30
- [0451] Leys et al. "Subretinal neovascular membranes associated with chronic membranoproliferative glomerulonephritis type II." *Graefe's Arch Clin Exper Ophthalmol* 1990; 228:499-504.
- [0452] Lillico et al., 2005, Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov Today*. 10:191-6
- [0453] Liszewski et al. "The role of complement in autoimmunity." *Immunol Ser* 1991; 54:13.

【 0 3 9 8 】

40

【化 1 0】

- [0454] 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.
- [0455] McAvoy et al. "Retinal changes associated with type 2 glomerulonephritis." *Eye* 2005 19:985-9
- [0456] McEnery. "Membranoproliferative glomerulonephritis: The Cincinnati experience cumulative renal survival from 1957 to 1989." *J Pediatr* 1990;116:S109-S114. 10
- [0457] McRae et al. "Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein." *J Biol Chem* 2001; 276 (9):6747-6754.
- [0458] 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.
- [0459] Miller et al. "The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 138, 323-8 (2004). 20
- [0460] Morgani et al. "Complement deficiency and disease." *Immunol Today* 1991; 12:301.
- [0461] Morgan. "Regulation of the complement membrane attack pathway." *Crit Rev Immunol* 19, 173-98 (1999).
- [0462] Mullins et al. "Characterization of drusen-associated glycoconjugates." *Ophthalmology* 104, 288-94 (1997).
- [0463] 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. 30
- [0464] 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.
- [0465] Murphy et al. "Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits." *Am J Kid Dis* 2002;39:24-27.
- [0466] 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.
- [0467] Neri et al. *Adv. Nucl Acid Prot Analysis* 2000; 3826:117-125.
- [0468] Niculescu et al. "Complement activation and atherosclerosis." *Mol. Immunol.* 1999; 36:949-955. 40

【 0 3 9 9】

【化 1 1】

- [0469] Nielsen et al. *Science* 1991; 254:1497-1500.
- [0470] O'Brien et al. "Electrophysiology of type II mesangiocapillary glomerulonephritis with associated fundus abnormalities." *Br J Ophthalmol* 1993; 77:778-80.
- [0471] Orita et al. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2766-2770.
- [0472] Orth et al. The nephrotic syndrome. *New Engl J Med* 1998; 338:1202-1211.
- [0473] 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. 10
- [0474] Penfold et al. "Immunological and aetiological aspects of macular degeneration." *Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20:385-414.
- [0475] 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.
- [0476] Piatek et al. *Nat Biotechnol* 1998; 16:359-363. 20
- [0477] Pickering et al. "Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H." *Nat Genet* 2002; 31:424-428.
- [0478] 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.
- [0479] Raines et al. "Fundus changes in mesangiocapillary glomerulonephritis type II: vitreous fluorophotometry." *Br J Ophthalmol* 1989; 73:907-910.
- [0480] 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. 30
- [0481] Ripoché et al. "The complete amino acid sequence of human complement factor H." *Biochem J* 1988, 249:593-602.
- [0482] Rodriguez de Cordoba et al. "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." *Mol Immunol* 41, 355-67 (2004).

【 0 4 0 0】

40

【化 1 2】

- [0483] 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.
- [0484] 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.
- [0485] Saiki et al. *Nature* 1986; 324:163-166. 10
- [0486] 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.
- [0487] 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. 20
- [0488] 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.
- [0489] Schwertz et al. "Complement analysis in children with idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis: A long-term follow-up." *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:166-172.
- [0490] Seddon et al. "Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration." *Jama* 291, 704-10 (2004). 30
- [0491] Seddon et al. "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Ophthalmol Clin* 2004; 44:17-39.
- [0492] Sharma et al. "Biologically active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system." *Gene* 143:301-302.
- [0493] 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. 40
- [0494] Shen et al. "Ying and Yang: complement activation and regulation of Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 2003; 70(6):463-472.

【 0 4 0 1】

【化 1 3】

- [0495] 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.
- [0496] 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. 10
- [0497] 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.
- [0498] 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.
- [0499] 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. 20
- [0500] Striker GE. 1999. Therapeutic uses of heparinoids in renal disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant*. 14:540-543.
- [0501] Swainson et al. "Mesangiocapillary glomerulonephritis: A long-term study of 40 cases." *J Pathol* 1983;141:449-468.
- [0502] 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. 30
- [0503] Thelwell et al. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3752-3761.
- [0504] Timmerman et al. "Differential expression of complement components in human fetal and adult kidneys." *Kidney Int* 1996;49:730-740.
- [0505] Torzierski et al. "Processes in atherogenesis complement activation." *Atherosclerosis*. 1997; 132:131-138.
- [0506] Tuo et al. "Genetic factors in age-related macular degeneration." *Prog Retin Eye Res* 2004; 23(2):229-249.
- [0507] van den Dobbelsteen 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. 40

【0 4 0 2】

【化 1 4】

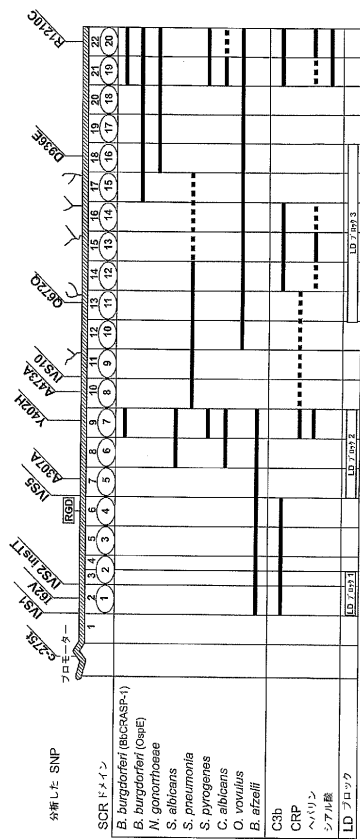
- [0508] Van Leeuwen et al. "Epidemiology of age-related macular degeneration." *Eur J Epidemiol* 2003; 18(9):845-854.
- [0509] Vingerling et al. "Epidemiology of age-related maculopathy." *Epidemiol Rev.* 1995;17(2):347-360.
- [0510] Vingerling et al. "The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study." *Ophthalmol* 1995 Feb;102(2):205-210.
- [0511] Walport. "Complement. First of two parts." *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066. 10
- [0512] Wang et al. "Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers." *Cell* 119, 831-45 (2004).
- [0513] 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.
- [0514] 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.
- [0515] 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. 20
- [0516] Zarbin. "Age Related Macular Degeneration: a review of pathogenesis." *Eur J Ophthalmol* 1998, 8:199-206.
- [0517] Zarbin. "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):598-614.
- [0518] Zipfel et al. "Complement factor H and hemolytic uremic syndrome." *Int Immunopharmacol* 1, 461-8 (2001).
- [0519] Zipfel et al. "Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases." *Biochem Soc Trans* 30, 971-8 (2002). 30
- [0520] Zipfel et al. "The role of complement in membranoproliferative glomerulonephritis." In *Complement and Kidney Disease* 2005
- [0521] Zipfel. "Complement factor H: physiology and pathophysiology." *Semin Thromb Hemost* 27, 191-9 (2001).
- [0522] Zipfel. "Hemolytic uremic syndrome: how do factor H mutants mediate endothelial damage?" *Trends Immunol* 22, 345-8 (2001). 40

本発明を特定の実施形態を参照して詳細に説明してきたが、当業者は、修飾および改良が添付の特許請求の範囲に示されるような本発明の範囲および技術思想の範囲内にあることを認識する。本明細書に引用されるすべての刊行物および特許文書は、あたかもこのような各々の刊行物または文書が参照により本明細書に援用されることが具体的にかつ個別に示されるかのように、参照により本明細書に援用される。刊行物および特許文書（特許、公開された特許出願、および非公開の特許出願）の引用は、このようないかなる文書も関連する先行技術であることの認可を意図するものではないし、これらの内容または日付に関していかなる認可の性質を有するものでもない。本発明は文書の記載によりここで説明されてきたので、当業者は、本発明が種々の実施形態において実施することが可能であること、および前述の記載が例示目的のためであり、添付の特許請求の範囲の限定ではな

いことを認識する。

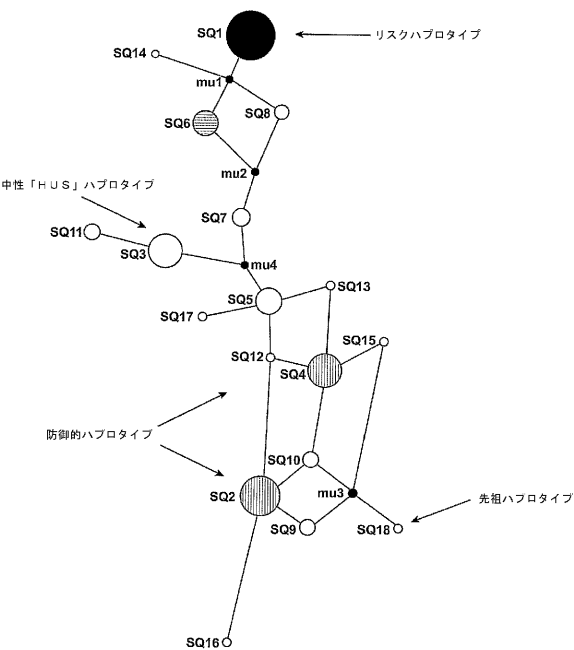
【 図 3 】

FIGURE 3



【 図 4 】

FIGURE 4



【 図 1 6 】

FIGURE 16

GGCAGGTGCTGTACTGTAAATGAAGCAGATTTAAAGCAACACCACCCTACTGGAGTATTTTAGT
 A7ATACGATTGAGACTACCAAGCATGTTGCTCTTATTCAGTGTAATCCTAATCTCATGGTATCCACTGT
 TGGGGGAGAGGACACTTTGTGATTTCCAAAAATACACCATGGATTCTGTATGATGAAGAAGATTAT
 AACCCCTTTTCCCAAGTTCCTACAGGGGAGGTTTCTATTACTCCTGTGAATATAATTTGTGTCTCCTT
 CAAAATCCTTTTGGACTCGCATAACATGCACAGAAGAAGGATGGTCACCAACACCGAAGTGTCTCAGAAAT
 GTGTCTCTTCTCTTTGTGAAAAATGGTCATTCTGAATCTTCAGGACTAATACATCTGGAAGGTGATACT
 GTACAAATTTATTTGCAACACAGGATACAGCCTTCAAAACAAAGAGAAAAACATTCTGTGTGAGAACGGG
 GGTGTCTCCTCTCTCTCTATGAGCTTCACTTAAGGAGAAATCTCATGTTCCTAATTTTGAAGAGCAATGT
 AGATCTCTGAGCCAAAAAAGAGCTACAAAGTTGGAGAGCTGTGAATTTCTCTGAGAAAAAATCTT
 ATAGAGTTGGATCAGACTCAGTTCAATGTTACCAATTTGGTGTGTCACCTAATCTTCCAACTGCAAG
 GACAAATACGATCATGTGCTCCACTCTCAACTCTCCAATGGTGAAGTTAAGAGGATAAGAAAAAGAGGA
 ATATGGACACAAATGAGTGTGGAATATGATTGCAATCCTAATTTTATAATAACGGGCTAAGAAAAATA
 CAATGTGTGGATGGAGAAATGCAACTTTACCCACTTGTGTGAACAAAGTAAAAACATGTGGATACATAC
 CTGAATCTGAGTACGGTTATGTTGAGCGCTGTGCTCTCTCTCAACATGGAGTTTCAGTCTGAGGTGA
 TTGCAAGAAATGAATGCAATGATTGGAATAACATGATTACCTGTATTAATGGAATATGGACAGAGCTT
 CCTATGTGTGTGCAACACACCAACTTAAGAGGTGCAAAATAGCAGGAGITAAATATAAAACATTAATCA
 AGCTATCTGGGAAAGAAATTAATCATATTTCTAGATACGTTACAGATGTTACAGATCTTTCAGATTACAG
 GCATCAGTCTGTATTAACGGGAAATGGAATCTGAAGTAGACTGCAACAGAAAAAGGGAACAAATTTCTG
 CCACCGCACTCAGATACCTAATGCTCAGAATATGACACACCAAGTGAATATCAGGATGGAGAAAAAG
 TAGCTGTCTCTGTAAAGAAAACTACTACTTCCAGAGCAAAAGAAATGTATGTAAAGATGGACCATG
 CAAATCATTAACACCTGTGTGAGTCTACTGCATATTTGGGCCCCCTCAATCTTTAACHAGGAGAT
 ACCACTCATTTCCATTTATCAGTATATCTCCAGGTCACAGTGAAGTACCGTTCGCACTCTCTATTA
 AACTCCAGGGCTCTGAATCTGAATGCAAGAAATAACAGTGGTGCAGAACCAAGATGCTAGATCC
 ATGTGTGTATCTGAGAAACATGAACAAAAATAACATACAGTTAAATGGAGAAACGATGGAAATCTC
 TATGCAAAACAGGGGATGCTGTGAATTCAGTGTAAATCCACATAAAGCGATGATATCATCAACAC
 CATTCGAGCAATCTGTGAGGAGGGAATTTGAATATCTATATGTGAATGAAGCAAGCATAAATTTCC
 TGAATATATCTTCAAAACATCCATCTACGCTAAAGTAGCCATTTATGTAGCAATCTCTGAGTTACTTCT
 TTTATCTCTTTCAGGTGTGTTTAACTCAGTTTATTTAGAATCTGATTTTATAGAGCTTTAGAATTTG
 TAAGCTGAGAGAACATGTTTCACTTAATAGGAGGTGCTTGTAGTCTATTTACATTTGTTATAACAGAGT
 ATCAGCAGACTGGATACTTCTAACCAATAGTTTATTTGTTTCATAAATCTAAAGCTGAGAGTCCAGA
 TGGTGGGGCTGCTCTGTTGAGGGTCTTCTCGAAGCATCATAAATATGCTGGAGGCATCACACATGCTG
 GAGGGATCAGTGGCAAAAGAGCATGTACATGGGAGTGAAGAAAAAGAGAGAGAGACAGATGSGG
 GGGGCCGGGAGAGGCCCAACTCATCTTTAAGAGACACCATCTGAGATACCAATCCATCCCATG
 ATATAGCATTAAATCCATTCAGAGAGATAGAGCTCTGCTGACTTAATCACCCTCTAAGATCTCACCTGA
 CAACTGTTGCAATGGCAGTAAAGTTTCCAGCTAAACTTTCGGGACACATTCACCAACACAGAGAAAC
 TCAATTTGTTCTGGGCAATCACACATGGGGAAATTTATCTATAAGTCCACAGAAACAGTAAATGT
 TCTGCTTCTGAACTTAAATCATCTAATCCCTCTGTTTGTCTCAAATATAGGATAACTTTGAACTTT
 CTGAATTAACGTTTATTTAAAGGAATGTAGATGTATTTAGTCTCTATCTCAGGTTATTTATCACTTA
 AAACCTTCGGAAAGCTGTCACTTTTGTGTTGTAGCAAGTATTAATAAATTTTATAAATCCTCTAATG
 TAAGTCTAGCTACCTATCCAACTAATAACCCCTTAAGTATTAATGCACTATCTGCTGTAAACGGAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

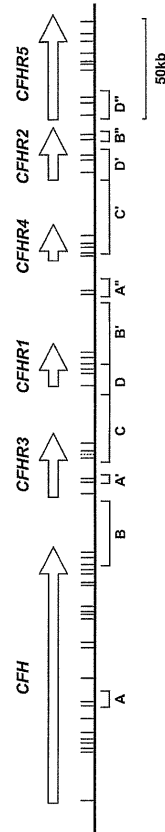
【 図 1 7 】

FIGURE 17

MLLLFSVILISWVSTVGGEGTLCDFPKIHGFLYDEEDYNPFSQVPTGEVFYYSCEYNFVSPSKSFWTRI
 TCTEEGWSPTPKLRMCSPFPVKNGHSESSGLIHLEGDVQIICNYSGLQNNKHSICVERGWSTPPIC
 SFTKGECVPILEANVDAQPKKESYKVGDLKFSCKNLIRVGSDSVQCQFQWSPNPFCKGQVRSQGP
 PPQLSNGEVKEIRKEEYGHNEVVEYDCNPNFIINGPKKIQCVDGENTLPTCQEVKTCGYIPELEYGV
 PQSVPPYQHSVVEVNCRNEYAMINNMITCINGIWTLEPMCVAHQLKRCIKIAGVNIKTLKLSGKEFN
 HNSRIRYRCSIDIFRYRHSVCINGKWNPEVDCTEKREQFPFPPIPNQNMTTTNYQDGEKVALCKEN
 YLLPEAKIIVCKDGRWQSLPRCESTAYCGPPPIINNGDTSFPLSVYPPGSTVTVYRQDSFYKLQGSVT
 TCRNKQWSEPPRCIDPCVVSEENMNKNNIQLKWRNDGLYARTGDAVEFQCKFPHKAMISSPPFRACQ
 GKFEYPICE

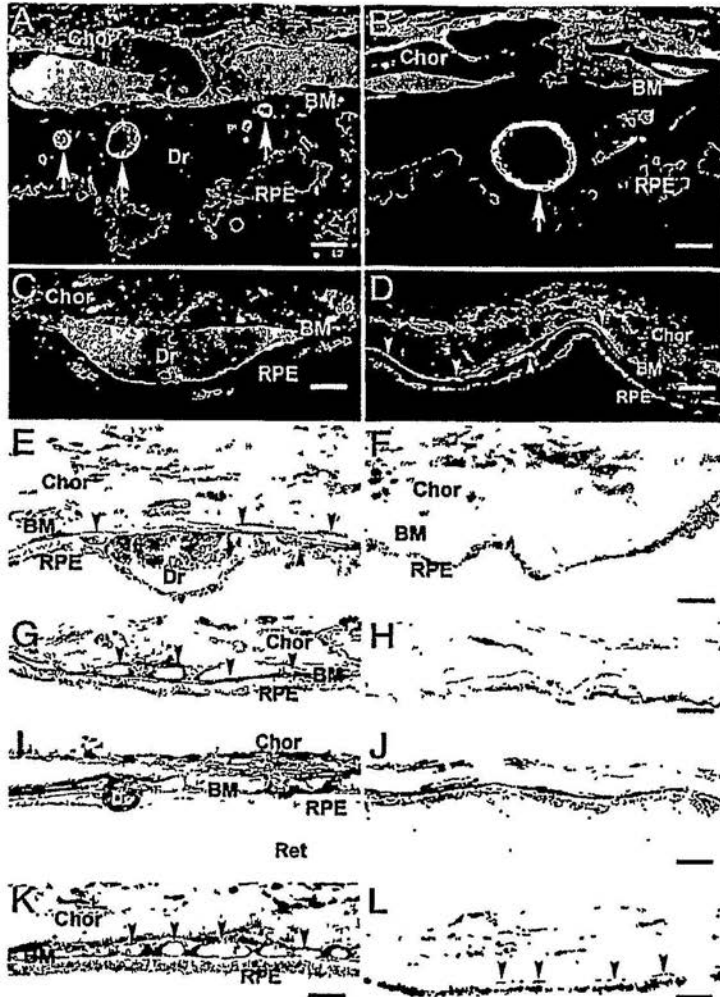
【 図 1 8 】

FIGURE 18



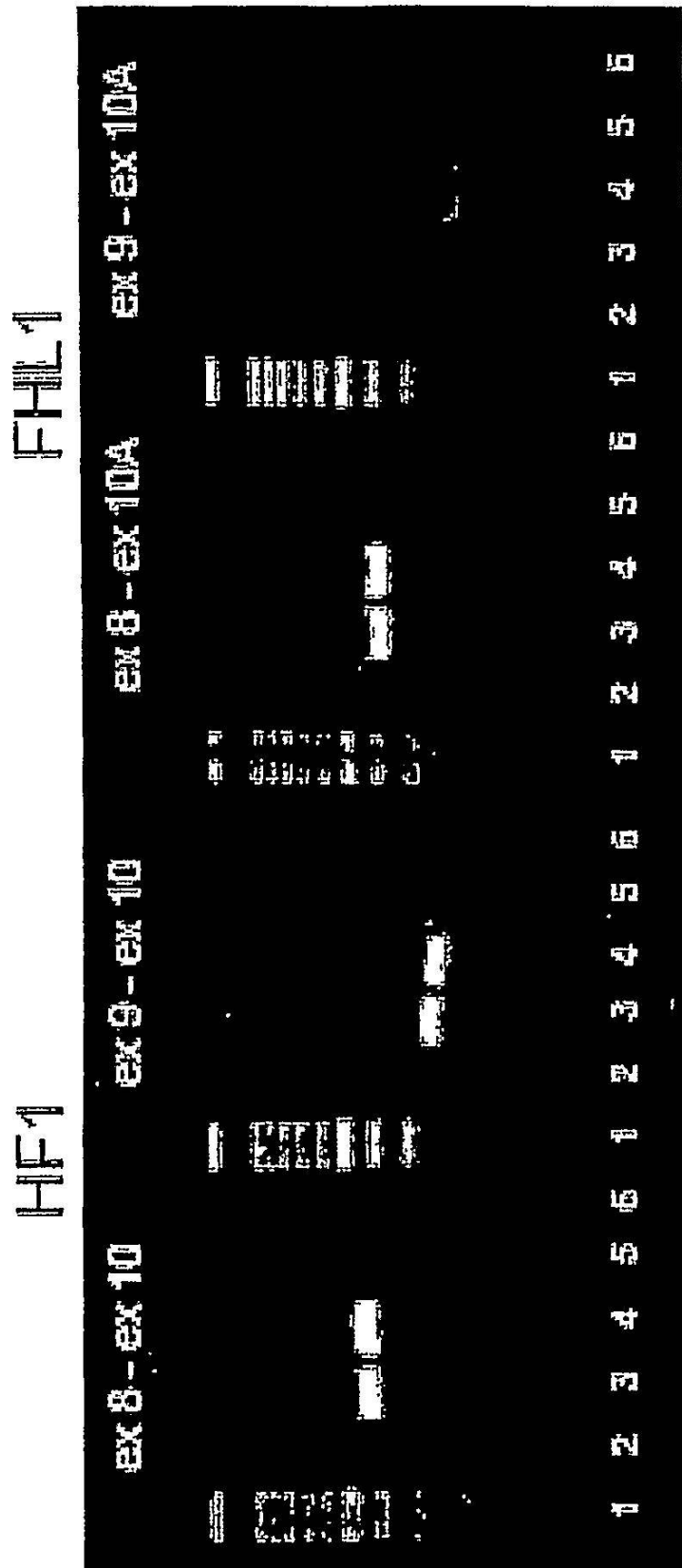
【図1】

FIGURES 1A-1L

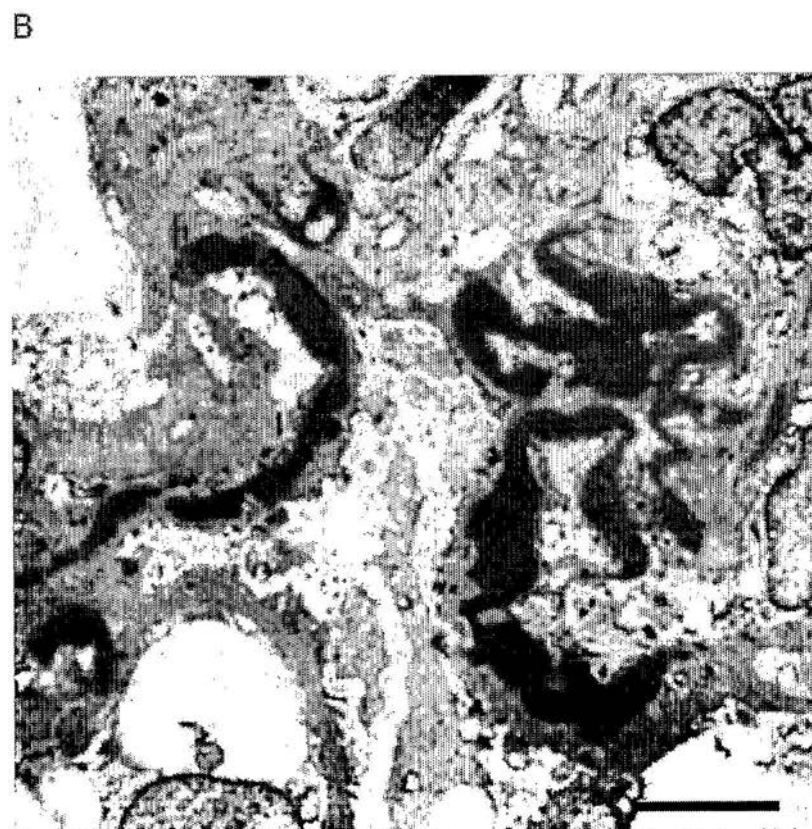
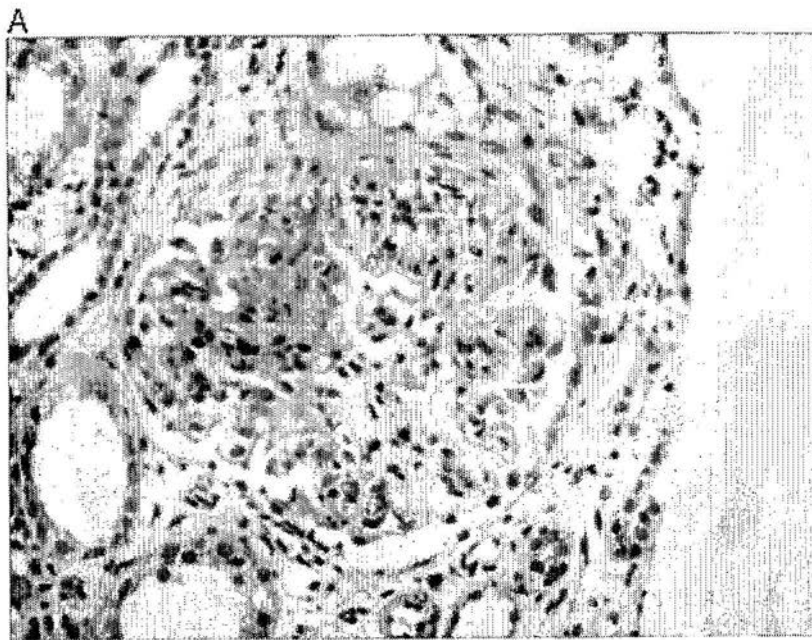


【 図 2 】

FIGURE 2



【図 12】

FIGURE 12

【配列表】

0005100901000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/717,861
(32)優先日 平成17年9月16日(2005.9.16)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/735,697
(32)優先日 平成17年11月9日(2005.11.9)
(33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

- (72)発明者 グレゴリー エス . ハイグマン
アメリカ合衆国 アイオワ 5 2 2 4 1 , コーラルビル , オーバーン ヒルズ ドライブ 5
0 0
(72)発明者 リチャード ジェイ . スミス
アメリカ合衆国 アイオワ 5 2 2 4 1 , アイオワ シティー , チェリー レーン 1 1

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第01/084149(WO, A1)
国際公開第01/006262(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	用于治疗 and 诊断年龄相关性黄斑变性的方法和试剂		
公开(公告)号	JP5100901B2	公开(公告)日	2012-12-19
申请号	JP2012049810	申请日	2012-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	衣阿华大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会大学		
当前申请(专利权)人(译)	爱荷华州研究基金会大学		
[标]发明人	グレゴリーエスハイグマン リチャードジェイスミス		
发明人	グレゴリー エス. ハイグマン リチャード ジェイ. スミス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61P13/12 A61P17/00 A61P27/00 A61P27/02 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 A61K38/1703 C07K14/435 C12Q1/6827 A61K9/0048 C07K14/47		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS36		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/653078 2005-02-14 US 60/715503 2005-09-09 US 60/717861 2005-09-16 US 60/735697 2005-11-09 US		
其他公开文献	JP2012139228A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 本发明要解决的问题作为对受试者中年龄相关性黄斑变性 (AMD) 发展的易感性的指标, 受试者的基因组被分类为补体因子H (CFH) 基因中的单倍型, 其与AMD发病的易感性降低相关。提供使用是否编码的方法。该方法包括确定编码CFH蛋白质62位的异亮氨酸的序列是否存在于受试者的基因组多态性位点rs800292, 其中单倍型的存在指示存在, 表明受试者对AMD发展的易感性降低。【选择图】无

rs17575212 rs17573867 rs16840522 rs16840465 rs16840462 rs16840422 rs16840415 rs16840410 rs16840401 rs16840397 rs16840394 rs16840381 rs16840379 rs12756364 rs12746361 rs12740961 rs12726401 rs12566539 rs12565418 rs12466047 rs12405238 rs12402808 rs12238083 rs12144939 rs12136675 rs12134973 rs12134598 rs12127759 rs12124794 rs12116702 rs12096637 rs12085209 rs12081550 rs12069060 rs12047565 rs12047106 rs12042803 rs12045503 rs12042805 rs12041668 rs12040718 rs12039605 rs12038674 rs12038333 rs12033127 rs12032372 rs12030590 rs12029785 rs12025861 rs11891183 rs11801630 rs11799956 rs11795959 rs11799380 rs11584509	rs11582939 rs11580821 rs11579439 rs11539862 rs11398897 rs11390840 rs11340441 rs11339130 rs11318544 rs11285593 rs10922109 rs10922108 rs10922107 rs10922106 rs10922105 rs10922104 rs10922103 rs10922102 rs10922101 rs10922100 rs10922099 rs10922098 rs10922097 rs10922096 rs10922095 rs10922094 rs10801556 rs10801555 rs10801554 rs10801553 rs10801552 rs10801551 rs10801550 rs10801549 rs10801548 rs10801547 rs10801546 rs10801545 rs10801544 rs10801543 rs10801542 rs10801541 rs10801540 rs10801539 rs10801538 rs10801537 rs10801536 rs10801535 rs10801534 rs10801533 rs10801532 rs10801531 rs10801530 rs10801529 rs10801528 rs10801527 rs10801526 rs10801525 rs10801524 rs10801523 rs10801522 rs10801521 rs10801520 rs10801519 rs10801518 rs10801517 rs10801516 rs10801515 rs10801514 rs10801513 rs10801512 rs10801511 rs10801510 rs10801509 rs10801508 rs10801507 rs10801506 rs10801505 rs10801504 rs10801503 rs10801502 rs10801501 rs10801500 rs10801499 rs10801498 rs10801497 rs10801496 rs10801495 rs10801494 rs10801493 rs10801492 rs10801491 rs10801490 rs10801489 rs10801488 rs10801487 rs10801486 rs10801485 rs10801484 rs10801483 rs10801482 rs10801481 rs10801480 rs10801479 rs10801478 rs10801477 rs10801476 rs10801475 rs10801474 rs10801473 rs10801472 rs10801471 rs10801470 rs10801469 rs10801468 rs10801467 rs10801466 rs10801465 rs10801464 rs10801463 rs10801462 rs10801461 rs10801460 rs10801459 rs10801458 rs10801457 rs10801456 rs10801455 rs10801454 rs10801453 rs10801452 rs10801451 rs10801450 rs10801449 rs10801448 rs10801447 rs10801446 rs10801445 rs10801444 rs10801443 rs10801442 rs10801441 rs10801440 rs10801439 rs10801438 rs10801437 rs10801436 rs10801435 rs10801434 rs10801433 rs10801432 rs10801431 rs10801430 rs10801429 rs10801428 rs10801427 rs10801426 rs10801425 rs10801424 rs10801423 rs10801422 rs10801421 rs10801420 rs10801419 rs10801418 rs10801417 rs10801416 rs10801415 rs10801414 rs10801413 rs10801412 rs10801411 rs10801410 rs10801409 rs10801408 rs10801407 rs10801406 rs10801405 rs10801404 rs10801403 rs10801402 rs10801401 rs10801400 rs10801399 rs10801398 rs10801397 rs10801396 rs10801395 rs10801394 rs10801393 rs10801392 rs10801391 rs10801390 rs10801389 rs10801388 rs10801387 rs10801386 rs10801385 rs10801384 rs10801383 rs10801382 rs10801381 rs10801380 rs10801379 rs10801378 rs10801377 rs10801376 rs10801375 rs10801374 rs10801373 rs10801372 rs10801371 rs10801370 rs10801369 rs10801368 rs10801367 rs10801366 rs10801365 rs10801364 rs10801363 rs10801362 rs10801361 rs10801360 rs10801359 rs10801358 rs10801357 rs10801356 rs10801355 rs10801354 rs10801353 rs10801352 rs10801351 rs10801350 rs10801349 rs10801348 rs10801347 rs10801346 rs10801345 rs10801344 rs10801343 rs10801342 rs10801341 rs10801340 rs10801339 rs10801338 rs10801337 rs10801336 rs10801335 rs10801334 rs10801333 rs10801332 rs10801331 rs10801330 rs10801329 rs10801328 rs10801327 rs10801326 rs10801325 rs10801324 rs10801323 rs10801322 rs10801321 rs10801320 rs10801319 rs10801318 rs10801317 rs10801316 rs10801315 rs10801314 rs10801313 rs10801312 rs10801311 rs10801310 rs10801309 rs10801308 rs10801307 rs10801306 rs10801305 rs10801304 rs10801303 rs10801302 rs10801301 rs10801300 rs10801299 rs10801298 rs10801297 rs10801296 rs10801295 rs10801294 rs10801293 rs10801292 rs10801291 rs10801290 rs10801289 rs10801288 rs10801287 rs10801286 rs10801285 rs10801284 rs10801283 rs10801282 rs10801281 rs10801280 rs10801279 rs10801278 rs10801277 rs10801276 rs10801275 rs10801274 rs10801273 rs10801272 rs10801271 rs10801270 rs10801269 rs10801268 rs10801267 rs10801266 rs10801265 rs10801264 rs10801263 rs10801262 rs10801261 rs10801260 rs10801259 rs10801258 rs10801257 rs10801256 rs10801255 rs10801254 rs10801253 rs10801252 rs10801251 rs10801250 rs10801249 rs10801248 rs10801247 rs10801246 rs10801245 rs10801244 rs10801243 rs10801242 rs10801241 rs10801240 rs10801239 rs10801238 rs10801237 rs10801236 rs10801235 rs10801234 rs10801233 rs10801232 rs10801231 rs10801230 rs10801229 rs10801228 rs10801227 rs10801226 rs10801225 rs10801224 rs10801223 rs10801222 rs10801221 rs10801220 rs10801219 rs10801218 rs10801217 rs10801216 rs10801215 rs10801214 rs10801213 rs10801212 rs10801211 rs10801210 rs10801209 rs10801208 rs10801207 rs10801206 rs10801205 rs10801204 rs10801203 rs10801202 rs10801201 rs10801200 rs10801199 rs10801198 rs10801197 rs10801196 rs10801195 rs10801194 rs10801193 rs10801192 rs10801191 rs10801190 rs10801189 rs10801188 rs10801187 rs10801186 rs10801185 rs10801184 rs10801183 rs10801182 rs10801181 rs10801180 rs10801179 rs10801178 rs10801177 rs10801176 rs10801175 rs10801174 rs10801173 rs10801172 rs10801171 rs10801170 rs10801169 rs10801168 rs10801167 rs10801166 rs10801165 rs10801164 rs10801163 rs10801162 rs10801161 rs10801160 rs10801159 rs10801158 rs10801157 rs10801156 rs10801155 rs10801154 rs10801153 rs10801152 rs10801151 rs10801150 rs10801149 rs10801148 rs10801147 rs10801146 rs10801145 rs10801144 rs10801143 rs10801142 rs10801141 rs10801140 rs10801139 rs10801138 rs10801137 rs10801136 rs10801135 rs10801134 rs10801133 rs10801132 rs10801131 rs10801130 rs10801129 rs10801128 rs10801127 rs10801126 rs10801125 rs10801124 rs10801123 rs10801122 rs10801121 rs10801120 rs10801119 rs10801118 rs10801117 rs10801116 rs10801115 rs10801114 rs10801113 rs10801112 rs10801111 rs10801110 rs10801109 rs10801108 rs10801107 rs10801106 rs10801105 rs10801104 rs10801103 rs10801102 rs10801101 rs10801100 rs10801099 rs10801098 rs10801097 rs10801096 rs10801095 rs10801094 rs10801093 rs10801092 rs10801091 rs10801090 rs10801089 rs10801088 rs10801087 rs10801086 rs10801085 rs10801084 rs10801083 rs10801082 rs10801081 rs10801080 rs10801079 rs10801078 rs10801077 rs10801076 rs10801075 rs10801074 rs10801073 rs10801072 rs10801071 rs10801070 rs10801069 rs10801068 rs10801067 rs10801066 rs10801065 rs10801064 rs10801063 rs10801062 rs10801061 rs10801060 rs10801059 rs10801058 rs10801057 rs10801056 rs10801055 rs10801054 rs10801053 rs10801052 rs10801051 rs10801050 rs10801049 rs10801048 rs10801047 rs10801046 rs10801045 rs10801044 rs10801043 rs10801042 rs10801041 rs10801040 rs10801039 rs10801038 rs10801037 rs10801036 rs10801035 rs10801034 rs10801033 rs10801032 rs10801031 rs10801030 rs10801029 rs10801028 rs10801027 rs10801026 rs10801025 rs10801024 rs10801023 rs10801022 rs10801021 rs10801020 rs10801019 rs10801018 rs10801017 rs10801016 rs10801015 rs10801014 rs10801013 rs10801012 rs10801011 rs10801010 rs10801009 rs10801008 rs10801007 rs10801006 rs10801005 rs10801004 rs10801003 rs10801002 rs10801001 rs10801000 rs10800999 rs10800998 rs10800997 rs10800996 rs10800995 rs10800994 rs10800993 rs10800992 rs10800991 rs10800990 rs10800989 rs10800988 rs10800987 rs10800986 rs10800985 rs10800984 rs10800983 rs10800982 rs10800981 rs10800980 rs10800979 rs10800978 rs10800977 rs10800976 rs10800975 rs10800974 rs10800973 rs10800972 rs10800971 rs10800970 rs10800969 rs10800968 rs10800967 rs10800966 rs10800965 rs10800964 rs10800963 rs10800962 rs10800961 rs10800960 rs10800959 rs10800958 rs10800957 rs10800956 rs10800955 rs10800954 rs10800953 rs10800952 rs10800951 rs10800950 rs10800949 rs10800948 rs10800947 rs10800946 rs10800945 rs10800944 rs10800943 rs10800942 rs10800941 rs10800940 rs10800939 rs10800938 rs10800937 rs10800936 rs10800935 rs10800934 rs10800933 rs10800932 rs10800931 rs10800930 rs10800929 rs10800928 rs10800927 rs10800926 rs10800925 rs10800924 rs10800923 rs10800922 rs10800921 rs10800920 rs10800919 rs10800918 rs10800917 rs10800916 rs10800915 rs10800914 rs10800913 rs10800912 rs10800911 rs10800910 rs10800909 rs10800908 rs10800907 rs10800906 rs10800905 rs10800904 rs10800903 rs10800902 rs10800901 rs10800900 rs10800899 rs10800898 rs10800897 rs10800896 rs10800895 rs10800894 rs10800893 rs10800892 rs10800891 rs10800890 rs10800889 rs10800888 rs10800887 rs10800886 rs10800885 rs10800884 rs10800883 rs10800882 rs10800881 rs10800880 rs10800879 rs10800878 rs10800877 rs10800876 rs10800875 rs10800874 rs10800873 rs10800872 rs10800871 rs10800870 rs10800869 rs10800868 rs10800867 rs10800866 rs10800865 rs10800864 rs10800863 rs10800862 rs10800861 rs10800860 rs10800859 rs10800858 rs10800857 rs10800856 rs10800855 rs10800854 rs10800853 rs10800852 rs10800851 rs10800850 rs10800849 rs10800848 rs10800847 rs10800846 rs10800845 rs10800844 rs10800843 rs10800842 rs10800841 rs10800840 rs10800839 rs10800838 rs10800837 rs10800836 rs10800835 rs10800834 rs10800833 rs10800832 rs10800831 rs10800830 rs10800829 rs10800828 rs10800827 rs10800826 rs10800825 rs10800824 rs10800823 rs10800822 rs10800821 rs10800820 rs10800819 rs10800818 rs10800817 rs10800816 rs10800815 rs10800814 rs10800813 rs10800812 rs10800811 rs10800810 rs10800809 rs10800808 rs10800807 rs10800806 rs10800805 rs10800804 rs10800803 rs10800802 rs10800801 rs10800800 rs10800799 rs10800798 rs10800797 rs10800796 rs10800795 rs10800794 rs10800793 rs10800792 rs10800791 rs10800790 rs10800789 rs10800788 rs10800787 rs10800786 rs10800785 rs10800784 rs10800783 rs10800782 rs10800781 rs10800780 rs10800779 rs10800778 rs10800777 rs10800776 rs10800775 rs10800774 rs10800773 rs10800772 rs10800771 rs10800770 rs10800769 rs10800768 rs10800767 rs10800766 rs10800765 rs10800764 rs10800763 rs10800762 rs10800761 rs10800760 rs10800759 rs10800758 rs10800757 rs10800756 rs10800755 rs10800754 rs10800753 rs10800752 rs10800751 rs10800750 rs10800749 rs10800748 rs10800747 rs10800746 rs10800745 rs10800744 rs10800743 rs10800742 rs10800741 rs10800740 rs10800739 rs10800738 rs10800737 rs10800736 rs10800735 rs10800734 rs10800733 rs10800732 rs10800731 rs10800730 rs10800729 rs10800728 rs10800727 rs10800726 rs10800725 rs10800724 rs10800723 rs10800722 rs10800721 rs10800720 rs10800719 rs10800718 rs10800717 rs10800716 rs10800715 rs10800714 rs10800713 rs10800712 rs10800711 rs10800710 rs10800709 rs10800708 rs10800707 rs10800706 rs10800705 rs10800704 rs10800703 rs10800702 rs10800701 rs10800700 rs10800699 rs10800698 rs10800697 rs10800696 rs10800695 rs10800694 rs10800693 rs10800692 rs10800691 rs10800690 rs10800689 rs10800688 rs10800687 rs10800686 rs10800685 rs10800684 rs10800683 rs10800682 rs10800681 rs10800680 rs10800679 rs10800678 rs10800677 rs10800676 rs10800675 rs10800674 rs10800673 rs10800672 rs10800671 rs10800670 rs10800669 rs10800668 rs10800667 rs10800666 rs10800665 rs10800664 rs10
--	--