

(19)日本国特許庁（J P）

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003－535581

(P2003－535581A)

(43)公表日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 27/02		A 6 1 P 27/02	4 B 0 6 3
37/02		37/02	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 98数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001－581122(P2001－581122)

(86)(22)出願日 平成13年4月30日(2001.4.30)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月28日(2002.10.28)

(86)国際出願番号 PCT/US01/13971

(87)国際公開番号 W001/084149

(87)国際公開日 平成13年11月8日(2001.11.8)

(31)優先権主張番号 60/200,698

(32)優先日 平成12年4月29日(2000.4.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ
ファウンデーション
アメリカ合衆国,アイオワ 52242－5000,アイ
オワ シティ,オークデイル キャンパス
100 #214 ティーアイシー,オークデ
イル リサーチ キャンパス

(72)発明者 ヘイジマン グレゴリー、エス
アメリカ合衆国 アイオワ州 52241、コー
ラルヴィル、 オーバーン ヒルズ ドラ
イブ 500

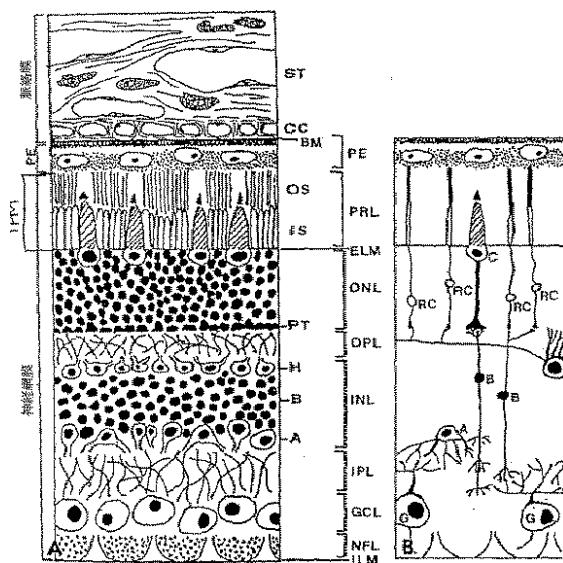
(74)代理人 弁理士 清水 徹男 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 黄班変性関連疾患の診断および治療

(57)【要約】

本発明は黄班変性関連障害を治療、予防、および診断する
方法に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

被験者において黄班変性関連障害を診断し、またはその発症の素因を同定するための方法であって、該被検者に由来する生物学的試料において、少なくとも1つの補体経路関連分子の異常活性もしくは異常レベル、または補体経路が介在する異常細胞活性を検出することを含む方法。

【請求項2】

前記被験者に黄班変性関連障害以外の補体関連疾患がない請求項1の方法。

【請求項3】

検出が、被験者において少なくとも1つの黄班変性関連遺伝子マーカー、晶洞関連表現型マーカー、または晶洞関連遺伝子型マーカーを検出することをさらに含む請求項1の方法。

【請求項4】

被験者を眼科的手順で検査することをさらに含む請求項1の方法。

【請求項5】

前記さらなる検査が前記被験者の脈絡毛細管板またはRPEに対する損傷を検出する請求項4の方法。

【請求項6】

前記黄班変性関連障害が、年齢関連黄班変性（AMD）、North Carolina黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞からなる群より選択される請求項1の方法。

【請求項7】

前記黄班変性関連障害が、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体－錐体ジストロフィー、錐体－桿体ジストロフィー、および錐体変性症からなる群より選択される請求項1の方法。

【請求項8】

前記生物学的試料が眼液、尿、血漿、血清、または全血である請求項1の方法。

【請求項 9】

前記異常活性が自己抗体の存在である請求項 1 の方法。

【請求項 10】

自己抗体が補体経路関連分子、RPEタンパク質、脈絡膜タンパク質、網膜タンパク質、または新抗原を指向する請求項 9 の方法。

【請求項 11】

検出工程が補体経路分子の異常レベルを検出する請求項 1 の方法。

【請求項 12】

前記異常レベルが尿、血漿、血清、全血試料、または眼液において検出される請求項 11 の方法。

【請求項 13】

前記補体経路関連分子がハプトグロビン、Igカッパ鎖、Igラムダ鎖、またはIgガンマ鎖である請求項 11 の方法。

【請求項 14】

前記補体経路分子がクラスタリン、C6またはC5b-9複合体である請求項 11 の方法。

【請求項 15】

検出工程が、補体経路関連タンパク質または自己抗原をコードする核酸の変種形態を検出する請求項 1 の方法。

【請求項 16】

前記核酸がmRNA、cDNA、またはゲノムDNAである請求項 15 の方法。

【請求項 17】

前記変種核酸が点突然変異、フレームシフト突然変異、または野生型核酸と比しての欠失を有する請求項 15 の方法。

【請求項 18】

被験者に由来する尿、血漿、血清、全血試料、または眼液において補体活性を測定することによって前記異常活性を検出する請求項 1 の方法。

【請求項 19】

溶血アッセイ、T細胞増殖アッセイ、DTHアッセイ、または免疫学的アッセイに

よって前記補体活性を検出する請求項18の方法。

【請求項20】

被験者において黄班変性を治療し、またはその発症を予防する方法であって、少なくとも1つの補体経路関連分子の活性もしくは発現レベル、または補体経路が介在する細胞活性を調節する有効量の治療薬を該被験者に提供することを含み、該被験者が黄班変性関連障害を患っているか、またはそれを発症する危険性がある方法。

【請求項21】

被験者が黄班変性関連障害を患う請求項20の方法。

【請求項22】

被験者に黄班変性関連障害を発症する危険性がある請求項20の方法。

【請求項23】

前記被験者に他の補体関連疾患がない請求項20の方法。

【請求項24】

前記黄班変性関連障害が、年齢関連黄班変性、North Carolina黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞からなる群より選択される請求項20の方法。

【請求項25】

前記黄班変性関連障害が、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体-錐体ジストロフィー、錐体-桿体ジストロフィー、および錐体変性症からなる群より選択される請求項20の方法。

【請求項26】

前記治療薬が補体経路関連分子または補体経路によって開始もしくは誘発される分子の発現レベルを調節する請求項20の方法。

【請求項27】

前記補体経路関連分子がアナフィラトキシンC3a、アナフィラトキシンC5a、C6、クラスタリン、ハプトグロビン、Igカッパ鎖、Igラムダ鎖、またはIgガンマ鎖である請求項20の方法。

【請求項28】

前記治療薬が前記補体経路関連分子のタンパク質発現レベルを調節する請求項20の方法。

【請求項29】

被験者に由来する尿、血漿、血清、全血、または眼液で前記発現レベルを検出することをさらに含む請求項28の方法。

【請求項30】

前記治療薬が補体タンパク質または補体経路関連分子の酵素活性を調節する請求項20の方法。

【請求項31】

前記酵素活性がC3からC3aおよびC3bへの変換、C5からC5aおよびC5bへの変換、またはB因子のBaおよびBbへの開裂の触媒である請求項30の方法。

【請求項32】

溶血アッセイ、T細胞増殖アッセイ、DTHアッセイ、または免疫学的アッセイによって前記活性を検出することをさらに含む請求項30の方法。

【請求項33】

被験者に由来する尿、血漿、血清、全血、または眼液で前記活性を検出する請求項30の方法。

【請求項34】

前記治療薬が補体系の活性化に応答するか、またはそれが介在する細胞活性を調節する請求項30の方法。

【請求項35】

前記細胞活性が細胞溶解である請求項34の方法。

【請求項36】

溶血アッセイによって前記細胞活性を検出することをさらに含む請求項34の方法。

【請求項37】

被験者に由来する尿、血漿、血清、全血、または眼液で前記細胞活性を検出する請求項34の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**関連出願への相互参照

本願は2000年4月29日出願の米国仮出願60/200,698号の優先権の利益を主張し、そのすべての開示はすべての目的のため参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0002】発明の分野

本発明は、一般には、黄班変性関連疾患（1種類もしくは複数種類）の治療および診断に関する。本発明はバイオメディカル科学において用途が見出される。

【0003】発明の背景

黄班変性は、すべてBruch膜、神経網膜および網膜色素上皮の異常に関連する中心視覚の進行性の喪失を特徴とする様々な疾患を説明するのに用いられる臨床用語である。これらの疾患には、高齢被験者（年齢関連黄班変性、すなわちAMD）に影響を及ぼす非常に一般的な状態に加えて、幾つかの症例においては人生の最初の10年において検出されることがあるより希な早期発症ジストロフィーが含まれる。他の黄班症には、North Carolina黄班ジストロフィー（Smallら、1993）、Sorsby眼底ジストロフィー（Caponら、1989）、Stargardt病（Parodi、1994）、パターン・ジストロフィー（Marmor and Byers、1977）、Best病（Stoneら、1992）、優性晶洞（Deutman and Jansen、1970）、および放射状晶洞（“malattia leventinese”）（Heonら、1996）が含まれる。

【0004】

組織病理学的研究は、加齢個体及び臨床的にAMDと診断された者のRPE、脈絡膜、および光受容器に関連する、細胞外マトリックスにおける重要かつ広範な以上を文書化している（Sarks、1976；Sarksら、1988；Bird、1992a；van der Schaff tら、1992；Green and Enger、1993；Feeney-Burns and Ellersieck、1985；Young、1987；Kincaid、1992）。最も顕著な細胞外マトリックス（ECM）異常は晶洞であり、これはRPE眼底層とBruch膜の内部膠原層との間に蓄積する堆積である（

図1)。

【0005】

幾つかの研究が、黄変晶洞の存在が萎縮性および血管新生AMDの両者の発症の強力な危険因子であることを示している (Bresslerら、1994 ; Bresslerら、1990 ; Macular Photocoagulation Study)。晶洞はRPE単層の側方伸展およびRPEのその即時血管供給源、脈絡毛細管板からの物理的置換を生じる。この置換は、清浄な代謝および脈絡毛細管板と網膜との間の廃棄物の拡散を妨害する物理的障壁を創出する。廃棄物がRPE近傍で濃縮され、酸素、グルコース、並びに網膜およびRPEの健康の維持に必要な他の栄養性もしくは調節性血清関連分子の拡散が阻害されるように思われる。また、晶洞は、桿状体および錐状体に圧力をかけることにより (Rones、1937)、および／または光受容器細胞の整列を歪めることにより (Kincaid、1992)、光受容器細胞の機能を混乱させることも示唆されている。

【0006】

人の血清中において補体系是一群のグロブリンからなる (Hood, L. E. et al. 1984, Immunology, 2d Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, Calif., p. 339 ; 米国特許第6,087,120号および第5,808,109号も参照)。補体の活性化は免疫の介在およびアレルギー反応において重要な役割を果たす (Rapp, H. J. and Borsos, T., 1970, Molecular Basis of Complement Action, Appleton-Century-Crofts (Meredith), N.Y.)。補体成分の活性化は、補体依存性疾患関連の炎症に介在する走化性ペプチドを含む、一群の因子の産生につながる。活性化補体タンパク質が介在する活性には、標的細胞の溶解、走化性、オプソニン化、血管及び他の平滑筋細胞の刺激、肥満細胞の脱顆粒化、小血管の透過性の増大、白血球の指向性移動、並びにBリンパ球、マクロファージおよび好中球の活性化が含まれる (Eisen, H. N., 1974, Immunology, Harper & Row, Publishers, Inc., Hagerstown, Md., p. 512)。

【0007】

補体の活性化には3つの主要経路がある。第1に、抗体／抗原結合によって活性化される「古典経路」。第2に、「レクチン経路」または「収集経路」は急性期反応体マンノース結合性タンパク質 (MBP ; もしくはマンノース結合性レクチン

、MBL)の複合炭水化物への結合によって活性化される。第3に、特定の(例えば、微生物表面上の)多糖の認識に関与し、かつC3bBと呼ばれる特別な基質、補体タンパク質の複合体の存在によって活性化される「代替経路」。例えば、Cooper, *Adv Immunol*, 37(-HD-):151-216, 1985; Fearon & Austen, *J. Exp. Med.* 146:22-33, 1977; Pangburn et al., 266:16847-53, 1991; Matsushita et al., *Microbiol Immunol*, 40(12):887-93, 1996; およびTurner et al., *Res Immunol*, 147(2):110-5, 1996を参照。主要な古典経路の構成要素はC1q、C1r、C1s、C4、C2、C3、C5、C6、C7、C8、C9と表される。主要な代替経路の構成要素はB因子、D因子、プロパージン、HおよびIと表される。MBLに加えて、レクチン経路の構成要素にはMASP-1およびMASP-2も含まれる(Thiel et al., *Nature*, 386:506-10, 1997)。アルツハイマー病のように、1つの疾患プロセスに2つ以上の経路が関与し得ることも公知である(Akiyama et al., *Neurobiol Aging*, 21:383-421 2000)。

【0008】

古典経路の開始は特異的抗原への抗体の結合で始まる。C1qが、抗原に結合しているIgGまたはIgMの改変Fc領域に結合する。結合すると、C1rがC1sを活性化し、それがC4およびC2の両者からペプチドを開裂することによって活性化単位を開始する。このようにC1sはC4をC4aおよびC4bに開裂し、かつC2をC2aおよびC2bに開裂する。C2aはC4bに結合してC4b2aを形成する。C3転換酵素であるC4b2aはタンパク分解酵素である。これはC3を活性化表面に結合し得るC3bおよび液相中に放出されるC3aに開裂する。C3転換酵素は多くのC3分子を開裂する能力を有する。これは、活性化表面上での多数のC3b分子の堆積を生じ得る。しかしながら、C3bの不安定性のため、実際に結合する分子はほとんどない。C3が開裂するとき、C5転換酵素であるC4b2a3bが形成される。酵素でもあるC5転換酵素は、多くのC5分子をC5aおよびC5bに開裂することができる。

【0009】

代替経路は、微生物感染に対する天然の非免疫防御を提供する。加えて、この経路は、抗体-抗原反応を増幅させる。代替経路の認識は、C3bおよび活性化表面、例えば、細菌リポタンパク質、特定の寄生虫、酵母、ウイルスの表面および

他の外来体の表面、例えば、バイオマテリアルの存在下で生じる。C3bは古典経路の活性化および／またはC3の天然の自発的加水分解から生じる。生じたC3bは活性化物質の表面に結合する。マグネシウムの存在下で、B因子がC3bに結合し、それが活性化表面に結合する。その後、D因子がBを開裂し、Ba断片を生じてC3bBbを形成する。プロパージンはこのC3bBb複合体を安定化し、それを分解から保護する。C3bBnPは代替経路転換酵素である。これも多くのC3分子を開裂する能力を有する。C3の開裂はC5転換酵素であるC3bBb3bの形成を生じる。この酵素もPによって安定化され、C3bBb3bPを形成する。C5転換酵素はC5の多くの分子をC5aおよびC5bに開裂することができる。

【0010】

MBLの炭水化物への結合がレクチン経路を誘発する。MBLは補体C1、C1qに構造的に関連し、かつ、古典経路のC1rおよびC1sに類似する、MASP-1もしくはp100として知られる関連セリンプロテアーゼによって補体系を活性化するものと思われる。MBLは、細菌、酵母、寄生性原生動物およびウイルスを含む一連の微生物の表面上に見出される特定の炭水化物構造に結合し、最終溶解性補体成分が介在する殺傷により、または食作用の促進により、抗菌活性を示す。血漿中のMBLのレベルは遺伝的に決定され、その欠乏は子供および、おそらくは、成人における頻繁な感染に関連する。加えて、従来報告されているMSAP (MASP-1) との著しい相同性を示すさらなるMBL関連セリンプロテアーゼ (MASP-2) 並びに2種類のC1q関連セリンプロテアーゼC1rおよびC1sが同定された (例えば、Thiel et al., Nature, 386:506-10, 1997を参照)。

【0011】

膜攻撃複合体C5b-9 (別名、補体最終複合体MAC、またはSC5b-9) は補体経路に共通である (例えば、Morgan, Crit Rev Immunol, 19(3):173-98, 1999を参照)。これは、古典または代替経路の活性化のいずれかの間に生じるC5転換酵素によるC5の開裂で始まる。C5が開裂するとき、C5aは液相に放出されるが、C5bは活性化表面に、C3bとは異なる結合部位で結合する。C6およびC7の各々の1分子がC5bに結合して安定な3分子複合体を形成し、これにC8が結合する。その後、6分子までのC9がC8に結合することができ、活性化表面が微生物である場合、これが膜

複合体の有効性を高めて膜の損傷を誘導する。

【0012】

補体活性化の重要性は攻撃複合体から生じる膜の損傷に限られるものではない。補体活性化の過程で放出される活性ペプチドは、血管透過性および平滑筋の収縮の増加、免疫粘着の促進、顆粒球および血小板の凝集、食作用の増強、並びに炎症部位への好中球（PMN）およびマクロファージの移動により免疫応答に寄与する。

【0013】

C3およびC5の開裂は2種類の小さい生物学的に活性のペプチド、C3aおよびC5aの放出を生じる。これらのペプチドはアナフィラトキシンとして作用する。これらは、ヒスタミンの放出、アナフィラキシーの物質（SRS-A）の徐放、並びに好塩基球および肥満細胞からのヘパリンを生じることによって免疫応答を増幅する。これらの物質は毛細管透過性および平滑筋の収縮を増加させ、これが浮腫および炎症を生じる。

【0014】

アナフィラトキシンとしてのその役割に加えて、C5aは強力な走化性因子である。この媒介物は樹状細胞および単球を含む白血球の炎症部位への指向性移動を生じ、それによりこれらの白血球が免疫複合体、細菌及びウイルスを食菌して系から一掃する。

【0015】

免疫粘着として知られるプロセスにおいて、可溶性免疫複合体または表面上に堆積するC3bまたはC4bは、PMN、マクロファージ、赤血球細胞および血漿板上での補体受容体の結合を可能にする。これらの場合、C3bおよびC5bは、それらの存在がより有効な食作用を生じるため、オプソニンと考えられる。

【0016】

黄班変性関連障害のための診断および治療が必要とされている。例えば、現在、例えばAMDの診断に日常的に用いられている信頼のおける生化学的または遺伝学的手段は存在しない。加えて、被験者の大多数に対してAMDの変性進行を有意に遅らせる、現在使用されている治療は存在しない。現在のAMD治療は、罹患被

験者の10-15%に生じる網膜下血管新生膜のレーザー光凝固に限定される。後者は疾患の進行を停止させるが、機能不全を逆転させ、損傷を修復し、または視力を改善することはない。

【0017】

発明の要約

本発明は、被験者における黄班変性関連障害を診断し、またはその発症の素因を同定するための方法であって、その被験者に由来する生物学的試料において少なくとも1つの補体経路関連分子の異常活性もしくは異常レベル、または補体経路が介在する異常細胞活性を検出することによる方法を提供する。幾つかの方法においては、被験者には黄班変性関連障害以外の補体関連疾患がない。幾つかの方法においては、検出工程は、被験者において少なくとも1つの黄班変性関連遺伝子マーカー、晶洞関連表現型マーカー、または晶洞関連遺伝型マーカーを検出することも含む。幾つかの方法においては、検出工程で、眼科的手順を用いて被験者をさらに検査する。幾つかの方法においては、このさらなる検査工程で、該被検者の脈絡毛細管板に対する損傷を検出する。

【0018】

本発明の方法で診断することができる黄班変性関連障害には、年齢関連黄班障害（AMD）、North Carolina黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞が含まれる。他の疾患または障害には、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体-錐体ジストロフィー、錐体-桿体ジストロフィー、および錐体変性症が含まれる。

【0019】

本発明の診断に用いることができる被験者由来の試料には眼液、尿、血漿、血清、または全血が含まれる。幾つかの方法においては、この診断は血清自己抗体に向けられる。幾つかの方法においては、この自己抗体は補体経路関連分子、RPEタンパク質、脈絡膜タンパク質（Bruch膜のタンパク質を含む）、網膜タンパク質、循環分子またはこれらの眼組織に結合する自己抗原、もしくは新抗原に特異的に結合する。幾つかの方法においては、検出しようとする異常レベルは補体経

路関連分子、例えば、ハプトグロビン、Igカッパ鎖、Igラムダ鎖、またはIgガンマ鎖のレベルである。他の方法においては、検出しようとする異常レベルはクラスタリン（clusterin）、C6またはC5b-9複合体の発現レベルである。

【0020】

本発明の幾つかの方法においては、検出しようとする補体系の異常活性は補体経路関連タンパク質をコードする核酸の変種形態である。この核酸はmRNA、cDNA、またはゲノムDNAであり得る。変種核酸は、点突然変異、フレームシフト突然変異、または野生型核酸と比しての欠失を有することができる。幾つかの方法においては、補体経路関連分子のレベルまたは被験者に由来する尿、血漿、血清、全血試料、もしくは眼液における補体活性を測定することによって変種核酸を検出する。幾つかの方法においては、溶血アッセイ、T細胞増殖アッセイ、または免疫学的アッセイによって補体活性を測定する。

【0021】

また、本発明は、黄班変性関連障害に罹患しているか、またはその発症の危険性がある被験者において、黄班変性症の発症を治療または予防するための方法も提供する。これらの方法は、少なくとも1種類の補体経路関連分子の活性もしくはレベル、または補体経路が介在する細胞活性を調節する、有効量の治療薬を被験者に投与することを含む。幾つかの方法においては、被験者は黄班変性関連障害を有する。他の方法においては、黄班変性関連障害を発症する危険性がある。幾つかの方法においては、被験者に黄班変性関連障害以外の補体関連疾患がない。

【0022】

本発明の方法で治療することができる疾患または障害には、年齢関連黄班障害、North Carolina黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞が含まれる。また、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体-錐体ジストロフィー、錐体-桿体ジストロフィー、および錐体変性症も含まれる。

【0023】

幾つかの方法においては、治療薬は補体経路関連分子のレベルを調節する。幾つかの方法においては、レベルを調節しようとする補体経路関連分子はアナフィラトキシンC3a、アナフィラトキシンC5a、C6、クラスタリン、ハプトグロビン、Igカッパ鎖、Igラムダ鎖、またはIgガンマ鎖である。幾つかの方法においては、薬剤は前記補体経路関連分子のタンパク質レベルを調節する。幾つかの方法は、そのレベルを被験者由来の尿、血漿、血清、全血、または眼液を用いて検出することを含む。

【0024】

本発明の幾つかの方法においては、治療薬は補体タンパク質または補体経路関連分子の酵素活性を調節する。幾つかの方法においては、調節しようとする酵素活性はC3のC3aおよびC3bへの変換、C5のC5aおよびC5bへの変換、またはB因子のBaおよびBbへの開裂の触媒である。幾つかの方法は、溶血アッセイまたは免疫学的アッセイによって酵素活性を検出することをさらに含む。幾つかの方法においては、被験者由来の尿、血漿、血清、全血、または眼液を用いて酵素活性を検出する。

【0025】

本発明の幾つかの方法においては、治療薬は活性化補体系に応答するか、またはそれが介在する細胞活性を調節する。幾つかの方法においては、調節しようとする細胞活性は細胞溶解である。幾つかの方法は、例えば溶血アッセイにより、細胞活性を検出することをさらに含む。幾つかの方法においては、患者由来の尿、血漿、血清、全血、または眼液を用いて細胞活性を検出する。

【0026】

詳細な説明

本発明は、黄班変性関連障害を診断するための方法、およびそのような障害を予防および治療するための方法を提供する。本発明は、黄班変性関連障害において補体系が局所的に、特にRPE-脈絡膜界面で、活性であるという発見で部分的に予想される。これらの方法は、少なくとも1種類の補体経路関連分子に関連する異常な活性またはレベルを検出することによって機能する。被験者に由来する生物学的試料における異常補体活性または異常レベルの存在は、様々な黄班変

性関連障害の存在、またはそれを発症する素因を示すものであり得る。このような障害または疾患には、例えば、年齢関連黄班障害（AMD）、North Carolina黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞が含まれる。これらの方法で診断または治療することができる他の黄班変性関連眼病には、例えば、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体一錐体ジストロフィー、錐体一桿体ジストロフィー、および錐体変性症が含まれる。

【0027】

これらの方法は、被験者の集団をこれらの黄班変性関連障害について、任意に、これらの被験者に備わる可能性のある他の障害の追加の生化学的および／または遺伝的マーカーを伴い、大規模スクリーニングするのに適する。また、これらの方法は、従来黄班変性関連障害と診断されている被験者を、特には治療に対する彼らの応答を、監視するのに適する。WO 00/52479に記載されるように、異常補体活性または異常レベルの分析方法は組み合わせて行うことができ、任意に、黄班変性関連障害または晶洞関連疾患と相関する他の遺伝的、表現型、または遺伝型マーカーの検出とさらに組み合わせることができる。任意に、表現型マーカーの分析を、黄班変性関連障害と相関する多形の補体経路分子をコードする遺伝子の多形分析と組み合わせることができる。

以下のセクションは、本発明の組成物の製造及び使用のための、並びに本発明を実施するための指針を提供する。

【0028】

I. 定義

他に定義されない限り、本明細書で用いられるすべての技術的および科学的用語は本発明が属する技術分野において通常の技術を有する者が一般に理解するものと同じ意味を有する。以下の参考文献は本発明において用いられる多くの用語の一般的な定義を当業者にもたらす：Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994)；THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988)；およびHale & Marham, THE HARP

ER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。本明細書において説明されるものに類似するか、またはそれらに等しいあらゆる方法および材料を本発明の実施または試験において用いることができるが、好ましい方法および材料を説明する。以下の定義は本発明の実施において読者を援助するために提供される。

【0029】

「作用物質」という用語にはあらゆる物質、分子、要素、化合物、実体、またはそれらの組合せが含まれる。これには、これらに限定されるものではないが、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、小有機分子、多糖、ポリヌクレオチド等が含まれる。これは天然産生物、合成化合物、もしくは化学物質であってもよく、または2種類以上の物質の組合せであってもよい。他に指定されない限り、「作用物質」、「物質」、および「化合物」という用語は交換可能に用いることができる。

【0030】

「アゴニスト」という用語は、遺伝子産生物の産生または活性を強化または上方調節（例えば、増強もしくは補足）する作用物質である。アゴニストは、遺伝子産生物、分子もしくは細胞と他の遺伝子産生物、分子もしくは細胞との相互作用、例えば、遺伝子産生物と他の相同もしくは非相同遺伝子産生物との、または遺伝子産生物とその受容体との相互作用を増加させる化合物でもあり得る。好ましいアゴニストは、遺伝子上流領域への転写因子の結合または活性化を強化または増加させ、それによりその遺伝子を活性化する化合物である。遺伝子の発現を、例えば、RNAもしくはタンパク質合成を増加させるか、またはRNAもしくはタンパク質・ターンオーバーを減少させることによって活性化し、または遺伝子産生物の活性を活性化するあらゆる作用物質は、その作用物質が遺伝子もしくは遺伝子産生物に直接作用しようと、または、例えば遺伝子調節経路の上流に、間接的に作用しようと、アゴニストであり得る。アゴニストはRNA、ペプチド、抗体および小分子、またはそれらの組合せであり得る。

【0031】

「アンタゴニスト」という用語は、遺伝子産生物の産生または活性を下方調節（例えば、抑制もしくは阻害）する作用物質である。このようなアゴニストは、

遺伝子産生物、分子もしくは細胞と他の遺伝子産生物、分子もしくは細胞との相互作用を阻害または減少させる作用物質であり得る。好ましいアゴニストは、遺伝子上流領域への転写因子の結合または活性化を阻害または減少させ、それによりその遺伝子の活性化を遮断する化合物である。遺伝子の発現または遺伝子産生物の活性を阻害するあらゆる作用物質は、その作用物質が遺伝子もしくは遺伝子産生物に直接作用しようと、または、例えば遺伝子調節経路の上流に、間接的に作用しようと、アゴニストであり得る。アゴニストは、遺伝子の発現を下方調節するか、または存在する遺伝子産生物の量を、例えば、RNAもしくはタンパク質の合成を減少させ、またはRNAもしくはタンパク質のターンオーバーを増加させることにより減少させる化合物でもあり得る。アンタゴニストはRNA、ペプチド、抗体および小分子、またはそれらの組合せであり得る。

【0032】

「抗体」または「免疫グロブリン」という用語は、無傷の抗体およびそれらの結合性断片を含むように用いられる。典型的には、断片は、別々の重鎖、軽鎖Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、およびFvを含む抗原断片への特異的結合について、それらが誘導された無傷の抗体と競合する。断片は、組換えDNA技術により、または無傷の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的分離により産生される。「抗体」という用語には、他のタンパク質に化学的に結合し、またはそれとの融合タンパク質として発現する1つ以上の免疫グロブリンも含まれる。「抗体」という用語には二重特異的抗体も含まれる。二重特異的または二官能性抗体は、2つの異なる重鎖／軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異的抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む様々な方法によって産生することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148,1547-1553 (1992)を参照のこと。

【0033】

「アンチセンス分子」という用語は、特定のタンパク質（例えば、補体経路分子）の標的mRNA（センス）またはDNA（アンチセンス）に結合することが可能な一本鎖核酸配列を含むアンチセンスまたはセンス・オリゴヌクレオチドを含む。

所定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンス・オリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) およびvan der Krolら (BioTechniques 6:958, 1988) に記載されている。

【0034】

「補体活性」という用語は、補体系、個々の補体経路関連分子に加えてこれらの分子をコードする遺伝子に関連する生化学的および生理学的活性を広く包含する。したがって、補体活性には、例えば、補体経路分子をコードする遺伝子の構造および発現、補体経路分子の生化学的活性（例えば、酵素的または調節性）補体系の活性化で開始するか、またはそれから生じる細胞活性、並びに補体経路分子に対する血清自己抗体の存在が含まれる。

【0035】

「補体成分」または「補体タンパク質」という用語は補体系の活性化に関与する分子を指す。古典経路成分には、例えば、C1q、C1r、C1s、C4、C2、C3、C5、C6、C7、C8、C9、およびC5b-9複合体（膜攻撃複合体：MAC）が含まれる。代替経路成分には、例えば、B因子、D因子、プロパージン、HおよびIが含まれる。主要なレクチン経路成分はマンノース結合性タンパク質（MBP）である。

【0036】

「補体経路関連分子」、「補体経路分子」及び「補体経路関連タンパク質」という用語は交換可能に用いられ、補体の活性化において、および活性化された補体系が介在し、それに応答し、またはそれによって誘発される下流細胞活性において役割を果たす様々な分子を指す。これらには、補体経路のイニシエータ（すなわち、補体系の活性化を直接または間接的に誘発する分子）、補体活性化の間に産生されるか、または役割を果たす分子（例えば、C3、C5、C5b-9、B因子、MASP-1、およびMASP-2のような補体タンパク質／酵素）、補体受容体または阻害剤（例えば、クラスタリン、ビトロネクチン、CR1、またはCD59）、および活性化された補体系によって調節されるか、または誘発される分子（例えば、膜攻撃複合体—阻害因子、MACIF；例えば、Sugita et al., J Biochem, 106:589-92, 1989を参照）が含まれる。したがって、上記補体タンパク質に加えて、補体経路

関連分子には、例えば、C3/C5転換酵素調節因子（RCA）、例えば、1型補体受容体（別名、CR1またはCD35）、2型補体受容体（別名、CR2またはCD21）、膜補因子タンパク質（MCPまたはCD46）、およびC4bBP；MAC調節因子、例えば、ビトロネクチン、クラスタリン（別名、「SP40,40」）、CRP、CD59、および相同制限因子（HRF）；免疫グロブリン鎖、例えば、Igカッパ、Igラムダ、またはIgガンマ；C1阻害剤；並びに他のタンパク質、例えば、CR3、CR4（CD11b/18）、およびDAF（CD55）も含まれる。

【0037】

「検出可能な標識」は、（例えば、物理的または化学的特性により）他の分子の存在の検出するのに用いることができる原子（例えば、放射核）、分子（例えば、フルオレセイン）、または複合体を指す。「標識」という用語は、基質に作用して検出可能な原子、分子または複合体を生成する共有結合した、または他の方法で会合した分子（例えば、酵素のような生体分子）をも指す。本発明において用いるのに適する検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、化学的手段等によって検出可能なあらゆる組成物が含まれる。

【0038】

「晶洞」という用語は、RPE眼底層とBruch膜の内部膠原層との間に蓄積する堆積を指す（例えば、van der Schaft et al., Ophthalmol. 99:278-86, 1992；Spraul et al. Arch. Ophthalmol. 115:267-73, 1997；およびMullins et al., Histochemical comparison of ocular "drusen" in monkey and human. In M. LaVail, J. Hollyfield, and R. Anderson (Eds.), in Degenerative Retinal Diseases (pp. 1-10). New York: Plenum Press, 1997を参照）。硬晶洞は、均一な好酸球性物質を含む小さな別々の堆積であり、通常、傾斜した境界のない円形または半球状である。軟晶洞は大きくて通常は均一ではなく、典型的には、封入および球形プロフィールを含む。幾つかの晶洞は石灰化していることがある。「拡散晶洞」または「眼底層堆積」という用語は、Bruch膜の内部膠原層と網膜色素上皮（RPE）との間に層を形成する非晶質物質を記述するのに用いられる。この物質は、盛り上がっていないことを除いて、組織学的に軟晶洞に類似して見える

ことがある。

【0039】

「晶洞関連疾患」または「晶洞関連障害」という用語は、晶洞もしくは晶洞様細胞外疾患プラークの形成が生じるあらゆる疾患、およびそれに対して晶洞もしくは晶洞様細胞外疾患プラークが生じるか、それに寄与し、またはそれらの徴候を表すあらゆる疾患を指す。晶洞関連疾患または障害には、主として、晶洞が存在する黄班変性関連障害が含まれる。しかしながら、細胞外疾患プラークを備える非眼年齢関連疾患、例えば、アミロイド症、弾力線維症、高密度堆積病 (dense deposit disease) および／またはアテローム性動脈硬化症も包含される。この用語は糸球体腎炎（例えば、膜性および関連眼晶洞を有する連鎖球菌後／分節性）も含む。

【0040】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、Bおよび／またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、近接アミノ酸またはタンパク質の三次折り畳みによって並列する非近接アミノ酸の両者から形成され得る。近接アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒に露出されたときに保持され、これに対して三次折り畳みによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒を用いる処理で失われる。エピトープは、独自の空間構造をとる、典型的には少なくとも3、より一般的には少なくとも5または8-10のアミノ酸を含む。エピトープの空間構造を決定する方法には、例えば、X線結晶解析および二次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照のこと。ある抗体が別の抗体の標的抗原への結合を遮断する能力を示す簡単なイムノアッセイにおいて、同じエピトープを認識する抗体を同定することができる。T細胞はCD8細胞について約9アミノ酸、またはCD4細胞について約13-15アミノ酸の連続エピトープを認識する。エピトープを認識するT細胞は、エピトープに応答して初回刺激を受けたT細胞による3H-チミジンの組み込みにより (Burke et al., J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994))、抗原依存性の殺傷により (細胞毒性Tリンパ球アッセイ、Tigges et al., J. Immunol. 156, 3901-3910) また

はサイトカイン分泌により決定される、抗原依存性増殖を測定するイン・ビトロ・アッセイによって同定することができる。

【0041】

「融合タンパク質」という用語は複合ポリペプチド、すなわち、通常は単一のアミノ酸配列中で一緒に融合することはない2種類の（もしくはそれを上回る）異なる非相同ポリペプチドで構成される単一の連続アミノ酸配列を指す。したがって、融合タンパク質は、2つのまったく異なるアミノ酸配列または2つの類似もしくは同一ポリペプチド配列を含む単一のアミノ酸配列を、これらの配列が通常は自然界に見出される単一のアミノ酸配列中に同じ配置で一緒に見出されないことがないという条件の下で、含むことができる。融合タンパク質は、一般に、組換え核酸法を用いて、すなわち、融合が本発明のポリペプチドをコードするセグメントおよび非相同ポリペプチドをコードするセグメントを含む組換え遺伝子融合産物の転写および翻訳の結果として、または当該技術分野において公知の化学合成によって調製することができる。

【0042】

「黄班変性関連障害」という用語は、例えば、黄班細胞の成長の低下、黄班細胞（例えば、RPE細胞）の死もしくは再編成の増加、正常な生物学的機能の喪失、またはこれらの現象の組合せの結果として、網膜黄班が変性するか、または機能不全となる多くの状態のあらゆるものを指す。黄班変性は、正常黄班の細胞および／または細胞外マトリックスの組織構造の一体性の喪失および／または黄班細胞の機能の喪失を生じる。黄班変性関連障害の例には、AMD、North Carolina 黄班ジストロフィー、Sorsby眼底ジストロフィー、Stargardt病、パターン・ジストロフィー、Best病、優性晶洞、および放射状晶洞が含まれる。この用語は、黄班の機能不全および／または変性に先立って、またはそれらに続いて生じる黄班外変化をも包含する。したがって、「黄班変性関連障害」という用語は、黄班の一体性または機能を変化させるか、または損傷を与えるあらゆる状態をも広く含む（例えば、RPEまたはBruch膜に対する損傷）。例えば、この用語は、網膜剥離、脈絡網膜変性症、網膜変性症、光受容器変性症、RPE変性症、ムコ多糖症、桿体－錐体ジストロフィー、錐体－桿体ジストロフィー、および錐体変性症を包

含する。

【0043】

「調節」、「変更」、「調節する」、または「変更する」という用語は、本明細書では、活性または生物学的プロセス（例えば、補体プロセス）の上方調節（すなわち、活性化もしくは刺激（例えば、アゴナイズもしくは増強による））または下方調節（すなわち、阻害もしくは抑制（例えば、拮抗、減少もしくは阻害による））の両者を指すのに交換可能に用いられる。「調節する」または「変更する」はプロセスの上方調節または下方調節の両者を記述することを目的とする。特定の刺激物質によって上方調節されるプロセスはその刺激物質のアンタゴニストによって阻害されることがある。反対に、特定の刺激物質によって下方調節されるプロセスはその刺激物質のアンタゴニストによって阻害されることがある。

【0044】

「ランダム化」が意味するところは、各々の核酸およびペプチドが、それぞれ、ランダムなヌクレオチドおよびアミノ酸から本質的になることである。一般に、これらのランダム・ペプチド（または核酸、以下に論じられる）は化学的に合成されるため、あらゆるヌクレオチドまたはアミノ酸をあらゆる位置に組み込むことができる。この合成プロセスは、ランダム化タンパク質または核酸を生成し、その配列の全長にわたって可能な組合せのすべてまたは大部分が形成されることを許容し、それによりランダム化タンパク質試験作用物質のライブラリが形成されるように設計することができる。このライブラリは完全にランダム化されたものであり、配列の優先度またはいかなる位置での不変もないものであり得る。

【0045】

2つの実体の間での「特異的結合」は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9M^{-1} 、または 10^{10}M^{-1} の親和性を意味する。 10^8M^{-1} を上回る親和性が好ましい。

【0046】

「被験者」には、ヒト及び他の動物（特には哺乳動物）の両者並びに予防的もしくは治療的処置のいずれかを受ける他の生物が含まれる。

【0047】

「試験作用物質」という用語は、本明細書で用いられる場合、補体経路分子の生理活性を直接または間接的に変化させるそれらの能力についてスクリーニングすることができるあらゆる分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、小有機分子、多糖、ポリヌクレオチド等を記述する。

【0048】

「変種」は、野生型配列と比して1つ以上のアミノ酸残基が変更されているポリペプチドアミノ酸配列、または野生型配列と比して1つ以上のヌクレオチド残基が変更されているポリヌクレオチド配列を指す。他に指定されない限り、「類似体」という用語を「変種」と交換可能に用いることができる。変種は対立遺伝子変種、種変種、または誘導変種であり得る。変種は、置換されたアミノ酸が類似の構造または化学特性を有する「保存的」変化（例えば、イソロイシンでのロイシンの置換）を有することができる。あるいは、変種は「非保存的」変化（例えば、トリプトファンでのグリシンの置換）を有することもできる。類似の微小な変化にはアミノ酸欠失もしくは挿入、またはその両者も含まれ得る。どのアミノ酸残基を生物学的または免疫学的活性を消失させることなく置換、挿入、または欠失させることができるのかの決定する上での指針は、当該技術分野において公知のコンピュータ・プログラム、例えば、LASERGENE™ソフトウェアを用いて見出すことができる。

【0049】

II. 黄班変性関連障害における異常補体活性

A. 晶洞および黄班変性関連障害における補体経路分子

補体系および補体成分は様々な免疫プロセスに関与する。例えば、最終複合体または膜攻撃複合体（MAC）とも呼ばれる補体C5b-9複合体は、膜透過性の損傷を誘導することにより、細胞の死において重要な役割を果たす。下記実施例において説明されるように、本発明者らは、補体プロセスが晶洞の発達および黄班変性関連障害の病因に関連することを発見している。MACを含む多くの補体経路タンパク質が晶洞、Bruch膜、RPEの眼底表面、および／またはRPE下空間に関連することが免疫組織化学的及び生化学的研究によって見出されている（表1および2）。晶洞の組成の分析は補体系の成分、例えば、補体3、5および9、C5b-9最終

複合体、並びにC反応性タンパク質（CRP；補体活性化および免疫調節において役割を果たす血清タンパク質；Volanakis, *Ann N Y Acad Sci*, 389:235-50; 1982；およびKilpatrick et al., *J. Immunol.*, 134: 3364, 1985）の存在を明らかにしている。また、本発明者らは、晶洞中に補体プロセスに関連する他の分子、例えば、CR1（Ng et al., *Clin Exp Immunol.* 71:481-5, 1988）およびCR2（Mold et al., *J Immunol.* 140:1923-9, 1988）を含む補体系の調節因子、クラスタリン（補体C7、C8b、およびC9に結合する補体阻害剤；Tschopp et al., *J Immunol.* 151:2159-65, 1993）、ビトロネクチン（別名「補体Sタンパク質」、C5b-7およびC9に結合する補体阻害剤；Mills et al., *Clin Exp Immunol.* 92:114-9, 1993）、およびgp330／メガリン（Bachinsky et al., *Am J Pathol.* 143:598-611, 1993）も存在することを発見している。

【0050】

Bruch膜および／または晶洞中に局在するさらなる補体経路関連分子には、C3d、C6、C7、C8、C9、D因子、H因子、I因子、B因子、クラスタリン、およびマンノース結合タンパク質が含まれる。さらに、幾つかの補体経路関連分子、例えば、CD21、CD35、CD55／崩壊促進因子、およびCD59／タンパク質がRPEの眼底表面中に存在する。

【0051】

加えて、示差遺伝子発現分析（differential gene expression analyses）からのデータは、年齢一致対照との比較で、AMDドナーのRPE／脈絡膜における有意の補体経路分子（例えば、補体6、クラスタリン）の下方調節および幾つかの免疫系関連分子（Igミュー、ラムダ、J、およびカッパ鎖）の上方調節を示す（例えば、実施例5を参照）。

【0052】

異常補体活性の他の指標は、様々な黄班変性関連自己抗原に対する自己抗体の存在またはそのレベルの増加である。幾らかの自己抗体がAMD被験者の血清中に検出されている（Guerne et al., *Ophthalmology*, 1991. 98:602-7；Penfold et al., *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 1990. 228:270-4）。本発明によって同定されるさらなる黄班変性関連自己抗原には補体経路分子並びにRPE、脈絡膜、および

網膜に由来する様々なタンパク質が含まれる。実施例において論じられるように、これらの黄班変性関連自己抗原に対する自己抗体が黄班変性関連障害（例えば、AMDおよび放射状晶洞）の患者の血清中に見出された。補体経路関連分子に対する自己抗体の例にはビトロネクチンに対する自己抗体が含まれる（実施例10）。RPE、脈絡膜、または網膜タンパク質に対する自己抗体の例には、 β クリスタリン（A2、A3、A4、およびS）、カルレチクリン、14-3-3タンパク質イプシロン、セロトランスフェリン、アルブミン、ケラチン、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ビリニン2（実施例11）に加えて幾つかの他のタンパク質（実施例12）に対する自己抗体が含まれる。

【0053】

下記実施例において論じられるように、補体経路分子またはRPE、脈絡膜、もしくは網膜成分に対する自己抗体の検出は、黄班変性関連障害（例えば、AMD）を診断および治療するための別の手段を提供する。加えて、様々な黄班変性関連自己抗原のさらなる分析および同定により、黄班変性関連障害（例えば、AMD）を生じる特定の遺伝子座を同定することができる。

【0054】

まとめると、これらのデータは、補体系が晶洞の発達および黄班変性関連障害（例えば、AMD）の病因において重要な役割を果たすことを示す。

【0055】

B. RPE-脈絡膜界面における補体活性と黄班変性との相関

意味深いことに、本発明者らは、晶洞およびBruch膜において検出される補体経路関連分子の幾つかのメッセンジャーが特定の眼細胞によって局所的に産生されることも発見した（例えば、実施例3および4を参照）。これらの分子には、例えば、補体3、5および9、CRP、免疫グロブリンラムダおよびカッパ軽鎖、X因子、HLA-DR、アポリポプロテインA、アポリポプロテインE、アミロイドA、並びにビトロネクチンが含まれる。例えば、C3およびC5は、APP、クラスタリン、およびH因子と同様にRPEによって合成される。RPEによっては合成されない幾つかの他の補体成分、例えば、C9およびMASP-1は隣接脈絡膜および／または網膜細胞によって合成され、したがって、Bruch膜における補体活性化に寄与することが

できる。これらのデータは、Bruch膜における補体の活性化および、おそらくは、黄班変性関連障害の病因における局所産生補体成分の役割を示す。

【0056】

本発明者らは、RPE-脈絡膜（特に、その界面）における補体成分（例えば、C5b-9複合体）の強度および分布とAMDとの間に強い相関があることも発見している（例えば、実施例2を参照）。意味深いことに、AMDと診断されていない高齢の年齢一致ドナー（10名のドナーのうちの2名）と比較して、AMDを患うドナー（10名のドナーのうちの9名）において、全脈絡毛細管板（内皮、周皮細胞、および関連細胞外マトリックス）の強度の標識が観察された。C5b-9複合体がRPEおよび脈絡膜細胞膜と会合するという観察と組み合わせると、これらのデータは、AMD被験者の脈絡毛細管板がAMDを患っていない個体よりも厳しい攻撃の下にあり得ることを示す。AMDドナーに由来する試料中の免疫反応性C5b-9の分布およびC5b-9の検出可能なレベルは、補体経路阻害剤、例えば、クラスタリン、ビトロネクチンCD56およびCD55が最終経路を抑制することに失敗し、それによりMACの形成が許容されている可能性があることを示す。

【0057】

脈絡毛細管板に対する補体介在の損傷は、脈絡膜による異常応答（例えば、炎症、サイトカイン分泌、血管新生）および／または脈絡毛細管板細胞の死につながり得る。これらの現象は、次に、RPEおよび脈絡膜を含む周囲細胞のさらなる機能不全および死、並びに晶洞の生物発生につながり得る。実際、本発明者らは、MACが脈絡膜およびRPE細胞の両者の細胞膜に挿入されることを発見している（例えば、実施例2および3を参照）。アテローム性動脈硬化およびアルツハイマー病を含む他の疾患においても同様のプロセスが活性化されている。

【0058】

これらのデータは、Bruch膜が補体の通常の活性化表面としてその生理学的に「正常な」状態において役立つ可能性があり、活性化C5b-9が健常脈絡膜における他の構造と比較してBruch膜からの除去が不完全であるという証拠も提供する。補体活性化がRPE-脈絡膜界面で慢性的に生じ、脈絡毛細管板と会合するC5b-9の強度および分布値とAMDとの間に強い相関が存在するということは明らかであ

る。以下で論じられるように、本発明はそのような発見に従って黄班変性関連障害の新規診断および治療を提供する。

【0059】

III. 診断：黄班変性関連障害における異常補体活性

本発明は黄班変性関連障害を診断し、またはその発症の素因を決定するための方法であって、補体経路関連分子の異常レベルもしくは異常活性、または補体経路に関連する異常細胞活性を検出することによる方法を提供する。補体経路関連分子には、補体経路の発動因子、すなわち、3つの補体経路のうちのいずれかを介して補体系の活性化を直接または間接的に誘発するあらゆる分子、例えば、自己抗原、自己抗体、免疫複合体、またはMBLが含まれる。また、補体活性化の過程で産生されるか、または役割を果たす分子、例えば、補体タンパク質／酵素（例えば、C3、C5、C5b-9、B因子、MASP-1、およびMASP-2）並びに受容体もしくは阻害剤（例えば、ビトロネクチン、CR1、およびビトロネクチン）も含まれる。さらに、本発明の方法で診断することができる補体経路関連分子には、活性化した補体系によって調節される分子（例えば、MACIF）も含まれる。活性化した補体系によって調節される細胞活性には、例えば、C5b-9攻撃複合体から生じる細胞の損傷、血管透過性の変化、平滑筋細胞の収縮および移動、T細胞の増殖、免疫粘着、樹状細胞、単球、顆粒球および血小板の凝集、食作用、好中球（PMN）およびマクロファージの移動および活性化が含まれる。本発明の診断方法は、これらの補体経路関連分子または細胞活性のいずれにおける異常の検出をも包含する。さらに、本発明の診断方法は、補体系によって直接上方調節または下方調節される分子の異常なレベルまたは活性の検出も指向する。

【0060】

典型的には、診断試験は、被験者における少なくとも1つの補体経路分子の測定されたレベル（発現レベルまたは生化学的活性）を黄班変性関連障害に罹患していない対照被験者集団において決定された基線レベルと比較することによって機能する。測定されたレベルが対照集団における基線レベルと有意には異なっていない場合、その診断試験の結果は陰性と考えられる。他方、被験者における測定されたレベルと非罹患被験者における基線レベルとの間に有意の逸脱がある場

合、それは診断試験の陽性結果を表し、その被験者はその補体経路分子の異常なレベルまたは活性を有するものと考えられる。

【0061】

被験者間の固有の変動および実験誤差のため、測定された値が非罹患被験者において典型的に観察される範囲の外にある場合、逸脱は有意であると考えられる。例えば、幾つかの方法においては、測定されたレベルが対照集団におけるレベルの平均プラス1標準偏差内にない場合、逸脱を有意と考えることができる。典型的には、測定されたレベルと基線レベルとの差が少なくとも20%、30%、または40%である場合、有意の逸脱が生じる。好ましくは、差は少なくとも50%または60%である。より好ましくは、差は少なくとも70%または80%を上回る。最も好ましくは、差は少なくとも90%である。対照集団における測定値と基線値との逸脱の程度は、その診断のあり得る精度、および／または被験者が被る疾患の重篤性の指標も提供する。

【0062】

被験者由来の様々な生物学的試料、例えば、あらゆる器官、組織、または細胞から得られる試料の他に、血液、尿、または他の体液（例えば、眼液）を検出に用いることができる。幾つかの診断方法については、好ましい試料は眼液である。他の幾つかの方法については、好ましい組織試料は全血およびそれらから誘導される生成物、例えば、血漿および血清である。血液試料は、例えばガスリーカードから、採取された血液スポットから得ることができる。他の組織試料源は皮膚、毛髪、尿、唾液、精液、糞便、汗、乳、羊水、肝臓、心臓、筋肉、腎臓及び他の身体器官である。他の組織源は被験者に由来する一次細胞から増殖した細胞株である。組織試料は、典型的には、溶解してその試料中の細胞のタンパク質および／または核酸含有物を放出させる。そのような粗製溶解物からのタンパク質または核酸には、次に、分析に先立って部分的な、または完全な精製を施すことができる。

【0063】

幾つかの方法においては、複数のマーカーに対する複数の診断試験を同じ被験者に対して行う。典型的には、複数の試験を同じ生物学的試料の異なるアリコー

トに対して行う。しかしながら、同じ組織源に由来する別々の試料、または異なる組織源に由来する複数の試料に対して複数のアッセイを行うこともできる。例えば、1つのマーカーについての試験を血漿試料に対して行い、第2のマーカーについての試験を全血試料に対して行うことができる。幾つかの方法においては、複数の試料を同じ被験者から異なる時点で得る。このような方法においては、複数の試料は典型的には同じ組織、例えば、全血清に由来する。

【0064】

A. 補体経路分子の異常レベルの診断

本発明は、黄班変性関連障害の存在またはその発症の素因を示す補体経路関連分子の異常レベルを検出するための方法を提供する。補体経路関連タンパク質の異常レベルまたは補体経路関連タンパク質をコードするmRNAの異常レベルのいずれかを検出することができる。例えば、補体タンパク質（例えば、C6、C3、C5、C6）または他の補体経路分子（例えば、クラスタリン、CRP、またはIg鎖）が黄班変性関連障害（例えば、AMD）の疾患状態またはそれを発症する素因を示すものであり得る。異常mRNAレベルまたは異常タンパク質レベルのいずれかを検出することができる。異常発現は上方調節または下方調節のいずれでもあり得る。

【0065】

補体経路関連分子の異常タンパク質レベルを検出するのに様々な免疫組織化学的及び生化学的アッセイを用いることができる。例えば、補体成分または代替もしくは古典経路の活性化において生じる分割生成物のレベルは、例えば、Buyon et al., Arthritis Rheum, 35:1028-37, 1992（例えば、Ba、Bb、SC5b-9、およびC4dの血漿レベル）；Langlois et al., J Allergy Clin Immunol, 83:11-6, 1989（C3a、C4a、C5a、C1rC1s-C1阻害剤複合体、および最終C複合体C5b-9の血清レベル）、およびCaraher et al., J Endocrinol, 162:143-53, 1999において説明されるように測定することができる。これらの方法は、特定の黄班変性関連障害を患っているか、または発症していることが疑われる被験者におけるあらゆる補体経路関連タンパク質の体液濃度を検出するのに容易に用いることができる。対照として、それぞれその特定の黄班変性関連障害を患っているか、または患っていない被験者に対しても補体経路関連タンパク質の発現レベルを測定する。

【0066】

補体経路分子をコードするmRNAについては、被験者に由来する生物学的試料中の異常レベルを検出するのに利用可能な幾つかの方法が存在する。まず、被験者の生物学的試料から得られた核酸を増幅することができる。増幅技術は当業者に公知であり、限定されるものではないが、クローン化、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、特定の対立遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応（ASA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ネスト化ポリメラーゼ連鎖反応、自己持続配列複製（Guatelli, J.C. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh, D.Y. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、およびQ-ベータ・レプリカーゼ（Q-Beta Replicase）（Lizardi, P.M. et al., 1988, Bio/Technology 6:1197）が含まれる。

【0067】

所定の補体経路関連分子の遺伝子発現レベルを決定するため、当該技術分野において日常的に実施されている方法、例えば、示差表示法、ノーザン分析、RT-PCR、およびDNAプローブ・アレイを被験者における所定の補体経路関連の発現レベルを検出するのに用いることができる。幾つかの補体経路関連分子の発現レベル、または黄班変性関連障害を患うか、または患っていない対照被験者集団における所定の補体経路関連分子の発現レベルのフィンガープリント・プロフィールを、当該技術分野、例えば、W099/23254；およびCronin et al. Human Mutation 7:244, 1996において説明される方法を用いて生成させることができる。

【0068】**B. 補体経路分子または自己抗原をコードする核酸の変種形態の診断**

本発明は、黄班変性関連障害を診断し、またはそれを発症する素因を決定するための方法であって、少なくとも1つの、補体経路関連分子または自己抗原（例えば、RPEタンパク質、脈絡膜タンパク質、網膜タンパク質、または眼組織に結合する他の組織に由来する自己抗原）をコードする核酸分子の変種形態を検出することによる方法を提供する。これらの核酸は、例えば、ゲノムDNA、cDNA、またはmRNAであり得る。野生型核酸配列と比較して、変種核酸は点突然変異、フレームシフト突然変異、または欠失を有し得る。幾つかの方法においては、変種核

酸は、一ヌクレオチド多形を除いて、野生型配列を有することができる。

【0069】

現在、様々な手段が変種遺伝子または核酸の検出に利用可能である。例えば、ヒト多形部位での特定の対立遺伝子の検出に多くの方法を利用することができる。例えば、補体経路遺伝子における一ヌクレオチド多形は、例えば、Mundyら、米国特許第4,656,127号；Cohenら、フランス特許第2,650,840号；およびW091/02087に説明されるように検出することができる。DNAにおける多形部位をアッセイするためのさらなる手順が、Komher, J. S. et al., Nucl. Acids. Res. 17:779-7784 (1989)；Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18:3671 (1990)；Syvanen, A. -C., et al., Genomics 8:684-692 (1990)；Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147 (1991)；Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1:159-164 (1992)；Ugozzoli, L. et al., GATA 9:107-112 (1992)；Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208:171-175 (1993)に説明されている。

【0070】

コードする変種核酸を検出する他の適切な技術は、例えば米国特許第4,998,617号およびLandegren, U.ら ((1988) Science 241:1077-1080) に記載される、オリゴヌクレオチド・ライゲーション・アッセイ (OLA) ；または、例えばSaiki et al. (1986) Nature 324:163；およびSaiki et al (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230に記載される、選択的オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションである。タンパク質翻訳の成熟前終結を生じる突然変異については、タンパク質切断試験 (PTT) が効率的な診断アプローチを提供する (Roest, et. al., (1993) Hum. Mol. Genet. 2:1719-21；van der Lijdt, et. al., (1994) Genomics 20:1-4)。RNA/RNAまたはRNA/DNAまたはDNA/DNAヘテロ二重鎖における不一致塩基は、例えば、Myers, et al., Science 230:1242, 1985に説明される通りに検出することができる。

【0071】

加えて、様々な配列決定反応を対立遺伝子の直接配列決定に用いることができる。例示的な配列決定反応には、Maxim and Gilbert ((1977) Proc. Natl Acad

Sci USA 74:560) またはSanger (Sanger et al (1977) Proc. Nat. Acad. Sci U SA 74:5463) によって開発された技術に基づくものが含まれる。また、質量分析による配列決定 (例えば、PCT公開WO 94/16101; Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffin et al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159を参照) を含む主題アッセイ (例えば、Biotechniques (1995) 19:448を参照) を実施するとき、様々な自動配列決定手順のいずれもが利用可能であることも意図される。

【0072】

本明細書に説明される診断において用いるための核酸試料を得るのにあらゆる細胞型または組織を用いることができる。例えば、DNA試料は血液、体液 (例えば、眼からの分泌)、尿、または唾液から得られる。幾つかの方法においては眼から得られる試料が好ましく、これは、眼に由来する試料から得られる試験結果が、異常発現または活性がおそらくは眼の機能不全、例えば、黄班変性症のためであることを立証し、それにより黄班変性関連障害のより迅速かつ正確な診断結果をもたらすためである。幾つかの方法においては、乾燥試料 (例えば、毛髪または皮膚) に対して核酸試験を行うことができる。これらの診断方法は、核酸精製を必要としないように、イン・サイツで、生検または切除から得られる被験者組織の組織断片 (固定および/または凍結) に対して直接行うこともできる。核酸試薬をそのようなイン・サイツ手順のプロブおよび/またはプライマーとして用いることができる (例えば、Nuovo et al., 1992, PCR in situ hybridization: protocols and applications, Raven Press, NYを参照)。

【0073】

主としてある核酸配列の検出に焦点を合わせる方法に加えて、プロフィールをそのような検出スキームにおいて評価することもできる。フィンガープリント・プロフィールを説明されるように生成させることができる。

【0074】

本発明は、黄班変性関連障害を発症する素因を検出するためのキットも提供する。このキットは、少なくとも1種類の補体経路分子の5' および3' にハイブリダイズする5' および3' オリゴヌクレオチドを含む1種類以上のオリゴヌクレオ

チドを有することができる。これらのアッセイ・キットおよび診断方法は、標識オリゴヌクレオチドを用いてアッセイにおける同定を容易にすることもできる。用いることができる標識の例には、放射標識、酵素、蛍光性化合物、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、磁気部分、金属結合性部分、抗体もしくは抗体部分等が含まれる。

【0075】

C. 補体系の異常活性の診断

本発明は、黄班変性関連障害を診断し、またはその発症の素因を決定するための方法であって、補体系の異常生体活性を検出することによる方法も提供する。検出しようとする異常活性は、3つの補体経路の各々の活性化を誘発するものであり得る。異常活性は、3つの補体経路の活性化の過程で生じる個々の分子のものであってもよい。検出しようとする異常補体活性は、活性化された補体系によって呈示される細胞活性のいずれかであってもよい。したがって、本発明で検出しようとする異常補体活性には、例えば、補体経路タンパク質、例えば、C3a、C5a、C5b-9複合体、ビトロネクチン、もしくはCR1の酵素もしくは調節機能の増加および減少、補体成分に対する自己抗体の血清中の存在もしくはそのレベルの増加、活性化した補体系が介在する異常細胞活性、例えば、標的細胞（例えば、RPEおよび脈絡膜細胞）の溶解、走化性、オプソニン作用、血管および他の平滑筋細胞の刺激、肥満細胞の脱顆粒、小血管の透過性の増加、炎症プロセスの開始、白血球の指向性移動および活性化、並びにBリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、および好中球の活性化を包含される。

【0076】

各々の補体生体活性に関して、異常性は、試験被検体に由来する生物学的試料（例えば、血液）において検出される活性と黄班変性関連障害を患っていない対照被験者集団において検出される活性の平均値との差を指す。好ましくは、この差は少なくとも20%、30%、または40%である。より好ましくは、この差は少なくとも50%、60%、70%、または80%を上回る。最も好ましくは、この差は少なくとも90%である。

【0077】

1. 補体活性化の検出

補体経路分子の活性および補体系の活性化を測定するのに様々な方法を用いることができる（例えば、米国特許第6,087,120号；およびNewell et al., J Lab Clin Med, 100:437-44, 1982を参照）。例えば、補体活性は、(i) 赤血球細胞の補体介在溶解（溶血）の阻害の測定；(ii) C3またはC5の開裂を阻害する能力の測定；および(iii) 代替経路介在溶血の阻害によって監視することができる。

【0078】

2つの最も一般的に用いられる技術は、溶血アッセイ（例えば、Baatrup et al., Ann Rheum Dis, 51:892-7, 1992を参照）および免疫学的アッセイ（例えば、Auda et al., Rheumatol Int, 10:185-9, 1990）である。溶血技術では全配列—古典または代替経路のいずれの機能的能力を測定する。免疫学的技術では特定の補体成分または分割産生物のタンパク質濃度を測定する。本発明の方法において補体活性化の検出または補体成分の活性の測定に用いることができる他のアッセイには、例えば、T細胞増殖アッセイ（Chain et al., J Immunol Methods, 99:221-8, 1987）、および遅延型過敏性（DTH）アッセイ（Forstrom et al., 1983, Nature 303:627-629；Halliday et al., 1982, in Assessment of Immune Status by the Leukocyte Adherence Inhibition Test, Academic, New York pp. 1-26；Koppi et al., 1982, Cell. Immunol. 66:394-406；および米国特許第5,843,449号）が含まれる。

【0079】

溶血技術においては、すべての補体成分が存在し、かつ機能的でなければならない。したがって、溶血技術は補体系の機能的な一体性および欠乏の両者をスクリーニングすることができる（例えば、Dijk et al., J Immunol Methods 36: 29-39, 1980；Minh et al., Clin Lab Haematol. 5:23-34 1983；およびTanaka et al., J Immunol 86: 161-170, 1986を参照）。古典経路の機能的能力を測定するには、ヘモリシン（ヒツジ赤血球細胞に対するウサギIgG）でコートしたヒツジ赤血球細胞を標的細胞（感作細胞）として用いる。これらのAg-Ab複合体は古典経路を活性化し、それらの成分が機能的で適切な濃度で存在するとき、標的細胞

胞の溶解を生じる。代替経路の機能的能力を決定するには、ウサギ赤血球を標的細胞として用いる（例えば、米国特許第6,087,120号を参照）。

【0080】

溶血補体測定は、それが細胞溶解を誘導する補体の機能に基づき、これが完全な範囲の機能的補体タンパク質を必要とするため、例えば被験者の血液中の、補体タンパク質の欠乏および機能障害の検出に適用可能である。古典経路の活性化を決定するいわゆるCH50法、および代替経路用のAP50法は全血清の代わりに特定の単離補体タンパク質を用いることによって拡張されており、これに対して高度に希釈された試験試料は未知濃度の限定された補体成分を含む。この方法により、どの成分が欠乏しているかを示す、補体系のより詳細な測定を行うことができる。

【0081】

免疫学的技術は、例えば、補体成分の分割産生物を検出するのに、様々な補体成分（例えば、C3、C4およびC5）の異なるエピトープに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる（例えば、Hugli et al., *Immunoassays Clinical Laboratory Techniques* 443-460, 1980; Gorski et al., *J Immunol Meth* 47:61-73, 1981; Linder et al., *J Immunol Meth* 47:49-59, 1981; およびBurger et al., *J Immunol* 141:553-558, 1988を参照）。そこで、既知濃度の標識分割産生物との競合における抗体と分割産生物との結合を測定することができる。様々なアッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA、および放射拡散アッセイを補体分割産生物の検出に利用することができる。

【0082】

免疫学的技術は、それらが試験被験者および黄班変性関連障害の有無を問わない対照被験者に由来する血液中での分割産生物形成の測定を可能にするため、補体活性化の検出に高感度をもたらす。したがって、本発明の幾つかの方法においては、試験被験者に由来する血漿中の補体成分（例えば、C3a、C4a、C5a、およびC5b-9最終複合体）の可溶性分割産生物を定量することで異常補体活性化を測定することにより、黄班変性関連障害の診断が得られる。これらの測定は、例えば、Chenoweth et al., *N Engl J Med* 304:497-502, 1981; およびBhakdi et al.

., Biochim Biophys Acta 737:343-372, 1983に説明されるように行うことができる。好ましくは、イン・ビボで形成される補体活性化のみを測定する。これは、補体系の阻害剤を含む培地中に被験者に由来する生物学的試料（例えば、血清）を集め、続いて試料中の補体の活性化を測定（例えば、分割産生物の定量化）することによって達成することができる。

【0083】

2. 黄班変性関連自己抗原に対する自己抗体または免疫複合体の検出

組織特異的抗原、新抗原、および／または補体経路分子に対する自己抗体の異常な存在またはレベルの増加も黄班変性関連障害の発症の素因の指標であり得る。したがって、本発明は、黄班変性関連障害を診断し、またはその発症の素因を決定するための方法であって、黄班変性関連自己抗原に対する自己抗体を検出することによる方法を提供する。また、本発明の診断方法は、これもまた黄班変性関連障害を示すものであり得る循環免疫複合体を被験者において検出することをも指向する。

【0084】

上で論じられるように、様々な黄班変性関連自己抗原に対する自己抗体が黄班変性関連障害を患う被験者に由来する血清中に見出された。このような自己抗原には、補体経路分子およびRPE、脈絡膜、および網膜に由来する様々な自己抗原が含まれる。したがって、診断は、黄班変性関連自己抗原、例えば、ビトロネクチン、 β クリスタリン、カルレチクリン、セロトランスフェリン、ケラチン、ピルビン酸カルボキシラーゼ、C1、およびビリニン2に対する血清自己抗体に向けることができる。例えば、幾つかの方法においては、眼の組織から抽出したタンパク質を用いて、眼組織（例えば、RPE、脈絡膜）に由来するあらゆる自己抗原への特異的結合について試験被験者に由来する血液試料（例えば、血清）を検査する。例えば、非ヒト動物（例えば、ラット）または死亡したヒトに由来する眼の組織から抽出したタンパク質を、被験者に由来する血清における眼自己抗原に対する自己抗体のスクリーニングに用いることができる。

【0085】

幾つかの方法においては、診断は新抗原に対する自己抗体の検出をも含む。新

抗原は、様々なプロセス、例えば、酸化による、既存の分子の修飾および／または架橋から生じる抗原である。新抗原の例には、アテローム性動脈硬化において酸化LDLと会合する新抗原 (Reaven et al., Adv Exp Med Biol, 366(-HD-):113-28, 1994; Kita et al., Ann N Y Acad Sci, 902(-HD-):95-100, 2000)、または他の疾患における酸化誘導複合体 (Ratnoff et al., Am J Reprod Immunol, 34:72-9 1995; およびDebrock et al., FEBS Lett, 376:243-6, 1995) が含まれる。さらに、他の組織に由来する自己抗原に対する自己抗体の検出が黄班変性関連障害の全身性を示すものであり得る。

【0086】

幾つかの生化学的または免疫化学的技術を被験者に由来する生物学的試料における自己抗体の検出に容易に用いることができる。例えば、当該技術分野において日常的に実施される技術、例えば、免疫沈殿またはラジオイムノアッセイは血清試料中の自己抗体の検出に適する。補体タンパク質または補体調節タンパク質に対する自己抗体を検出するための様々な他の方法が当該技術分野において記述されている。例えば、Pinterらは、多発性硬化症を患う被験者に由来する血清中でヒト細胞の膜において発現する2種類の補体調節分子 (CD46およびCD59) に対する自己抗体の検出を記述した (J Neurovirol, 6 Suppl 2:S42-6, 2000)。Strifeらは、膜性増殖性糸球体腎炎におけるC3転換酵素C3bBbおよびC3bBbPに対する血清自己抗体の検出を記述した (J Pediatr. 116:S98-102, 1990)。Ravelliらは、小児発症全身性エリテマトーデスを患う被験者における補体C1qに対する自己抗体を開示した (Clin Exp Rheumatol. 15:215-9, 1997)。下記実施例において論じられるように、これらの方法は、例えば、黄班変性関連障害を患うことが疑われる被験者に由来する血清における、補体成分に対する自己抗体の検出に容易に適用することができる。

【0087】

循環免疫複合体の有意義性は当該技術分野において十分文書化されている。例えば、糸球体腎炎の原因機構は、典型的には、腎臓における循環免疫複合体の堆積である (例えば、米国特許第6,074,642号を参照)。個々の補体成分の活性化および消費の結果としての循環免疫複合体も多くの他のヒト疾患において生じる

ことが示されている（例えば、米国特許第5,221,616号を参照）。循環免疫複合体の検出も黄班変性関連障害において診断上の価値があるものであり得る。例えば、Tomimori-Yamashita et al., Lepr Rev, 70(3):261-71, 1999（抗体ベースの酵素結合免疫吸着検定）；Krapf et al., J Clin Lab Immunol, 21(4):183-7, 1986（蛍光結合免疫吸着検定）；Kazeem et al., East Afr Med J, 67(6):396-403, 1990（レーザー免疫比濁分析）；およびRodrick et al., J Clin Lab Immunol, 7(3):193-8, 1982（プロテインA-グラスファイバー・フィルター・アッセイ、PA-GFF、およびポリエチレングリコール不溶化アッセイ）に記載されるように、被験者において循環免疫複合体を検出するのに幾つかのアッセイが日常的に実施される。これらの公知アッセイの各々を本発明のために循環免疫複合体を検出するのに用いることができる。

【0088】

D. 黄班変性関連障害を診断するための追加試験

上記診断試験が陽性の結果をもたらす場合、その被験者は、最低限、黄班変性関連障害に感受性であるか、またはその危険性があるものと識別されている。その後、典型的には、その被験者はさらなる試験またはスクリーニングを受ける。例えば、本発明者らは、黄班変性と脈絡毛細管分におけるC5b-9複合体の分布との間に相関があることを見出している。したがって、追加試験またはスクリーニングは、以下に説明される眼科的手順のうちの1つによる患者の眼の眼組織（例えば、脈絡毛細管板）の機能または物理的一体性の検査を含むことができる。また、追加試験またはスクリーニングは、未だ試験されていないさらなる補体経路分子の分析を含むこともできる。追加試験またはスクリーニングは、以下で論じられるように、しばしば黄班変性関連障害と相関する黄班変性関連遺伝子マーカー、晶洞関連表現型マーカー、または晶洞関連遺伝子型マーカーの存在の検査を含むこともできる。

【0089】

黄班変性関連遺伝子マーカーは、黄班変性関連障害を発症する危険性と相関することが示されている遺伝子座である。このようなマーカーは、例えば、WO 00/52479に記載されており、例えば、1p21-q13、劣性Stargardt病またはfundus

flavi maculatus用 (Allikmets et al. Science 277:1805-1807, 1997) ; 1q25-
 -q31、劣性AMD用 (Klein et al., Arch. Ophthalmol. 116:1082-1088, 1988)
 ; 2p16、優性放射状黄班晶洞、優性Doyle蜂窩状網膜変性、または放射状晶洞用
 (Edwards et al., Am. J. Ophthalmol. 126:417-424, 1998) ; 6p21.2-cen、
 優性黄班変性、成人卵黄形成 (adult vitelloform) 用 (Felbor et al. Hum. Mu-
 tat. 10:301-309, 1997) ; 6p21.1、優性錐体ジストロフィー用 (Payne et al.
 Hum. Mol. Genet. 7:273-277, 1998) ; 6q、優性錐体-桿体ジストロフィー用 (
 Kelsell et al. Am. J. Hum. Genet. 63:274-279, 1998) ; 6q11-q15、優性黄
 班変性、Stargardt様疾患用 (Griesinger et al., Am. J. Hum. Genet. 63:A30,
 1998) ; 6q14-q16.2、優性黄班変性、North Carolina型用 (Robb et al., Am.
 J. Ophthalmol. 125:502-508, 1998) ; 6q25-q26、優性網膜錐体ジストロフィ-
 ー1 ((<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, (1998))) ; 7p21-p15、優性クリ
 ストイド (cystoid) 黄班変性用 (Inglehearn et al., Am. J. Hum. Genet. 55:
 581-582, 1994) ; 7q31.3-32、優性第三色盲、タンパク質：青色錐体オプシン用
 (Fitzgibbon et al., Hum. Genet. 93:79-80, 1994) ; 11p12-q13、優性黄班
 変性、Best型 (ベストロフィン) 用 (Marquardt et al., Hum. Mol. Genet. 7:1
 517-1525, 1998) ; 13q34、優性黄班変性、Stargardt型用 (Zhang et al., Arch.
 Ophthalmol. 112:759-764, 1994) ; 16p12.1、劣性Batten病 (Munroe et al.,
 Am. J. Hum. Genet. 61:310-316, 1997) ; 17p、優性疎性脈絡膜ジストロフィ-
 ー用 (Lotery, A. J. et al., Ophthalmol. Vis. Sci. 37:1124, 1996) ; 17p13-
 -p12、優性錐体ジストロフィー、進行性用 (Small et al., Am. J. Ophthalmol.
 121:13-18, 1996) ; 17q、錐体桿体ジストロフィー用 (Klystra, J. A. et al.
 , Can. J. Ophthalmol. 28:79-80, 1993) ; 18q21.1-q21.3、錐体-桿体ジス
 トロフィー、de Grouchy症候群用 (Manhant, S. et al., Am. J. Hum. Genet. 5
 7:A96, 1995 ; Warburg, M. et al., Am. J. Med. Genet. 39:288-293, 1991) ;
 19q13.3、優性錐体-桿体ジストロフィー用 ; 劣性、優性および「新規」Leber先
 天性黒内障 ; 優性RP ; タンパク質：錐体-桿体otx用光受容器ホメオボックス転
 写因子 (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:1876-1881, 1998) ; 22q12
 .1-q13.2、優性Sorsby眼底ジストロフィー、メタロプロテアーゼ-3 (TIMP3)

の組織障害剤用 (Felbor et al., Am. J. Hum. Genet. 60:57-62, 1997) ; およびXp11.4、X連結錐体ジストロフィー用 (Seymour et al., Am. J. Hum. Genet. 62:122-129, 1998) が含まれる。

【0090】

黄班変性関連障害または晶洞関連障害と相関する晶洞関連表現型または遺伝子型マーカーはWO 00/52479に記載されている。晶洞関連表現型マーカーの例には、特には黄班における、RPEの機能不全および／または死、免疫介在現象、樹状細胞の活性化、移動及び分化、(例えば、CD68、CD1aおよびS110のような樹状細胞マーカーの存在またはレベルの検出による) RPE下空間への樹状細胞プロセスの突出、地域的萎縮 (geographic atrophy) または円形瘢痕の存在、脈絡膜血管新生および／または脈絡膜線維形成の存在が含まれる。晶洞関連遺伝子型マーカーの例には、突然変異遺伝子および／または示差遺伝子発現の異なるパターンが含まれる。機能不全および／または瀕死RPE細胞によって発現する遺伝子には、HLA-DR、CD68、ビトロネクチン、アポリポプロテインE、クラスタリンおよびS-100が含まれる。AMDにおいて脈絡膜およびRPE細胞によって発現される遺伝子には、熱ショックタンパク質70、デス・プロテイン (death protein) 、プロテアソーム、Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼ、カテプシン、およびデス・アダプタータンパク質RAIDDが含まれる。晶洞形成に関連する免疫介在現象に關与する他のマーカーには、自己抗体 (例えば、晶洞、RPEおよび／または網膜成分を指向する)、白血球、樹状細胞、筋線維芽細胞、VI型コラーゲン、並びにケモカインおよびサイトカインの中核が含まれる。補体タンパク質に加えて、晶洞と会合する他の分子には、免疫グロブリン、アミロイドA、アミロイドP成分、HLA-DR、フィブリノーゲン、X因子、プロトロンビン、C反応性タンパク質 (CRP) アポリポプロテインA、アポリポプロテインE、アンチキモトリプシン、トロンボスポンジン、およびビトロネクチンが含まれる。晶洞関連樹状細胞のマーカーには、CD1a、CD4、CD14、CD68、CD83、CD86、およびCD45、PECAM、MMP14、ユビキチン、およびFGFが含まれる。T細胞の認識に關与する重要な樹状細胞関連アクセサリ分子には、ICAM-1、LFA1、LFA3、およびB7、IL-1、IL-6、IL-12、TNF α 、GM-CSFおよび熱ショックタンパク質が含まれる。樹状細胞の発現に関連するマーカー

ーには、コロニー刺激因子、TNF α 、およびIL-1が含まれる。樹状細胞の増殖に関連するマーカーには、GM-CSF、IL-4、IL-3、SCF、FLT-3およびTNF α が含まれる。樹状細胞の分化に関連するマーカーには、IL-10、M-CSF、IL-6およびIL-4が含まれる。線維形成に関連するマーカーには、BIG H3の減少、 β 1インテグリンの増加、コラーゲンの増加（例えば、コラーゲン6 α 2およびコラーゲン6 α 3）、エラスチンの増加、およびヒト・メタロエラスターゼ（HME）の増加が含まれる。

【0091】

他の表現型または遺伝子型マーカーは上記アッセイ、例えば、遺伝子、mRNA転写体、またはコードされたタンパク質の同一性、発現レベル、または活性の検出で検出することができる。幾つかのマーカーは1つ以上の眼科的手順、例えば、眼底フルオレセイン血管造影（FFA）、インドシアニンググリーン血管造影（ICG）、眼底検眼鏡もしくは写真（FP）、網膜電図（ERG）、電気眼球図（EOG）、視野、走査レーザー検眼鏡（SL0）、視力測定、暗順応測定または他の標準法によって検出することができる。眼科的手順は様々な黄班変性関連障害の患者の評価に用いられている。例えば、Spraulら（Klin Monatsbl Augenheilkd, 21:141-8, 1998）は、AMD患者の評価への光学的干渉トモグラフィーの使用を記述する；Kohnら（Bull Soc Belge Ophtalmol, 259(-HD-):81-8, 1995）は、インドシアニンググリーン血管造影において減算法を用いる年齢関連黄班変性における脈絡膜血管新生の検出を報告する；Kuckら（Retina, 13:36-9, 1993）は浸出性年齢関連黄班変性の患者の検査を論じ、網膜下血管新生膜の臨床的徴候を走査レーザーフルオレセイン血管造影によって検査した；Kaluznyら（Klin Oczna, 101:355-9, 1999）およびYuzawaら（Eur J Ophthalmol, 2:115-21, 1992）は、年齢関連黄班変性における潜在性脈絡膜血管新生の診断でのインドシアニンググリーン（ICG）血管造影の使用を記述する；Lubinskiら（Klin Oczna, 100:263-8, 1998）は、健常被験者および異なる黄班疾患の患者における中心窩錐体網膜電図（FCERG、限局性ERGのタイプ）での中心窩錐体機能の評価を報告した；並びに、Kakehashiら（Jpn J Ophthalmol, 40:116-22, 1996）は、走査レーザー検眼鏡（SL0）を用いる黄班破壊の差別的診断を論じた。これらの手順のすべては本発明の診断方法と

組み合わせて用いることができる。例えば、RPEのレベルで血管を識別するのに眼底オートフルオレセイン (autofluorescein) 血管造影を用いることができる (例えば、Delori et al., Invest Ophthalmol, 14:487-92, 1975; Holz et al., Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 237:145-52, 1999; および Delori et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 36:718-29, 1995)。

【0092】

さらなる試験またはスクリーニングは黄班変性関連障害の臨床症状の監視も含むことができ、これには、晶洞の存在、網膜色素変化が含まれ、並びに視力が大幅に冒されていない黄班変性の早期段階 (「乾燥」黄班変性)、萎縮性黄班変性、および血管新生が蔓延する浸出性疾患 (「湿潤」黄班変性) が含まれる。さらなるスクリーニングは、黄班変性関連障害を患う関連家族メンバーについての家族歴の分析、および／または (上述のように) 黄班変性関連障害に関連する多形の遺伝子分析を含むこともできる。これらの追加試験の1つ以上の結果として、異常な補体活性または発現レベルに基づく初期診断を確認することができ (または他の方法で)、かつ被験者を冒す特定のタイプの黄班変性関連障害を同定することができる。

【0093】

IV. 治療：黄班変性関連障害の予防および治療

本発明は、被験者における黄班変性関連障害を治療または予防するための方法であって、その被験者に補体系の活性を調節する治療薬を投与することによる方法を提供する。補体系の有害な非特異的活性化、または代替経路による望ましくない活性化を本発明の治療薬によって予防または治療することができる。例えば、上で論じられるように、脈絡毛細管板はAMD患者においてMAC攻撃の標的として関与しており、MACは脈絡膜およびRPE細胞膜に存在する。したがって、幾つかの方法においては、治療薬はC5b-9複合体によって生じる脈絡毛細管板および／またはRPEの損傷の予防または緩和に向けられる。幾つかの方法においては、治療は、例えば、ビトロネクチンもしくはクラスタリンのような阻害剤、または補体成分C8アルファ・サブユニットに対するモノクローナル抗体を用いる、C5b-9膜攻撃複合体の形成の阻害に向けられる (例えば、Abraha et al., A ; Biochem J

，264:933-6，1989を参照）。

【0094】

本発明の治療は、補体経路関連分子の他に活性化した補体系によって調節される細胞活性に向けられる。したがって、本発明の治療薬の標的には、補体経路の発動因子のいずれか（例えば、自己抗体）、補体活性化の過程で生じる分子、補体活性化の結果として生じるか、もしくは異なるように調節される分子、および活性化された補体系によって調節される分子（例えば、MACIF）が含まれ得る。治療薬は、補体系が直接もしくは間接的に介在する細胞活性（生物学的もしくは免疫機能）を調節するのに用いることもできる。したがって、本発明の治療薬は細胞活性、例えば、標的細胞の溶解、オプソニン化、血管細胞の刺激、肥満細胞の脱顆粒化、小血管の透過性の増加、白血球の指向性移動、並びにBリンパ球、マクロファージ、樹状細胞、単球および好中球の活性化に向けることができる。これらの細胞機能は本発明の治療薬でアンタゴナイズまたはアゴナイズすることができる。

【0095】

A. 一般的な考察

治療に馴染みやすい被験者には、現時点で無症候であるが後に症候性黄班変性関連障害を発症する危険性がある者である。例えば、ヒト個体には、そのような疾患を経験している身内がいる者、および遺伝子もしくは生化学的マーカーの分析により、生化学的方法により、または他のアッセイ、例えば、（上述のような）T細胞増殖アッセイにより危険性が決定されている者が含まれる。

【0096】

治療に馴染みやすい他の被験者には、黄班変性関連疾患以外の既知補体関連疾患がない個体が含まれる。補体関連疾患または障害は当該技術分野において、例えば、米国特許第6,169,068号に記載されている。公知の補体関連疾患の例には、神経性障害、多発性硬化症、脳卒中、ギラン・バレー症候群、外傷性脳傷害、パーキンソン病、不適切もしくは望ましくない補体活性化の障害、血液透析合併症、超急性同種移植拒絶、異種移植拒絶、IL-2療法の過程でのインターロイキン-2誘導毒性、炎症性障害、自己免疫疾患の炎症、クローン病、成人呼吸促進

症候群、熱傷もしくは凍傷を含む熱的傷害、虚血後再灌流状態、心筋梗塞、バルーン血管形成、心肺バイパスもしくは腎臓バイパスにおけるポンプ後症候群、血液透析、腎虚血、皮膚腺再構築後の腸間膜動脈再灌流、感染性疾患もしくは敗血症、免疫複合体障害および自己免疫疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、SLE腎炎、増殖性腎炎、溶血性貧血、並びに重症筋無力症が含まれる。加えて、他の公知補体関連疾患は肺疾患および障害、例えば、呼吸困難、咯血、ARDS、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺気腫、肺栓塞および梗塞、肺炎、線維形成性粉塵疾患、不活性粉塵および鉱物（例えば、ケイ素、石炭粉塵、ベリリウム、およびアスベスト）、肺線維症、有機粉塵疾患、（刺激性ガスおよび化学物質、例えば、塩素、ホスゲン、二酸化硫黄、亜硫酸水素、二酸化窒素、アンモニア、および塩酸による）化学的傷害、煙傷害、熱的傷害（例えば、熱傷、凍結）、喘息、アレルギー、気管支収縮、過敏性肺炎、寄生虫症、グッドパスツール症候群、肺血管炎、並びに免疫複合体関連炎症である。

【0097】

黄班変性関連障害を発症する危険性の遺伝子マーカーは上述されている。無症候個体におけるこれらの遺伝子マーカーのいずれかの存在は、それまでは症状を生じるまでには進行してないものの、黄班変性関連障害につながる補体経路介在プロセスがおそらくは進行中であることを示す。

【0098】

生化学的マーカーは前のセクションにおいて説明されるもの、例えば、補体経路分子の異常活性もしくは異常レベル、またはそれに対する自己抗体のいずれであってもよい。そのようなマーカーが検出される場合、通常、そのすぐ後に治療を開始するべきである。黄班変性関連障害を発症する可能性がその疾患を患う身内または遺伝子マーカーの検出に基づく場合も、これらの危険因子の同定直後、または診断の直後に治療を施すことができる。あるいは、遺伝子マーカーを有することが見出された個体を、未処置のままにはするが治療することなしに生化学的または症状的な変化について定期的に監視することができる。直ちに治療するか、または症状を監視するかの決定は、部分的には、その被験者に見出される様々な他のマーカー（1種類もしくは複数種類）によって予想される危険性の程度

に依存する。ひとたび開始したら、治療は、典型的には、1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月または1年の期間、間をおいて継続する。幾名かの被験者においては、被験者の一生の残りまでの期間治療を施す。治療は、一般には、生化学的危険マーカーが消失する場合に停止することができる。

【0099】

眼の疾患（例えば、AMD）に加えて、他の年齢関連疾患、例えば、アミロイドーシス、弾力線維症、高密度堆積病、およびアテローム性動脈硬化も本発明の方法での治療に馴染みやすい。同様に、他のタイプの黄班変性関連障害、例えば、膜性および連鎖球菌後／分節性糸球体腎炎もここで主張される方法で治療することができる。

【0100】

これらの方法の第2の主要用途は、黄班変性関連障害の治療を受けている被験者の状態の監視にある。成功した治療結果は、補体経路関連活性、例えば、発現レベル、生化学的活性（例えば、補体成分の酵素活性）、または補体経路分子に対する血清自己抗体の、異常レベルから正常レベルへの、もしくはそれに向かう回復によって示される。典型的には、そのような方法では、被験者が治療を受ける前に、異常活性のレベル（例えば、自己抗体の異常な存在、補体経路分子の異常レベル）について初期値を測定する。その後、期間全体にわたって反復測定を行う。対照集団における平均レベルに対して初期値が上昇する場合、次の反応におけるレベルの有意の減少は陽性の治療結果を示す。同様に、基準マーカーの初期値が対照集団における平均に対して減少する場合、初期値に対する測定レベルの有意の増加は陽性の治療結果を示す。次の測定レベルが初期レベルの反復測定の平均と1を上回る標準偏差だけ異なる場合、次に測定されたレベルは初期値に対して有意に変化しているものと考えられる。監視が陰性の治療結果を明らかにする場合、異なる治療薬を用いるか、または前の薬剤の投与量を増加させることにより、前の治療形態を典型的には修正する。

【0101】

一般に、被験者を本発明の異なる治療薬の組合せで治療することができる。この治療は、黄班変性関連障害を治療する他の公知法、例えば、米国特許第6,218,

368号に記載されるような抗生物質療法と組み合わせて進めることもできる。

【0102】

さらに、免疫抑制が、黄班変性関連障害に罹患するか、またはそれを発症する危険性がある被験者において（例えば、自己免疫応答を阻害または回復させることにより）治療効果をもたらす可能性がある。したがって、本発明の治療薬で治療しようとする被験者にシクロスポリンのような免疫抑制剤を投与することができる。免疫抑制剤は免疫応答を抑制することができる作用物質である。これらの作用物質には、細胞毒性薬物、副腎皮質ステロイド、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、特異的Tリンパ球免疫抑制剤、および抗体もしくはそれらの断片が含まれる（Physicians' Desk Reference, 53rd edition, Medical Economics Company Inc., Montvale, NJ (1999)を参照）。免疫抑制療法は、典型的には、間を空けて1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月または1年の期間継続する。幾名かの患者においては、患者の一生の残りまでの期間治療を施す。治療は、一般には、生化学的危険マーカーが消失する場合に停止することができる。治療は時折、一掃するのに完全な免疫応答を必要とする病原に被験者が感染した場合、一時的に中断することができる。

【0103】

B. 補体経路分子のレベルの調節

本発明は、黄班変性関連障害の発症を治療または予防するための方法であって、補体経路分子のレベルを調節することによる方法を提供する。補体経路関連タンパク質をコードするmRNAのレベルまたは補体経路関連タンパク質のレベルを調節することができる。幾つかの方法においては、治療薬は1種類以上の補体成分、例えば、補体3、補体C5、またはC5b-9最終複合体の発現の阻害剤である。幾つかの方法においては、治療薬は1種類以上の補体成分の発現を調節する因子の遺伝子発現を変更する作用物質である。幾つかの方法においては、治療薬は補体の活性または活性化を調製する補体経路分子、例えば、CR1、CR2、ビトロネクチン、またはクラスタリンの遺伝子発現を変更する作用物質である。

【0104】

上記遺伝子発現の変更は幾つかの方式、例えば、(i) mRNA合成の調節、(ii

）RNAのターンオーバーまたは分解の調節、（iii）mRNAのタンパク質への翻訳の調節、（iv）タンパク質の処理または移送の調節、（v）形成に必要な分子間または分子内結合を遮断することによる、補体系のタンパク質複合体（例えば、C3転換酵素、C5転換酵素、または最終複合体C5b-9）の形成の調節、および（vi）例えば（例えば、酵素-抗体技術を用いる）イン・サイトでの補体成分の標的化および破壊による、補体経路分子の濃度の調節によって達成することができる。

【0105】

幾つかの方法において、本発明の治療はアンチセンス療法に関する。1種類以上の補体経路分子をコードする細胞性mRNAおよび／またはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを投与またはイン・サイト産生させることにより、そのタンパク質の発現を阻害することによって、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって、そのような治療が機能する（例えば、Stanley et al., Basic Principles of Antisense Therapeutics, Springer-Verlag, NY, p.3, Jul. 1998を参照）。この結合は通常の塩基対相補性によるものであってもよく、または、例えば、DNA二重鎖への結合の場合、二重鎖の主要溝における特異的相互作用によるものであってもよい。

【0106】

幾つかの方法において、治療薬は亜鉛フィンガー・モチーフを利用し、これは様々な核酸配列に結合するように選択することができる（例えば、米国特許第6,140,466号を参照）。例えば、標的核酸の発現を活性化または抑制する治療薬を亜鉛フィンガー・モチーフとの融合体として発現させることができる。このような融合タンパク質は、構造遺伝子またはRNAの他にプロモーターまたは他の転写制御要素を含む亜鉛フィンガーヌクレオチド結合モチーフからの遺伝子発現を阻害、活性化または増強するのに有用である。

【0107】

C. 補体活性の調節

本発明は、黄班変性関連障害の治療または予防方法であって、補体経路分子の生体活性または活性化された補体系が介在する細胞活性を調節する治療薬を投与することによる方法を提供する。本明細書に説明される方法に加えて、治療薬を

投与して被験者における補体活性を調節するための方法も当該技術分野において記述されている。例えば、米国特許第5,472,939号は、C1、またはC3転写酵素活性もしくはC5転写酵素活性を阻害するその断片を被験者に投与することによる補体介在活性の調節を記載する。

【0108】

様々な治療薬が本発明に適する。当該技術分野において、幾つかの作用物質が補体成分の活性を調節し得ることが知られている（例えば、米国特許第5,808,109号を参照）。多くの作用物質が補体介在活性を減少させることが報告されている。このような作用物質には、アミノ酸（Takada, Y. et al. *Immunology* 1978, 34, 509）；リン酸エステル（Becker, L. *Biochem. Biophys. Acta* 1967, 147, 289）；ポリアニオン性物質（Conrow, R. B. et al. *J. Med. Chem.* 1980, 23, 242）；フッ化スルホニル（Hansch, C.; Yoshimoto, M. *J. Med. Chem.* 1974, 17, 1160、およびそれらに引用される参考文献）；ポリヌクレオチド（DeClercq, P. F. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975, 67, 255）；ピマリン酸（pimaric acids）（Glovsky, M. M. et al. *J. Immunol.* 1969, 102, 1）；ボルフィン（Lapidus, M. and Tomasco, J. *Immunopharmacol.* 1981, 3, 137）；幾つかの抗炎症剤（Burge, J. J. et al. *J. Immunol.* 1978, 120, 1625）；フェノール（Muller-Eberhard, H. J. 1978, in *Molecular Basis of Biological Degradative Processes*, Berlin, R. D. et al., eds. Academic Press, New York, p.65）；およびベンズアミジン（Vogt, W. et al. *Immunology* 1979, 36, 138）が含まれる。これらの作用物質のうちの幾つかはプロテアーゼおよびエステラーゼの一般的な阻害によって機能する。他のものは補体経路のいかなる中間工程にも特異的ではないが、むしろ補体活性化の2つ以上の工程を阻害する。後者の化合物の例には、C1、C4およびC5の利用を遮断するベンズアミジンが含まれる（例えば、Vogt et al. *Immunol.* 1979, 36, 138を参照）。

【0109】

補体成分の活性を阻害することができる当該技術分野において公知のさらなる作用物質には、K-76、Stachybotrysに由来する真菌代謝物（Corey et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 104:5551, 1982）が含まれる。K-76およびK-76 COOHの両者

は、補体を主としてC5工程で阻害し (Hong et al., J. Immunol. 122:2418, 1979; Miyazaki et al., Microbiol. Immunol. 24:1091, 1980)、かつ正常ヒト補体からの走化性因子の産生を防止する (Bumpers et al., Lab. Clin. Med. 102:421, 1983) ことが示されている。高濃度のK-76またはK-76 COOHで、C2、C3、C6、C7、およびC9とそれらそれぞれの前中間体との反応の幾らかの阻害が示される。K-76またはK-76 COOHは、補体のC3b不活性化系を阻害することも報告されている (Hong et al., J. Immunol. 127:104-108, 1981)。本発明の実施に適する他の作用物質には、グリセオフルビン (Weinberg, in Principles of Medicinal Chemistry, 2d Ed., Foye, W. O., ed., Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., p.813, 1981)、イソパナリン (Djura et al., Aust. J. Chem. 36:1057, 1983)、およびSiphonodictyon coralli-phagumの代謝物 (Sullivan et al., Tetrahedron 37:979, 1981) が含まれる。

【0110】

D. 黄班変性関連自己抗原および寛容

下記実施例において論じられるように、様々な補体経路分子並びにRPE、脈絡膜、および網膜に対する自己抗体が黄班変性関連障害 (例えば、AMDおよび放射状晶洞) の患者の血清中に見出された。この証拠は、自己免疫応答が黄班変性関連障害の病因において特定の役割を果たすことを示す。したがって、黄班変性関連自己抗原および／または自己抗体の同定は黄班変性関連障害を治療または予防するための新規手段をも提供する。例えば、これらの自己抗原に特異的に向けられる新規治療を、例えばコンピュータ支援法により、設計して生成することができる (例えば、Topper et al., Clin Orthop, -HD-(256):39-43, 1990を参照)。

【0111】

黄班変性関連自己抗原および自己抗体の存在は、これらの分子が補体系および引き続く眼組織 (例えば、RPE／脈絡膜界面における脈絡毛細管板) に対する損傷を活性化し得る方法を強調する。例えば、補体系は、例えば自己抗原および自己抗体によって形成される抗原-抗体複合体により、古典経路を介して活性化され得る。しかしながら、これらは、本発明者らによって実証されるように、他の

経路によって補体系を活性化することもできる（例えば、実施例6を参照）。したがって、黄班変性関連自己抗原の同定は、特定の黄班変性関連自己抗原に対する寛容を被験者において誘導することによる、黄班変性を治療または予防する他の手段を提供する。免疫学的寛容の誘導は、特定の抗原に対する免疫応答の欠如が達成される治療または予防方法である。所定の抗原に対する寛容の誘導は、例えば、米国特許第6,153,203号、第6,103,235号、および第5,951,984号に説明されるように行うことができる。

【0112】

寛容を誘導するには、応答の性質（すなわち、免疫原性または寛容原性）が抗原の用量、物理形態および投与経路に依存することに注意すべきである。高もしくは低用量の抗原はしばしば免疫寛容につながり、これに対して中間用量は免疫原性である。モノマー形態の抗原は通常寛容原性であり、これに対して高分子量凝集体は免疫原性となるようである。抗原の経口、経鼻、経胃または静脈内注射は寛容につながり、これに対して皮内または筋肉内抗原投与は、特にアジュバントの存在下において、免疫原性応答を支持する。Marx, Science 252, 27-28 (1991); Trentham et al., Science 261, 1727-1730 (1993); Metzler & Wraith, International Immunology 5, 1159-1165 (1993); Cobbold et al., W090/15152 (1990)を参照のこと。

【0113】

黄班変性関連自己抗原の同定は、黄班変性関連障害の遺伝的性質をさらに理解するための手段をも提供する。多くの他の疾患と同様に、黄班変性関連自己抗原（例えば、補体経路関連タンパク質、またはRPE自己抗原）をコードする遺伝子における突然変異は黄班変性関連障害の遺伝的原因であり得る。例えば、幾つかの疾患は補体経路に関連するタンパク質の欠乏のためであり、その欠乏は、しばしば、補体タンパク質における突然変異のためである。このような疾患の例には、SLE様症状（C1qにおける点突然変異）；遺伝性血管性浮腫（C1q阻害剤における突然変異および多形）；SLE（C2における欠失）；化膿性感染（エクソン18およびC3遺伝子における61bpの欠失）；膜性増殖（C3）；糸球体腎炎（C3）；部分的リポジストロフィ（C3）；SLE（C4aにおけるフレームシフト）；ナイセリア（

Neisseria) 感染に対する素因 (P (プロペルジン) 因子: 点突然変異: X連結)
; 常染色体性劣性溶血性尿毒症候群 (H因子: 点変異) ; 再生不良性貧血および
発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) (CD59: コドン16の欠失、その上に一塩基
対突然変異) ; 並びにPNH (CD55、欠失点突然変異) が含まれる。

【0114】

黄班変性関連障害の遺伝的原因を同定するため、例えば実施例9-13に説明されるように、同定された特定の自己抗原をさらに分析することができる。例えば、自己抗原の正体および配列情報を、標準アミノ酸配列決定法 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., 1999, John Wiley & Sons, Inc., New York) に加えて、他のタンパク質同定法 (例えば、実施例11に説明されるような、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析) によって明らかにすることができる。ポリヌクレオチドプライマーを生成し、分子生物学において日常的に実施される標準技術 (Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press) を用いて、これらの自己抗原をコードする遺伝子のクローン化に用いることができる。それによりこのような自己抗原のヌクレオチド配列を得ることができる。それらの配列をゲノム・データベース (例えば、GeneBank) からのDNA配列と比較することができる。自己抗原コーディング配列中で同定された、野生型配列に対するあらゆる突然変異または多形は、対応する遺伝子がおそらくは黄班変性関連障害を生じる候補であることを示す。

【0115】

E. 黄班変性関連障害の新規治療のためのスクリーニング

1. 試験作用物質

本発明は、異常補体活性に関連する疾患または障害を予防または治療するための方法であって、補体活性を調節する治療薬を投与することによる方法を提供する。上記作用物質に加えて、補体活性を調節する治療薬を、高スループット・スクリーニング技術で試験作用物質をスクリーニングすることによって得ることができる。

【0116】

スクリーニングすることができる作用物質には、ポリヌクレオチド、ベータ・タン模倣体、多糖、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N-置換グリシン、オリゴカルバメート、ポリペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体またはそれらの組合せが含まれる。

【0117】

試験作用物質は、合成および天然化合物のライブラリを含む様々な源から得られる。ステップ・バイ・ステップ方式で合成することができる多くのタイプの化合物について組合せライブラリを生成することができる。化合物の大きな組合せライブラリは、W0 95/12608、W0 93/06121、W0 94/08051、W0 95/35503およびW0 95/30642に説明されるエンコード合成ライブラリ (ESL) 法によって構築することができる。ペプチドライブラリーは、ファージ呈示法 (例えば、Devlin、W0 91/18980) によって生成させることもできる。細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリは、商業的資源から得ることができるか、または野外において集めることができる。公知の薬理学的作用物質に指向性またはランダム化学修飾、例えば、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化を施して構造類似体を生成させることができる。

【0118】

ペプチドまたは他の化合物の組合せライブラリを、配列優先度またはいかなる位置での恒常性もなしに、完全にランダム化することができる。あるいは、ライブラリを偏向させる、すなわち、配列内の幾つかの位置を一定に保つか、または限られた数の可能性から選択することができる。例えば、幾つかの場合においては、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基を定義されたクラス内、例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体的に偏った (小さいか大きいかのいずれか) 残基で、架橋用のシステイン、SH-3ドメイン用のプロリン、リン酸化部位用のセリン、トレオニン、チロシンもしくはヒスチジンの創出、またはプリンに向けてランダム化する。

【0119】

試験作用物質は天然タンパク質またはそれらの断片であってもよい。試験作用

物質はペプチド、例えば、約5ないし約30アミノ酸のペプチドであってもよく、約5ないし約20アミノ酸が好ましく、約7ないし約15が特に好ましい。これらのペプチドは天然タンパク質の消化物、ランダムペプチド、または「偏向」ランダムペプチドであってもよい。

【0120】

試験作用物質は核酸であってもよい。核酸試験作用物質は天然核酸、ランダム核酸、または「偏向」ランダム核酸であってもよい。例えば、原核生物または真核生物ゲノムの消化物をタンパク質について上述されるのと同様に用いることができる。

【0121】

スクリーニングしようとする試験作用物質のライブラリは標的補体経路分子の構造研究に基づいて生成することもできる。このような構造研究は、標的分子に結合する傾向が強い試験作用物質の同定を可能にする。補体経路分子の三次元構造は幾つかの方法、例えば、結晶構造および分子モデリングで研究することができる。X線結晶学を用いるタンパク構造の研究法が文献において公知である。Physical Bio-chemistry, Van Holde, K. E. (Prentice-Hall, New Jersey 1971), pp.221-239、およびPhysical Chemistry with Applications to the Life Sciences, D. Eisenberg & D. C. Crothers (Benjamin Cummings, Menlo Park 1979)を参照のこと。補体経路分子の構造のコンピュータ・モデリングは、補体系の調節因子をスクリーニングするための試験化合物を設計する別の手段を提供する。分子モデリングの方法は文献、例えば、「System and method for molecular modeling utilizing a sensitivity factor」と題する米国特許第5,612,894、および「Molecular modeling method and system」と題する米国特許第5,583,973号に記載されている。加えて、タンパク構造は中性子回折および核磁気共鳴(NMR)によって決定することもできる。例えば、Physical Chemistry, 4th Ed. Moore, W. J. (Prentice-Hall, New Jersey 1972)、およびNMR of Proteins and Nucleic Acids, K. Wuthrich (Wiley-Interscience, New York 1986)を参照のこと。

【0122】

本発明の治療薬には、様々な補体経路分子（例えば、C5）に特異的に結合する抗体も含まれる。そのような抗体はモノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、当該技術分野において多くが記載されている。加えて、抗体の産生方法は当該技術分野において公知である。例えば、非ヒトモノクローナル抗体、例えばネズミまたはラット、の産生は、例えば、その動物を所定の補体成分タンパク質またはそれらの抗原性断片で免疫することによって達成することができる（Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New Yorkを参照）。このような免疫源は天然源から、ペプチド合成によって、または組換え発現によって得ることができる。

【0123】

組換えDNA技術によって非ヒト抗体のCDR領域をヒト定常領域に連結させることにより、マウス抗体のヒト化形態を産生することができる。Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989)およびW0 90/07861を参照のこと。ヒト抗体はファージ呈示法を用いて得ることができる。例えば、Dowerら、W0 91/17271；McCaffertyら、W0 92/01047を参照のこと。これらの方法においては、メンバーがそれらの外面上に異なる抗体を呈示するファージのライブラリを生成した。抗体は、通常、FvまたはFab断片として呈示される。所望の特異性を有する抗体を呈示するファージを、補体タンパク質または抗原性断片に対する親和性富化によって選択する。

【0124】

補体経路分子に対するヒト抗体は、少なくともヒト免疫グロブリン遺伝子座および不活性化内在性免疫グロブリン遺伝子座のセグメントをコードする導入遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物から産生することもできる。例えば、Lonbergら、W0 93/12227 (1993)；Kucherlapati、W0 91/10741 (1991)を参照のこと。ヒト抗体は、競合結合実験または他の方法により、マウス抗体と同じエピトープ特異性を有するように選択することができる。このような抗体は、マウス抗体の有用な機能的特性を共有する傾向が特に強い。ヒトポリクローナル抗体は、免疫原性作用物質で免疫したヒトに由来する血清の形態で提供するこ

ともできる。任意に、そのようなポリクローナル抗体を、補体成分または抗原性断片を親和性試薬として用いる親和性精製によって濃縮することができる。

【0125】

2. 試験作用物質と補体経路分子との結合を検出するための細胞非含有アッセイ

補体経路分子と相互作用し、かつその活性および／または他の分子との相互作用を調節することが可能な作用物質を同定するのに細胞非含有アッセイを用いることができる。試験作用物質の補体経路分子への結合は反応混合物中で決定する。結合は、例えば、標識イン・ビトロ・タンパク質－タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合用の免疫アッセイ、機能的アッセイ（例えば、リン酸化アッセイ等）を含む幾つかの方法によってアッセイすることができる。例えば、米国特許第4,366,241号；第4,376,110号；第4,517,288号；および第4,837,168号、並びにその上に、Bevan et al., Trends in Biotechnology 13:115-122, 1995；Ecker et al., Bio/Technology 13:351-360, 1995；およびHodgson, Bio/Technology 10:973-980, 1992を参照のこと。試験作用物質は、補体成分への直接結合、例えば、補体成分との共免疫沈殿を検出することによって同定することができる。試験作用物質は、その作用物質が補体成分に結合することを示す信号、例えば、蛍光消光を検出することによって同定することもできる。

【0126】

競合アッセイは、補体経路分子に特異的に結合する試験化合物を同定するのに適する形式を提供する。そのような形式においては、補体経路分子に結合することが既知である化合物と競合する状態で試験化合物をスクリーニングする。既知の補体結合性作用物質は合成ポリペプチドであってもよい。それは補体経路分子を特異的に認識する抗体であってもよい。試験化合物が補体経路分子に結合することが知られる化合物の結合を阻害する場合、その試験化合物も補体経路分子に結合する。

【0127】

多くのタイプの競合結合アッセイが公知であり、例えば、固相直接もしくは間

接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相直接もしくは間接酵素免疫アッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ (Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253 (1983)を参照) ; 固相直接ビオチン-アビジンEIA (Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)を参照) ; 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press (1988)を参照) ; I-125標識を用いる固相直接標識RIA (Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7-15 (1988)を参照) ; 固相直接ビオチン-アビジンEIA (Cheung et al., *Virology* 176:546-552 (1990)) ; および直接標識RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82 (1990))。典型的には、このようなアッセイは、固体表面に結合する精製抗原またはこれらのいずれかを担持する細胞、非標識試験免疫グロブリンおよび標識参照免疫グロブリンの使用を含む。競合阻害は、試験免疫グロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合する標識の量を決定することによって測定する。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体 (競合抗体) には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体および参照抗体が結合するエピトープと立体妨害が生じるのに十分な近さの隣接エピトープに結合する抗体が含まれる。通常、競合抗体が過剰に存在するとき、それは共通の抗原への参照抗体の特異的結合を少なくとも50または70%阻害する。

【0128】

スクリーニング・アッセイは不溶性または可溶性形式のいずれであってもよい。不溶性アッセイの一例は、所定の補体経路分子またはそれらの断片を固相マトリックス上に固定するものである。次に、固相マトリックスを試験作用物質と、その試験作用物質が結合するのに十分な期間接触させる。あらゆる非結合物質を固相マトリックスから洗い流した後、固相に結合する作用物質の存在がその作用物質の同定を可能にする。これらの方法は、結合作用物質を固相マトリックスから溶離し、それにより作用物質を単離する工程をさらに含むことができる。あるいは、補体経路分子を固定する以外に、試験作用物質を固体マトリックスに結合させ、次に補体経路分子を添加する。

【0129】

可溶性アッセイは組合せライブラリ・スクリーニング法の幾つかおよび上述の遺伝子スクリーニング法を含む。可溶性アッセイ形式の下では、試験作用物質も補体経路分子も固体支持体には結合しない。補体経路分子またはそれらの断片の試験作用物質への結合は、例えば、補体経路分子もしくは試験作用物質のいずれか、またはその両者の蛍光の変化によって決定することができる。蛍光は内在性のものでも、いずれかの成分を蛍光体で標識することによって付与されたものでもよい。結合は蛍光偏光によって検出することができる。

【0130】

幾つかの結合アッセイにおいては、所定の状況におけるポリペプチドの同定、検出および定量を容易にするため、補体経路分子、試験作用物質、または第3分子（例えば、抗補体抗体）のいずれかが標識体であり、すなわち、検出可能な標識もしくは基、または架橋性基に共有結合または連結する。これらの検出可能な基は検出可能なポリペプチド基、例えば、アッセイ可能な酵素または抗体エピトープを含むことができる。あるいは、検出可能な基は、様々な他の検出可能な基又は標識、例えば、放射標識（例えば、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S ）または化学発光もしくは蛍光基から選択することができる。同様に、検出可能な基は基質、補因子、阻害剤または親和性リガンドであり得る。

【0131】

そのようなアッセイによって同定される、所定の補体経路分子（例えば、C5b）に対する特異的結合活性を有する試験化合物の幾つかはその補体経路分子に特異的であり、その補体経路分子の活性の改変のみに用いることができる。他の試験化合物は複数の補体経路分子に対する特異的結合を示し、これらの補体経路分子すべての活性の調節に用いることができる。

【0132】

3. 細胞ベースのアッセイ

試験化合物と補体経路分子との、または補体経路分子と補体経路分子結合パートナーとの相互作用は細胞ベースのアッセイでも検出することができる。例えば、McConnell et al. (1992) Science 257:1906に記載されるマイクロフィジオメーターを用いることができる。細胞ベースのアッセイは、補体経路分子をコード

する遺伝子の発現を調節するか、補体成分をコードするmRNAの翻訳を調節するか、または補体経路タンパク質もしくはそのmRNAの安定性を調節する化合物の同定に用いることもできる。

【0133】

幾つかの方法においては、補体経路分子の発現を調節する試薬を同定するため、補体経路分子を発現することが可能である細胞を試験化合物と共にインキュベートし、細胞培地中に産生される補体経路分子の量を測定し、かつ試験化合物と接触していない細胞から産生されたものと比較する。試験することができる化合物には、小分子、タンパク質、および核酸が含まれる。特には、このアッセイは、補体成分をコードする遺伝子に対するアンチセンスまたはリボザイムの効力を決定するのに用いることができる。

【0134】

別の方法においては、補体経路分子をコードする遺伝子の転写に対する試験化合物の効果を、補体経路分子をコードする遺伝子のプロモーターの少なくとも一部に作動可能に連結するレポーター遺伝子を用いるトランスフェクション実験によって決定する。遺伝子のプロモーター領域は、例えばゲノムライブラリから、当該技術分野において公知の方法に従って単離することができる。レポーター遺伝子は、容易に定量し得るタンパク質をコードするあらゆる遺伝子、例えば、ルシフェラーゼまたはCAT遺伝子であり得る。このようなレポーター遺伝子は当該技術分野において公知である。

【0135】

F. 処方および投与量

1. 処方および投与経路

本発明の治療薬は、1種類以上の生理学的に許容し得る担体または賦形剤を用いて通常の方法で処方することができる。したがって、上述の治療薬は、例えば、点眼、注射、（口もしくは鼻のいずれかを介する）吸入もしくは吹き入れによる投与、または経口、頬、非経口もしくは直腸投与用に処方することができる。治療は当該技術分野において提供される指針に従うこともできる。例えば、特定の医学的状态を治療するための可溶性補体受容体-1 (sCR1) の肺投与（米国特

許第6,169,068号)、黄班変性を治療するための薬物の口内投与(米国特許第5,632,984号)、および炭酸脱水酵素阻害剤の眼への局所投与を用いる黄班浮腫の治療(米国特許第6,046,223号)がすべて当該技術分野において記載されている。

【0136】

本発明の治療薬は、全身および局所もしくは限局投与を含む様々な投与様式のために処方することができる。技術および処方は、一般には、Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAに見出すことができる。組成物は無菌で実質的に等張性の、米国食品医薬品局(U.S. Food and Drug Administration)のすべての優良製造規則(Good Manufacturing Practice)(GMP)に完全に従うものとして処方する。好ましい投与方法は点眼である。全身投与には、筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下を含む注射が好ましい。

【0137】

好ましい投与方法には、例えば、脈絡膜注射、経強膜注射もしくは強膜パッチの配置、選択的動脈カテーテル処置、経網膜、結膜下球、強膜ポケットおよび強膜静脈切開注射を含む眼内投与が含まれる。作用物質は血管内、例えば、静脈内(IV)または動脈内に代わりに投与することもできる。脈絡膜注射および強膜パッチ処理において、医師は、鎮痛剤および眼筋麻痺剤を含む適切な麻酔を開始した後眼に対する局所アプローチを用いる。治療用化合物を含む針を被験者の脈絡膜または強膜に向け、無菌条件下で挿入する。針が適切に位置取りされたとき、化合物を脈絡膜または強膜のいずれか、または両者に注入する。これらの方法のいずれかを用いるとき、医師は持続性放出または長期作用性処方を選択することができる。したがって、この手順は、被験者のこの治療の寛容および応答に依存して数ヶ月または数年ごとにのみ繰り返すことができる。

【0138】

注射については、本発明の化合物は、好ましくは生理学的に適合するバッファ中の溶液、例えば、ハンクス液またはリンゲル液に処方することができる。加えて、これらの化合物は固体形態で処方し、使用直前に再溶解または再懸濁することができる。凍結乾燥形態も含まれる。

【0139】

経口投与については、医薬組成物は、例えば、薬学的に許容し得る賦形剤、例えば、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロースもしくはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプンもしくはデンプングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）を用いて通常的手段によって調製された錠剤またはカプセルの形態をとることができる。経口投与用の液体調製品は、例えば、溶液、シロップもしくは懸濁液の形態をとることができ、または使用前に水もしくは他の適切なビヒクルで構成するための乾燥生成物として提示することができる。このような液体調製品は、薬学的に許容し得る添加物、例えば、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体もしくは水素化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンもしくはアラビアゴム）；非水性ビヒクル（例えば、扁桃油（*almond oil*）、油性エステル、エチルアルコールもしくは分画植物油）；および保存剤（例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）を用いて通常的手段によって調製することができる。これらの調製品は、適切であるならば、バッファ塩、香料、着色料および甘味料も含むことができる。

【0140】

治療薬は単独で、または、組織修復および再生および／または炎症の阻害が可能な分子を含む、網膜付着または損傷網膜組織に対する有益な効果を有することが知られる他の分子と組み合わせて投与することができる。有益な補因子の例には、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、LaVail et al. (1998), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:592-602、毛様体神経栄養因子（CNTF）、LaVail et al. (1998), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:592-602、アクソカイン（CNTFのムテイン）、LaVail et al. (1998), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:592-602、白血病阻害因子（LIF）、LaVail et al. (1998), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:592-602、ニュートロフィン-3（NT-3）、LaVail et al. (1998), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:592-602、ニュートロフィン-4（NT-4）、LaV

ail et al. (1998), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:592-602、神経成長因子 (NGF)、LaVail et al. (1998), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:592-602、インシュリン様成長因子II、LaVail et al. (1998), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:592-602、プロスタグランジンE2、La Vail et al. (1998), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39:581-591、30kD生存因子、タウリン、およびビタミンAが含まれる。他の有用な補因子には、防腐剤、抗生物質、抗ウイルスおよび抗真菌剤並びに鎮痛剤および麻酔剤を含む症状緩和性補因子が含まれる。

【0141】

治療薬は、その治療薬を所望の組織にターゲティングするための手段を伴うこともできる。例えば、幾つかの方法においては、治療薬は、AMD患者において活性化補体系（例えば、C5b-9複合体）の標的となるように関係付けられている脈絡毛細管板に向けることができる。有用なターゲティング分子は、例えば米国特許第5,091,513号に開示される、一本鎖結合部位技術を例えば用いて、設計することができる。したがって、標的化送達により、治療薬は、C5b-9複合体によって生じる脈絡毛細管板に対する損傷の防止または緩和に狙いが定められる。このような効果は上述の様々な手段、例えば、補体活性化の阻害、補体経路阻害剤（例えば、クラスタリン、ビトロネクチン）の機能の刺激、または脈絡毛細管板上に既に形成されている複合体の破壊によって達成することができる。

【0142】

臨床状況において、幾つかの方法のうちのいずれかにより、遺伝子治療のための遺伝子送達系を被験者に導入することができる。例えば、遺伝子送達系の医薬調製品を、例えば静脈注射により、全身的に導入することができ、受容体遺伝子の発現を制御する転写調節配列のために遺伝子送達ビヒクル、細胞型もしくは組織型発現、またはそれらの組合せによってもたらされるトランスフェクションの特異性により、標的細胞におけるそのタンパク質の特異的な形質導入が優性に生じる。別の態様においては、最初の組換え遺伝子の送達がより限定され、動物への導入が非常に限局化される。例えば、遺伝子送達ビヒクルはカテーテルにより（米国特許第5,328,470号を参照）、または定位注射により（Chen et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:3054-3057）導入することができる。それ

らに相同の配列を遺伝子治療構築体として、Dev et al. (1994), Cancer Treat. Rev. 20:105-115に記載される技術を用いる電気穿孔法によって送達することができる。

【0143】

本発明の遺伝子治療構築体または化合物の医薬調製品は、許容し得る希釈剤中の遺伝子送達系から本質的になることができるか、または遺伝子送達ビヒクルもしくは化合物が埋め込まれている遅放マトリックスを含むことができる。あるいは、完全な遺伝子送達系を組換え細胞、例えば、レトロウイルスベクターから無傷のまま産生することができる場合、医薬調製品はその遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含むことができる。

【0144】

これらの組成物は、所望であるならば、パックまたはディスペンサ装置内に入れることができ、これは活性成分を含む1以上の単位剤形を含むことができる。パックは、例えば、金属またはプラスチック・ホイル、例えば、ブリスタ・パックを構成することができる。パックまたはディスペンサ装置には投与の指示書を添付することができる。

【0145】

2. 投与量

このような化合物の毒性および治療効力は、例えば LD_{50} （集団の50%に致死的な用量）および ED_{50} （集団の50%において治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準薬学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比が治療指数であり、比 LD_{50}/ED_{50} で表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を用いることもできるが、非感染細胞に対する潜在的な損傷を最小限に止め、それにより副作用を低減させるため、そのような化合物の標的を罹患組織の部位とする送達系を設計するように注意を払うべきである。

【0146】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータをヒトにおいて用いるための一連の投与量の処方において用いることができる。このような化合物の投与

量は、好ましくは、 ED_{50} を含み、毒性がほとんどないか全くない循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる投与形態および利用される投与経路に応じて、この範囲内を変化し得る。本発明の方法において用いられるあらゆる化合物について、治療上有効な用量を最初に細胞培養アッセイから見積もることができる。細胞培養において決定された IC_{50} （すなわち、症状の半最大阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲が達成されるように動物モデルにおいて用量を処方することができる。このような情報を用いてヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0147】

本発明の実施は、他に指示されない限り、当該技術分野の技量の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の通常の技術を用いることができる。このような技術は文献で完全に説明されている。Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapters 16 and 17; Hogan et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (1986), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 米国特許第4,683,195号を参照; DNA Cloning, Volumes I and II, Glover, ed., 1985; Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait, ed., 1984; Nucleic Acid Hybridization, D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Transcription and Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, 1986; Perbal (1984), A Practical Guide To Molecular Cloning; Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)を参照; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1987; Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155, Wu et al., eds., Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987; Handbook Of Experimental Imm

unology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986。

【0148】

本発明の多くの変更および変形をその精神および範囲から逸脱することなくすることができる。本明細書に記述される具体的な例は説明のみのためのものであり、いかなる意味においても本発明を限定しようとするものではない。

【0149】

本明細書に引用されるすべての刊行物、図、特許および特許出願は、参照することにより、すべての目的について、あたかも各々が個別に示されたのと同じ程度まで本明細書に明確に組み込まれる。

【0150】

実施例

実施例1：晶洞、Bruch膜、および脈絡毛細管板における補体経路分子の同定

組織：年齢が45ないし101歳の範囲の、ヒト・ドナー収容所およびCCDからの眼を死亡の4時間以内に処理した。これらのドナーの多くはAMDの文書化された臨床診断を有し（少なくとも一方の眼に地域的萎縮、脈絡膜血管新生、および円形瘢痕を有するドナーを含む）、1名のドナーは角質晶洞と診断された。ヒト肝臓は生検の2時間以内に得た。RPE細胞は死亡の5時間以内に2%ディスパーゼで単離し、10%ウシ胎児血清を含むクーンF-12培地において成長させた。

【0151】

免疫組織化学：

組織を、少なくとも2時間、1/2強度のKarnovsky固定液（1/2K；0.025%CaCl₂を含む、100mMカコジレート・バッファ、pH7.4中の2%ホルムアルデヒドおよび2.5%グルタルアルデヒド）において固定した後、100mMカコジレート・バッファで3×10分洗浄した。スライドを、0.85% NaCl、1mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウム（PBS/M/C）、および1mg/mlグロブリン非含有ウシ血清アルブミン（PBS/M/C/BSA）を含む0.01Mリン酸ナトリウム（pH7.4）でブロックした。次に、切片をPBS/M/Cで10分間すすぎ、PBS/M/C/BSAに希釈した一次抗体中、室温で1時間インキュベートした。幾つかの場合には、ブロックに先立ち、0.5%トリプシン（Sigma、St. Louis、MO）で10分間、供給者によって指定される通り

に前処理した。一次抗体に露出した後、切片をPBS/M/Cですすぎ(2×10分)、PBS/M/C/BSAに希釈した適切なフルオレセイン結合二次抗体(しばしばヒト血清に対して吸着する)中でインキュベートし(30分、室温)、PBS/M/Cですすぎ(2×10分)、かつImmunmount(Shandon, Pittsburgh, PA)にマウントした。隣接切片は陰性対照として二次抗体のみと反応させた。幾つかの切片は、それぞれIV型コラーゲンまたは様々な硫酸コンドロイチン・プロテオグリカンの抗体と共に用いるため、0.5%トリプシン(Sigma; St. Louis, MO)、または0.2–0.02 U/mlコンドロイチナーゼABC(Seikagaku; Rockville, MD)で10分間前処理した。最少で5名のドナーの眼に由来する晶洞含有組織を各々の抗体について検査した。

【0152】

陰性対照については、切片を、a) 一次抗体を含まない；b) 1% (v/v) 正常血清を含む；および／またはc) 無関係のタンパク質に対する抗体を含むPBS/M/C/BSAに露出した。幾つかの場合においては、さらなる対照が精製抗原に対する一次抗体の吸着を含んでいた。陽性対照は、抗体と強膜、脈絡膜、および硝子体の細胞外マトリックス；網膜および脈絡膜基底層；網膜光受容器間マトリックス；および肝臓との反応を含んでいた。晶洞中の血清タンパク質堆積の「特異性」を決定するため、晶洞含有切片をヒトアルブミン(Cappel; Malvern, PA) およびハプトグロビン(Dako; Carpinteria, CA) に対する抗体と反応させた。ハプトグロビンは、主要急性期反応体である巨大分子糖タンパク質である(Putnam, Haptoglobin, In: The Plasma Proteins, Structure, Function, and Genetic Control, 11, Putnam (ed.), Academic Press, New York, pp. 1-50, 1975；およびMorimatsu et al., J. Biol. Chem., 266:11833-11837, 1991)。

【0153】

結果

抗体の晶洞との反応性を下記表1に列挙する。一般には、すべての陽性抗体はすべての晶洞表現型に結合した。対照では、すべての抗体反応性が特異的であることが確認される。加えて、用いた抗体の大部分は強膜、脈絡膜、RPE、網膜、硝子体、および／または他の「対照」組織に結合した。

【0154】

【表1】

表1：晶洞関連分子（DRAM）

抗 原	源	晶 洞
$\alpha 1$ アンチキモトリプシン	Dako	+
$\alpha 1$ アンチトリプシン	Dako	-/+
$\alpha 2$ マクログロビン	Biodesign	-
aFGF		-
AKS		-
アルブミン	Cappel	-
アミロイド A	Dako	+
アミロイド b	Dako	- to +/-
アミロイド P	Dako	+
アミロイド Prec Prot	B-M	-
抗トロンビン III	Calb	+/-
Apo A1	Calb	-
Apo E	Calb	+
ASPG-1		-
心房性ナトリウム利尿因子	Chemicon	-
$\beta 2$ ミクログロビン	B-M	+/-
bFGF		-
眼底膜	Chemicon	-
ウシ nas. cart. p.	ICN	-
CD1a	Dako	+
CD3	Pharm	-/+
	Dako	-
CD4	Pharm	+/-
CD8	Pharm	-
CD14	Dako	+
CD15	Chemicon	-
CD31	Dako	+/-
CD44	Various	-
CD45	Dako	+

CD68	Dako	+
CD83		+
CD86	Dako	+
CRP	Dako	- to +/-
カルシトニン	Dako	-
炭酸脱水酵素		-
Carc Assoc Ag		-
cfms/CSF-1 受容体		-
硫酸コンドロイチン		-
硫酸コンドロイチン0		-
硫酸コンドロイチン4		+
硫酸コンドロイチン6		+
硫酸コンドロイチン PG	Chemicon	-
コラーゲン I	Southern Biotech	-
コラーゲン II	SB	-
コラーゲン III	SB	-
コラーゲン IV	SB, Chemicon	-
コラーゲン V	SB	-
コラーゲン VI		-
コラーゲン VII		-
コラーゲン IX		-
コラーゲナーゼ		-
C1q	Calb	-/+
補体3		- to +
C5		+
C5-C9 複合体	Calb	+/-
COS		-
CRALBP		-
シスタチンC		-
デコリン	Chemicon	-
エラスチン	Sigma	-
エンタクチン		-
X因子	Dako	+
フィブリン		-
フィブリノーゲン	Dako	- to +/-
フィブロネクチン		-
フィビュリン3	Timpl	-/?
フィビュリン4	Timpl	-/?
FnR		-
α フォドリン		-
β フォドリン		-/+
ガングリオシド	Dev Hyb	-
ゲルゾリン		-
GFAP		-
グルコース・トランスポーター1,3,4		-
糖質	Dev Hyb	-
グリコフォリン A, C		-
ハプトグロビン	Dako	+/- (可変)
Heckelively 血清 Ag		+/-
硫酸ヘパラン (MAC)	(MAB)	+/-

Kimata		
Hermes		-
HLA ABC		-/?
HLA DR	Various	+
HNK-1		-
熱ショックタンパク質70		-
HSPG		-
ヒト IgA		-
ヒト IgG		+/-
ヒアルロン酸		-
Ig カッパ鎖		- to +/-
Ig ラムダ鎖	Dako	+/- to +
インテグリン $\alpha 2$		-
インテグリン $\alpha 3$		-
インテグリン $\alpha 4$		-
インテグリン $\alpha 5$		-
インテグリン $\alpha 6$		-
インテグリン $\beta 1$		-
インテグリン $\beta 2$		-
インテグリン $\beta 4$		-
中間フィラメント		-
光受容器間マトリックス		-
IRBP		-
硫酸ケラタン		-
ケラチン		-
ラミニン		-
LAMP-1	Dev Hyb	-
LAMP-2	Dev Hyb	-
リンクタンパク質	Dev Hyb	-
リポタンパク質b		- to +/-
メラノーマ Assoc Ag		-
ミルク・ムチン核Ag		-
MMPs		-
Mitochondrial Ag		-
N.S. エノラーゼ		-
神経成長因子		-
NGFR		-
神経原線維濃縮体		-
PG40 (Decorin)		-
ホスホリパーゼA2		-
プラスミノーゲン#	Dako	+
プラスミノーゲン Act. Inhib.-1		-
血小板誘導GF		-
プレアルブミン#	B-M	- to +
プロトロンビン#		+/-
S-100 (Bovine)		-/?
Sialo 細胞表面 Ag		-
Tau		-
テネイシン		-
TGFb		-
トロンビン	Sera	+/-

トロンボスポンジン	(Gib/AMAC)	- to +/-
TIMP1		-
TIMP2		-
TIMP3		+
TIMP4		+/-
チューブリン		-
ユビキニン		- to +
UPAR	Anderson	-
ビメンチン		-
ビトロネクチン	Various	+
VnR		-
von W 因子		-

B-M=Boehringer-Mannheim ; Calb=Calbiochem ; Gib=Gibco/BRL ; Pharm=Pharmingen ; Sera=Sera Labs ; Tel=Telios ;

「-」 反応性なし ; 「+」 一定の正の反応性 ; 「+/-」 弱い反応性 ; 「-/+」 非常に弱い反応性

【0155】

実施例2：晶洞およびBruch膜における、活性化C5b-9膜攻撃複合体を含む補体経路成分の同定

実施例1に示されるように、アミロイドA成分、アミロイドP成分、アポリポプロテインE、X因子、MHCクラスII分子、ビトロネクチン、および補体タンパク質（C3、C5およびC5b-9複合体）を含む細胞性および液性免疫プロセスに関連するタンパク質は同定された晶洞関連成分の間で普遍的である。最終補体複合体C5b-9（膜攻撃複合体、MAC）を含む他の補体成分もBruch膜内のRPE-脈絡膜界面に分布する。Bruch膜および晶洞内に広く行き渡る最終C5b-9補体複合体の存在は、RPE下空間内で不適切な補体活性化が生じている可能性があることを示す。この異常プロセスはRPEおよび/または脈絡膜細胞に対する傷害効果を有し、血管新生および微小血管障害（周皮細胞の喪失および内皮細胞の肥厚を含む）を促進し、血管透過性を増大させ、および/または単球の招集を促進し、それによりAMDの病理に寄与する可能性がある。

。

【0156】

AMD有りまたは無しのドナーから誘導された眼における補体経路分子を検査するため、免疫組織化学的、ELISA、およびウェスタンブロット分析を用いて研究を行った。これらの研究は、RPE-脈絡膜界面に存在する補体経路関連成分の同定、活性化されている特定の補体系（1つもしくは複数）の同定、C5b-9複合体が局所眼細胞の膜に挿入されているかどうかの決定、補体成分が眼細胞によって局所的に合成されるかどうかの決定、およびAMD有りまたは無しのドナーに由来する眼における補体成分をコードするmRNAの相対量の評価を目的とする。

【0157】

多くの補体経路タンパク質が晶洞、Bruch膜、RPEの基底表面、および／またはRPE下空間と会合することが免疫組織化学を用いて見出された（表2）。RPEの基底表面に局在する補体経路関連分子には、CD21、CD35、CD55／崩壊促進因子、およびCD59／タンパク質が含まれる。Bruch膜および／または晶洞に局在する補体経路関連分子には、前述の補体成分C3、C5および最終補体複合体C5b-9に加えて、C3d、C6、C7、C8、C9、D因子、H因子、I因子、B因子、SP40,40（クラスタリン）、およびマンノース結合タンパク質が含まれる。補体経路成分C1q、C1阻害剤、C2、C3a、C4、C5a、およびBa因子は脈絡間質内に存在するが、晶洞またはBruch膜の主要成分であるようには見えない。これらの補体経路関連成分の多くの存在は、ELISAおよびウェスタン分析を用いて確認されている（表2）。

【0158】

【表2】

表2. ヒトRPE-脈絡膜内での補体経路関連分子の同定

	ウェスタン (RPE/Ch)	ウェスタン (RPE)	ELISA (RPE/Ch)	ELISA (RPE)	免疫組織化学 (ドナー数)
Ig κ	ND	ND	ND	ND	CH+, D +/- (459-00)
Ig λ	+(205-98)	+(205-98)	+(411-99)	+(411-99)	CH+, D- (33-99,459-99)
C1q	ND	-(411-99)	-(325-00, 294-00)	+(411-99, 205-98)	CH+/-, D-, RPE+, (239-00, 58-00, 407-99, 247-99, 86-98, 294-00, 205-98)
C1 阻害	ND	+(86-98, 247-99)	+(325-00, 294-00)	+/- (242-00)	RPE+, D+/- (242-00)
C2	+(294-00)	+(294-00)	ND	ND	CH+, D-/+ (294-00)
C4	+(294-00)	+(294-00)	ND	ND	CH+, D-/+ (294-00)
C3	ND	-(247-99, 86-98)	ND	ND	CH+, D- (239-00, 58-00, 407-99, 247-99, 459-99, 294-99, 97-99)
C3a	ND	+/- (86-98, 247-99)	ND	+(205-98)	CH+, D- (1-97, 459-00, 239-00, 242-00)
C3d	+(294-00, 325-00)	ND	+(325-00, 294-00)	ND	CH+, D+, RPE+, cores? (294-00, 94-00, 404-00, 453-00, 325-00)
C5	ND	+/- (205-98, 411-99)	+(325-00, 294-00)	+(325-00, 294-00)	CH+/-, D+ (242-00, 239-00, 407-99, 247-00)
C5a	ND	+/- (86-98, 247-99)	+(325-00, 294-00)	+(205-98)	CH+, D- (407-99, 247-99, 86-98, 242-00, 294-00)
C5b-9	ND	-(86-98, 247-99)	+(325-00, 294-00)	+(205-98)	CH-/+ , D+ (20名のドナーすべて)

クラスリン	ND	+(242-00)	-(325-00, 294-00)	+(205-98)	D+ (242-00)
CD21	ND	-	ND	ND	RPE+/- (239-00, 459-00, 294-00, 242-00, 58-00)
CD35	ND	-(86-98, 247-99)	ND	-(242-00)	RPE +/- (58-00, 294-00, 239-00, 97, 459-99, 242-00)
CD55	ND	-(242-00)	-(325-00, 294-00)	-(242-00)	RPE+ (239-00, 459-99)
CD59	ND	-(242-00)	-(325-00, 294-00)	-(242-00)	RPE+, CH+ (242-00, 1-97, 459-294-00)
B因子	+/- (294-00, 242-00)	+(242-00, 294-00)	-/+ (325-00, 294-00)	-(242-00)	CH+, D+/-, cores? (294-00)
Ba因子	+(325-00, 294-00)	ND	-(325-00, 294-00)	-(242-00)	CH+, D- (294-00, 94-00, 404-00, 453-00, 325-00, 330-00, 457-00)
D因子	ND	ND	ND	ND	DR+/-
H因子	ND	-(325-00, 294-00)	+/- (325-00, 294-00)	+(205-98, 242-00)	CH-/+ , D+ (242-00, 294-00, 459-457-00, 330-00, 325-00, 94-00, 00, 453-00)
I因子	+/- (294-00)	ND	+(325-00, 294-00)	ND	DR-/+ , CH-/+ (294-00, 94-00, 400, 453-00, 325-00, 330-00)
マンノース結合タンパク質	+/- (325-00, 294-00)	+/- (325-00, 294-00)	+/- 325-00, 294-00)	+(242-00)	DR+, CH+ (294-00, 330-00, 453-325-00, 94-00, 404-00, 453-00)
マンノース受容体	-(325-00, 294-00)	-(325-00, 294-00)	ND	ND	-(294-00)

20名のドナー（5名はAMDの診断を受け、2名はおそらくAMDを患う）に由来する網膜色素上皮（RPE）およびRPE-脈絡膜複合体（RPE/Ch）を補体活性化経路の様々なウェスタンブロット、ELISA、および免疫組織化学的研究に用いた。ドナーの指定は表において括弧内に列挙し、各々のドナーの年齢、性別（M、男性またはF、女性）、人種（C、白人）、および疾患状態（AMD）は以下に詳述する。

450-99	30 C F	
453-00	61 C M	
411-99	67 C F	AMDの家族歴
247-99	70 C F	
86-98	73 C M	
407-99	74 C F	AMD及びAMDの家族歴
58-00	74 C M	

330-00	75C F	黄班REP変化 (AMD?)
325-00	77C F	
404-00	77C F	黄班晶洞 (AMD?)
247-99	79C F	
94-00	80CM	
239-00	80C F	AMD及びAMDの家族歴
459-00	80CM	
294-00	84C F	AMD
33-99	86C F	AMD
457-00	89C F	AMD
205-98	91CM	
242-00	99C F	

「D」表において晶洞を示す；

「+」アッセイに従う陽性標識；「-」標識なし；「+/-」弱い標識；「-/+」非常に弱い標識

【0159】

実施例3. Bruch膜における最終補体複合体堆積、年齢、およびAMDの間の関係の決定

補体タンパク質および阻害剤に加えて活性化補体複合体の完全スペクトルがRPE-脈絡膜界面に存在するという観察に基づき、C5b-9最終補体複合体の分布を年齢が1歳未満ないし94歳の範囲の30名のヒト・ドナーの眼において調べた。年齢が60を上回るドナーをAMDを患うドナーと患っていないドナーの間で均等に分けた。要約すると、脈絡毛細管板と会合するC5b-9の強度および分布とAMDの診断との間に強い相関が観察された。

【0160】

アルデヒド固定化矢状くさびをアクリルアミドおよび最適切断温度化合物に浸潤させて埋め込んだ。凍結切片を調製し、C5b-9最終補体複合体新抗原を指向する2種類の異なるモノクローナル抗体で標識した。

【0161】

注目すべきことに、評価したドナーのほとんどにおいてBruch膜もこれらの抗体と反応した。若年ドナーにおいては、Bruch膜の外部コラーゲン層においてC5b-9が観察され、内部コラーゲン層では標識が比較的少なかった。幾名かの若年ドナーにおいては、脈絡毛細管板の基底および側面への散在性の標識も観察された。高齢の個体においてはBruch膜内のC5b-9の分布が内部コラーゲン層に向かって「シフト」した。これらの個体においては、C5b-9が弾性膜の両側または、幾つかの場合には、内部コラーゲン層内のみに観察された。加えて、我々が従来記述しているように (Mullins et al. FASEB J. 2000)、高齢個体においては抗体がすべての晶洞表現型に強く結合するC5b-9を指向した。重要なことには、脈絡毛細管板全体 (内皮、周皮細胞、および関連細胞外マトリックス) の強い標識が、AMDの診断がないより高齢の年齢一致ドナー (10名のうちの2名) と比較して、ADMを患うドナー (10名のドナーのうちの9名) において観察された (図2)。

【0162】

C5b-9複合体がRPEおよび脈絡膜細胞膜と会合する (おそらく、挿入されている) という観察 (上記参照) と組み合わせると、これらのデータは、AMD被験者の脈絡毛細管板がAMDを患っていない個体よりも厳しい攻撃の下にあり得ることを示す。これは、AMDを患う個体における局所細胞が補体活性化を阻害し、および／またはそれに対してそれら自体を防御できないためであり得る。AMDドナーに由来する試料中の免疫反応性C5b-9の分布およびC5b-9の検出可能なレベルは、補体経路阻害剤、例えば、クラスタリン、ビトロネクチンCD56およびCD55が最終経路の抑制に失敗し、それによりMACの形成が許容されることを示す。脈絡毛細管板に対する補体介在損傷は、それが直接挿入によるものであろうと傍観者効果によるものであろうと、脈絡膜による異常応答 (例えば、炎症、サイトカイン分泌、血管新生) および／または脈絡毛細管板細胞の死につながり得る。これらの現象は、次に、RPEを含む周囲細胞のさらなる機能不全および死、並びに晶洞の生合成につながり得る。これはAMDの病因に関する我々の考察のパラダイムシフトを表すが、同様のプロセスがアテローム性動脈硬化およびアルツハイマー病を含む他の疾患において実際に有効である。これらのデータは、Bruch膜がその生理学的に「正常な」状態において補体の非通常活性化表面として機能すること

ができ、および／または健常脈絡膜における他の構造と比較して活性化C5b-9のBruch膜からの除去に劣るという証拠も提供する。正確な経路および関与する初期現象がなんであろうと、補体活性化がRPE-脈絡膜界面で慢性的に生じ、かつ脈絡毛細管板と会合するC5b-9の強度および分布とAMDの診断との間に強い相関が存在することは明らかである。

【0163】

実施例4. ヒトの眼におけるRPEおよび脈絡膜細胞による補体経路関連タンパク質のmRNAの発現

晶洞およびBruch膜において検出される補体成分が遠く離れて（すなわち、肝臓）合成されるのか、または特定の眼細胞によって局所的に産生されるのかを決定するため、全RNAをヒト・ドナーに由来する神経網膜、RPE-脈絡膜複合体、単離RPE細胞、および肝臓から単離した。RNAを逆転写し、得られたcDNAをPCRのテンプレートとして用いた。ヒトリンパ球から単離したゲノムDNAを、DNA混入の効果についての対照に用いた。評価した具体的な補体調節因子を表3に示す。注目すべきことに、C3およびC5はRPEによってAPP、クラスタリン、およびH因子として合成される（これもMullins et al. FASEB J. 2000を参照）。RPEによっては合成されない幾つかの他の補体成分、例えば、C9およびMASP-1は、隣接脈絡膜および／または網膜細胞によって合成され、したがって、Bruch膜における補体活性化に寄与することが可能である。

【0164】

これらの遺伝子発現データは、Bruch膜における補体の活性化および、おそらくは、早期AMDの病因における局所産生補体成分の役割を示す。APP2、C3およびC9の見かけの発現レベルにおける幾らかの相違がAMDを患う1名ドナーにおいて注目されたが、これらのデータを大きな試料セットで検証することはなかった。その代わりに、AMD有り無しのドナーの間での発現レベルの相違を調べるため、定量的遺伝子発現研究を開始した（下記表4および実施例4を参照）。

【0165】

【表3】

表3. 補体経路成分（RT-PCR）

	Ret.	R/Ch	RPE	ゲノム DNA	肝臓
MBL-1	+	+	+	-	-
MBL-2 (2)	-	-	-	-	+
MBPC (1)	-	-	-	-	+
CRP-1	-	-	-	-	+
APP1	-	+	+	-	-
APP2	-	+	+	-	小
MASP1	-	+	-?	-	+
C3	+	+	+	-	+
C5	+	+	+	-	+
C9	+	+	-	-	+
HCR1	+	+	-	-	+
HCR2	+/-	+/-	+	+/-	+
H因子	+	+	+	-	+
VN	+	+		-	+
クラスタリン	+	+	+	-	
CD44	+	+		-	
CD63	+	+	+	-	+
CD68	?	+		-	

【0166】

実施例5. 遺伝子アレー分析を用いるRPEおよび脈絡膜による補体経路関連成分遺伝子の発現の分析

RT-PCR分析によって同定される遺伝子発現のパターン（上記）に加えて、遺伝子アレー分析から誘導されるデータがPREおよび／または脈絡膜による補体経路（1つもしくは複数）における特定の関与体の発現および生成量に関する新規情報をもたらしている（表4）。最も重要なことには、これらのデータは、補体の活性化および阻害に関与する分子の大部分がRPEおよび脈絡膜細胞によって局所的に発現することを確認する。また、これらはAMDの病因において活性であり得る特定の経路の洞察ももたらす。

【0167】

これらの研究においては、2週間ないし101歳の年齢の78名のヒト・ドナーの眼に由来する赤道RPE (equatorial RPE) / 脈絡膜複合体の4mm径パンチからmRNAを単離した。50歳を越えるこれらのドナーのうちの31名はAMDの臨床診断を受けていた。補体経路に関連する幾つかの特定の成分のmRNA発現レベルを、この31名のAMDドナーの群とAMDを患っていない33名の年齢一致ドナーとで比較した (表4)。RPEおよび/または脈絡膜細胞によるC1q、C1r、C1s、C2 (低生成量)、C3、C4、C5、C6 (低生成量)、C7、C8およびC9の局所発現は確認されており、かつAMD疾患状態の関数として定量化されている (表4)。さらに、マンノース結合レクチン、H因子、クラスタリン、ビトロネクチン、および免疫グロブリン鎖前駆体を含む補体経路の多くの調節因子のmRNAの発現レベルが決定されており、かつAMD疾患状態の関数として定量化されている (表4)。加えて、これらの分析は、RPEおよび/または脈絡膜細胞による多くのさらなる補体経路関連分子の発現を明らかにしている (表4)。これらの分子のうちの幾つかは、対照と比較して、AMDを患う個体において有意に上方調節されている (例えば、IgJ鎖、Igλ鎖) か、または下方調節されている (例えば、補体6、クラスタリン)。継続中の研究はこれらのデータの検証に向けられている。

【0168】

【表4】

表4：補体経路成分 (遺伝子発現アレー分析)

mRNA	生成量	対照 x100 AMD
ヒトIgJ鎖	+	28%
ヒト Igλ 鎖	++	34%
ヒトIgGFc断片	+	35%
HSP 70	+	41%
補体C2	+/-	48%
CRP	+/- to +	61%
C4結合タンパク質	+	61%
アルファー2-マクログロブリン	+	66%
補体C1q	+/++	69%
ストレス誘導 リンタンパク質 1	+	70 %
熱ショックタンパク質75	+	72%
補体C3a受容体1	+	73%
補体C8アルファ鎖	+	75%
補体C3	++	78%
マンノール結合レクチン	+	80%
Ficolin 2	++	82%
補体C7	+	83%
ビトロネクチン	++	87%
IgGFc結合タンパク質	++	88%
Ig 重鎖C領域a1	++	88%
補体C9	+	90%
CD59	++	90%
X因子	++	92%
MBLセリンプロテアーゼ-2	+	92%

補正成分受容体2	+/-	93%
補体8ガンマ鎖	++	94%
補体C1s	++	95%
Ficolin 3	+	96%
補体C5	+	99%
補体4a	+	100%
Ficolin-1	+	101%
H因子	++	104%
補体C1q 結合タンパク質	+	107%
補体C1r	+	107%
Igカッパ可変ID-8	++	133%
クラスタリン	++	142%
補体C6	+/-	185%

生成量（相対信号）：1-1000（+/-）；1000-50,000（+）；>50,000＝（++）

【0169】

実施例6. 補体活性化経路（1つもしくは複数）の特徴付け

C5b-9複合体は、それらがRPE-脈絡膜界面に十分な量存在する場合、おそらくRPEおよび脈絡膜細胞に対する深刻な損傷を生じるため、AMDを患う個体におけ

る補体活性化の機構（1つもしくは複数）を特徴付ける研究を行っている。少なくとも3つの補体活性化の経路が記述されている。これらには、免疫グロブリンおよびC1qによって活性化される古典経路、細胞表面で活性化される代替経路、並びに急性期反応体マンノース結合タンパク質（MBP）が代替および／または古典経路に沿う補体活性化を活性化するレシチン経路が含まれる。

【0170】

3つの活性化経路の各々における公知の分子の関係に基づき、補体活性化が古典経路に沿って生じる場合、免疫グロブリンIgGおよびIgMに加えてC1qの検出可能な標識が晶洞およびBruch膜に存在するはずであることが予想される。他方、活性化が代替経路に沿って生じる場合にはH、I、D、およびB因子が検出可能であり、活性化のレシチン経路が関与する場合にはマンノース結合タンパク質が存在するものと期待される。

【0171】

C1q—古典経路の指標—は、幾らかの晶洞において検出はされるものの、主要晶洞成分ではない。同様に、補体活性化の古典経路に関与する他のタンパク質は脈絡膜においてのみ検出され、Bruch膜および／または晶洞においては検出されない。集合的に、これらのデータは、古典経路が補体カスケードの活性化に関与する主要経路ではない可能性があることを示唆する。しかしながら、生化学的および免疫組織化学的アプローチの両者を用いて、免疫グロブリンが晶洞内で同定されている（表2および4）。したがって、免疫複合体の形態にある免疫グロブリンは古典経路を誘発することができる。

【0172】

今日までに集められたデータは、代替経路の上記主要活性化因子のほぼすべてが晶洞および／またはRPEに存在することを明らかにする。6種類のタンパク質—C3、B因子、D因子、H因子、I因子およびプロパージン—は代替経路の開始、認識、および増幅を行ない、これは活性化因子結合C3／C5転換酵素の形成を生じる。代替経路活性化因子の認識は細胞膜に結合したC3を含む。H因子—C3およびC5転換酵素の崩壊を促進し、かつ表面結合C3bのI因子介在開裂の補因子として作用することにより補体活性化の増幅を防止するように機能する、補体の代替経路の液

相調節因子-1はすべての晶洞表現型の主要成分である。C3転換酵素のさらなる活性化およびC3のより小さい分子への開裂は、増幅ループを増殖させるC3bの産生を生じる。この反応からのさらなる開裂生成物、C3d分子も、すべての晶洞表現型に存在することが見出される。

【0173】

レシチン経路の強力な発動因子であるものと信じられるマンノース結合タンパク質もすべての晶洞表現型に存在し、これはレシチン経路もRPE-脈絡膜界面で作動可能であることを示す。

【0174】

これまでに集められたデータは、RPE-脈絡膜界面のレベルでの補体カスケードの活性化が、この時点で古典経路による幾らかの活性化を完全に除外することはできないものの、代替および／またはレシチン経路によって生じることを示す。活性化の正確な機構がなんであろうと、これらのデータは、局所的な補体活性化がRPE-脈絡膜界面で生じ、それが有意の組織損傷および症状を誘発し得るというさらなる証拠を提供する。

【0175】

実施例7. ヒト・ドナーの眼におけるRPEおよび脈絡膜細胞での原形質膜関連C5b-9の生化学的評価

C5b-9複合体がBruch膜近傍でRPEおよび／または脈絡膜細胞の原形質膜に挿入されているかどうかを決定するため、生化学的研究を行った。様々な年齢の5名のドナー（2名はAMDを患う）に由来する単離RPE細胞およびRPE／脈絡膜層をこれらの実験において用いた。試料をホモジナイズし、スクロース勾配超遠心法を用いて原形質膜を集めた。これらの膜調製品に加えて細胞質ゾル上清画分から誘導されるタンパク質を、抗補体抗体を用いるELISAおよびウェスタンブロット分析により、C5b-9複合体の存在について試験した。商用C5b-9検出キット（Quidel、San Diego）を用いて、間接ELISAに加えてキャプチャーELISAを行った。

【0176】

これらの分析の結果は、C5b-9 MAC複合体がAMD有り無しの高齢ドナーに由来するRPEおよび脈絡膜試料から単離した原形質膜中に存在し、かつ優性であるこ

とを示す(図3、4、および5)。対照的に、10歳のドナー(409-00)に由来する細胞は膜および細胞ゾル調製品の両者においてC5b-9のレベルはほとんど検出不能である。最高レベルのC5b-9は新生血管AMDを患うドナー(239-00)に由来する細胞において検出され、これはAMDにおける補体活性化およびMAC形成が脈絡膜血管新生のプロセスに関連し得るという仮説を支持する。これらのドナー間でのC5b-9のレベルおよび分布におけるこれらの相違は免疫組織化学的に確認された。晶洞およびBruch膜の強い陽性標識に加えて脈絡毛細管板の幾らかの標識が新生血管AMDドナーにおいて観察された。対照的に、若年ドナーの組織は、Bruch膜近くの脈絡膜の幾らかの領域において散発的に、かつ弱く陽性であった。加えて、C5b-9複合体の一部であるタンパク質の存在がウェスタンブロット分析によって確認された。RPE膜およびRPE-脈絡膜複合体から誘導される膜におけるC6およびC9を指向する抗体での陽性標識は、補体複合体の膜挿入がこれらの組織において生じ、この挿入がRPEおよび/または脈絡膜に対して傷害性であり得ることを示す。

【0177】

実施例8. 糸球体腎炎に関連する晶洞の特徴付け

膜増殖性II型糸球体腎炎(MPGN-II)を患う多くの被験者は、晶洞に類似するBruch膜内の堆積の存在を特徴とする。しかしながら、糸球体腎炎関連晶洞はAMDを患う個体における晶洞よりも若い年齢で現れる。2種類の異なる糸球体症を患い、その両者が糸球体における補体堆積を含むヒト・ドナーから得られた眼における晶洞の構造および組成を調べた。それぞれ膜性および連鎖球菌後糸球体腎炎と診断された2名のヒト・ドナーから得られた眼を組織化学的、免疫組織化学的、および超微細構造的に分析した。これらの特徴をAMDを患う個体から誘導されたものと比較した。

【0178】

両タイプの糸球体腎炎における網膜下色素上皮(RPE)堆積は大量であり、構造および組成的の両方でAMDを患うドナーにおける晶洞と区別不能である。糸球体腎炎関連晶洞はスダン親和性を示し、フィリピンを結合し、かつビトロネクチン、補体C5およびC5b-9複合体、TIMP-3、並びにアミロイドP成分を指向する

抗体と反応する。膜性GNドナーには由来するが連鎖球菌後GNドナーには由来しない晶洞は、ピーナッツ・アグルチニン並びにMHCクラスII抗原およびIgGを指向する抗体と反応する。これらの堆積の超微細構造的な特長もAMD関連晶洞と同一であった。

【0179】

これらのデータは、眼晶洞関連膜性および連鎖球菌後／分節糸球体腎炎の組成および構造が、一般に、AMDを患う個体における晶洞に類似することを示す。これらのデータは、慢性補体経路活性化が晶洞生合成およびBruch膜の病因において重要な寄与因子であることを示す他のデータを支持する。不完全な補体活性化単独でBruch膜における晶洞の形成を誘発するのに十分であり得ると考えられる。

【0180】

実施例9. AMDを患うドナーの血清および／または晶洞における自己抗体

幾らかのAMD被験者において血清自己抗体が存在することが観察されている。この研究の目的は、AMDおよび眼晶洞を患う被験者が、そのような障害を患っていない対照と比較したとき、補体化合物に対する特異的自己抗体のレベルが増加しているかどうかを決定することである。自己抗体または補体系の介在物質の同定はAMDまたは他の黄斑変性関連障害を同定するための診断手段を提供する。

【0181】

晶洞生合成およびAMDにおける自己抗体の役割と取り組むため、AMDおよび／または晶洞を患うドナーの血清中に存在するであろう抗晶洞／Bruch膜／RPE自己抗体を同定するために富化晶洞調製品を用いて一連の実験を行った。

【0182】

#69 Beaverブレードを用いるBruch膜の壊死組織切除によって得られた富化晶洞調製品（DR+）及び対照（DR-）調製品から、プロテイナーゼ阻害剤カクテルおよび穏やかな洗浄剤を含むPBSを用いてタンパク抽出物を調製した。タンパク質を10-20%勾配ミニSDSゲル（Amresco）を用いて分子量で分離し、ウェスタンブロット分析用のPVDF膜に移した。ドナー血清中のあらゆる抗網膜自己抗体を検出するため、50名の正常ヒト網膜に由来するヒト網膜タンパク質を備えるPVDF細

片も用いた。

【0183】

上述と同じ8名のドナーに由来する血清をスクリーニングした。1名のAMDドナー（#90-98）に由来する血清がRPE（DR+およびDR-の両者）およびRPE／脈絡膜調製品における約35kDaのバンドを正に標識した。約60kDaの第2バンドはDR+タンパク抽出物においてのみ弱く標識された。AAAドナー（#189-97）に由来する血清は約53kDaのタンパク質（1種類もしくは複数種類）と反応した。このバンドは3種類のタンパク抽出物のすべてにおいて標識された。この血清試料がDR+試料においてのみ標識した約64kDaのバンドが1つ存在した。

【0184】

AMDおよび／または晶洞を患うドナーにおける血清抗晶洞／RPE自己抗体の存在は、これらの状態において共有される免疫介在プロセスについてあり得る役割をさらに示す。

【0185】

実施例10：生活AMD被験者の血清中の自己抗体の分析

AMD被験者の血清が自己抗体を有するかどうか、または血清タンパク質の生成量および／または移動度に変化があるかどうかを決定するため、臨床的にAMDと診断された20名の被験者及び対照としての役割を果たす20名の非罹患被験者から血漿を集めた。

【0186】

幾つかの実験については、血清をSDS-PAGEによって分離し、タンパク質を銀染色もしくはクーマシーブルーのいずれかで可視化するか、または（準備のため）タンパク質をアミノ酸配列決定用のPVDF膜に移した。AMDドナーのサブセットにおいて血清タンパク質の異常性を検出した。これらの相違には、対照ドナーにおいては存在しなかった、幾名かのAMD被験者の血清における「追加」バンド（～25、29、30および80kDaの分子量）の存在が含まれていた。これらの分子のアミノ酸配列決定は、N末端配列がハプトグロビン（25kDa）並びに免疫グロブリンカッパ（29kDa）、ラムダ（30kDa）、およびガンマ（80kDa）と一致することを明らかにした。

【0187】

実験の第2セットにおいては、AMD及び対照ドナーに由来する血清をRPEおよび脈絡膜タンパク質に対する自己抗体の存在についてスクリーニングする。組織切片中に晶洞の弱一中免疫反応性が予め観察された実験の拡張として、精製ビトロネクチンを電気泳動で分離し、PDVFにブロットした。ビトロネクチンは（実施例1に詳述されるように）従来晶洞関連分子として同定されているため、AMD被験者に由来する血清を抗ビトロネクチン免疫反応性の存在について評価した。これらの血清中で65kDaおよび75kDaビトロネクチン種の両者の強い標識が同定され、これはAMD血清が、少なくとも幾つかの晶洞関連分子および／またはBruch膜成分を指向する自己抗体を含むことを示す。

【0188】

眼組織におけるAMD自己抗体およびそれらの標的を同定するためのさらなるアプローチとして、多数の晶洞を有する1名のドナーおよび9ヶ月齢のドナーに由来するRPE-脈絡膜タンパク質を分子量に従って電気泳動で分離し、ニトロセルロースに移した。その後、タンパク質を3名のAMDドナーに由来する血清またはビトロネクチンを指向するポリクローナル抗血清のいずれかで免疫標識した。AMD血清は多数の晶洞を有するドナーに由来する試料中にのみ存在する約65、150および200kDaのバンドと反応した。これらの結果は、年齢および／または晶洞の存在がAMD自己抗原の増加につながることを示す。

【0189】

実施例11：放射状晶洞の患者におけるRPE、網膜、および胎児眼タンパク質を指向する自己抗体

神経網膜、単離RPE細胞、およびヒト胎児眼（96日）全体から抽出したタンパク質を二次元ゲル電気泳動で分離した後、（a）分離されたタンパク質をPVDF膜に移すか、または（b）Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) 質量分析に適合する改変溶液で2Dゲルを銀染色した。

【0190】

早期発症黄班ジストロフィー放射状晶洞の患者から誘導したヒト血清でブロットを探索した後、ヒト免疫グロブリンを指向するアルカリホスファターゼ結合抗

体で固定化一次抗体を検出したところ、正に標識されたスポットは銀染色したゲル上の対応スポットと一致した。ウェスタンブロット上の自己抗原に対応する銀染色タンパク質スポットを切り出してエンドプロテイナーゼLys-c／トリプシンを含む溶液中で消化し、得られたペプチドを、タンパク質をそのペプチドの分子量に基づいて同定することを可能にする技術 (Wheeler et al., Electrophoresis, 17(3):580-7 1996) であるマトリックス支援レーザー堆積イオン化質量分析によって分析した。MALDI-MSは内部アミノ酸配列決定の補足として用いることができる。J. Walker (Ed.), The Protein Protocols Handbook (pp. 541-555, Totowa:Humana Press)。この技術は、これらの組織内の幾つかの自己抗原の同定をもたらした。

胎児の眼組織から同定されている7種類のタンパク質は以下の通りである：

(i) #1および#2 — MW=27KDおよび25KD — ベータクリスタリンA4 (Slingsby et al., Exp Eye Res, 51:21-6, 1990) ；

(ii) #3 — MW=25KD — ベータクリスタリンA2および痕跡量のベータクリスタリンA4 (Slingsbyら、前出) ；

(iii) #4 — MW=26KD — ベータクリスタリンA3 (Slingsbyら、前出) ；

(iv) #5 — MW=18KD — ベータクリスタリンS (Quax-Jeuken et al., EMBO J, 4(10):2597-602, 1985) ；

(v) #6 — MW=26KD — ベータクリスタリンA4；並びに

(vi) #7 — MW=80KD-78KD グルコース調節タンパク質 Kiang et al., Chin J Physiol, 40:213-9, 1997) 。

6種類のタンパク質を網膜タンパク質抽出物から同定した：

(i) #1. MW=60KD — カルレチクリン (Kovacs et al., Biochemistry, 37(51):17865-74, 1998)

(ii) #2. MW=33KD — おそらく補体化合物1 (別名、糖タンパク質GC1QB、ヒアルロナン結合タンパク質；Lynch et al., FEBS Lett, 418(1-2):111-4, 1997)

(iii) #3. MW=29KD — 14-3-3タンパク質イプシロン (Yamanaka et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:6462-7, 1997)

(iv) #4. MW=85KD — セロトランスフェリン (Campbell et al., J Biol Chem, 252:5996-6001, 1977)

(v) #5. MW=80KD — アルブミン

(vi) #6. MW=75KD — ケラチン (Hintner et al., J Invest Dermatol, 93:656-61, 1989)。

2種類のタンパク質をRPEタンパク質抽出物から同定した：

(i) #1. MW=120KD — ピルビン酸カルボキシラーゼ；および

(ii) #2. MW=88KD — 仮想タンパク質DKFZp762H157.1 (別名、ビリニン2；Burgess et al., J. Immunol., 1992, 149:1847-1852、および米国特許第5,773,573号)。

【0191】

実施例12：AMD患者におけるRPE、脈絡、および網膜タンパク質を指向する自己抗体

別のセットの実験において、上述のように二次元ゲル電気泳動に続くブロットでヒト脈絡膜 (ドナー325-00、77CF)、RPE (ドナー318-00、67CM) および網膜 (ドナー294-00、84CF、AMD) に由来するタンパク抽出物を探索するのに、ドナー#189-97 (AMDおよびAAAの両者と診断されている) に由来する血清を用いた。推定自己抗原に対応する幾つかの正に標識されたスポットが同定された。これらのタンパク質スポットの特徴は以下の通りであった：

脈絡膜抽出物タンパク質：

(i) 86KDのおおよそのMW、5ないし6のPIを有する3つのスポットが同定された；

(ii) 60KDのおおよそのMW、7ないし8のPIを有する4つのスポットが同定された；

(iii) 45KDのおおよそのMW、6ないし7のPIを有する5つのスポットが同定された；

(iv) 30ないし43KDのおおよそのMW、4.5ないし6のPIを有する6つのスポットが同定された；

(v) 33および35kDのおおよそのMW、約7.5のPIを有する2つのスポットが同定

された；

(vi) 29KDのMW、5ないし5.5のPIを有する1つのスポットが同定された；並びに

(vii) 25KDのおおよそのMW、約7.5のPIを有する1つのスポットが同定された。
。

RPE抽出物タンパク質：

(i) 86KDのおおよそのMW、5ないし6のPIを有する3つのスポットが同定された；

(ii) 95-100KのおおよそのMW、PI 6.5-7を有する2つの集密スポットが同定された；

(iii) 94KDのおおよそのMW、5ないし6のPIを有する2つのスポットが同定された；

(iv) 60KDのおおよそのMW、PI ~4.5を有する1つのスポットが同定された；

(v) 33および35kDのおおよそのMW、PI ~7.5を有する2つのスポットが同定された；並びに

(vi) 35ないし43KDのおおよそのMW、6ないし7のPIを有する5つのスポットが同定された；

網膜抽出物タンパク質：

(i) 95-100KのおおよそのMW、PI 6.5-7を有する3つの集密スポットが同定された；

(ii) 33および35kDのおおよそのMW。PI ~7.5を有する2つのスポットが同定された；

(iii) 30-33KDのおおよそのMW、PI ~7を有する1つのスポットが同定された；

(iv) 60KDのおおよそのMW、PI 4-5を有する幾つかの集密スポットが同定された；

(v) 28-30KDのおおよそのMW、PI 4.5-5を有する1つのスポットが同定された；並びに

(vi) 28ないし65KDに4ないし7.5のPIを有する幾つかのスポットが同定された

。

【0192】

実施例13：晶洞生合成およびAMDにおけるマーカーのさらなる血清学的試験

視覚測定、ステレオ網膜黄斑写真撮影、および周辺写真撮影を研究の開始時およびその後6ヶ月ごとに行うことができる。被験者が研究に入ったときおよびその後6-12ヶ月ごとに血液および血清を採取することができる。さらなる遺伝的研究のため、各血液試料の一部からDNAを調製することができる。血清自己抗体および免疫複合体の存在を標準プロトコルを用いて決定することができる。加えて、血清をAMD有り無しのドナーから誘導した組織切片と反応させた後、ヒト免疫グロブリンに吸着している二次抗体と反応させることができる。AMDおよび非AMDドナーに由来する網膜/RPE/脈絡膜のウェスタンブロットを血清試料と共にインキュベートして自己抗体が反応する特定のバンドを同定することもできる。

【0193】

以下のタンパク質（多くは他の年齢関連状態および／またはMPGNにおいて観察される）を指向する抗体の存在も決定することができる：IV型コラーゲン、糸球体基底膜、好中球、細胞質ゾル（c-ANCA、p-ANCA）、C3転換酵素（C3腎炎因子）、アルファ-1抗トリプシンレベル（MPGNにおいて減少）、イプシロン4対立遺伝子、アポリポプロテインE、GFAP、ANA、血清老化細胞抗原、S-100、2型プラスミノゲン活性化因子、アルファ-1-アンチキモトリプシン、SP-40,40、内皮細胞、壁細胞、ミトコンドリア、Jo-1、島細胞、内耳抗原、表皮溶解Bullosa Acquista、筋内膜IgA、癌抗原15-3、リン脂質、ニューロン核、カルジオリピン、およびガングリオシド。

【0194】

補体成分に対する自己抗体に加えて、被験者に由来する血清をAMD有り無しのドナーから誘導した組織切片と反応させ、次いでヒト免疫グロブリンに吸着している二次抗体と反応させることができる。AMDおよび非AMDドナーに由来する網膜/RPE/脈絡膜のウェスタンブロットを血清試料と共にインキュベートして自己抗体が反応する特定のバンドを同定することもできる。

【0195】

さらに、自己抗体以外に、以下のタンパク質のレベル、自己抗体応答のさらなる指標、慢性炎症および／または急性期応答を臨床診断研究室でアッセイすることができる。これらには、Bence Jonesタンパク質、血清アミロイドA、M成分、CRP、マンノース結合タンパク質、血清アミロイドA、C3a、C5a、他の補体タンパク質、凝固タンパク質、フィブリノーゲン、ビトロネクチン、CD25、インターロイキン1、インターロイキン6、およびアポリポプロテインEが含まれ得る。血清タンパク質電気泳動、リンパ球幼若化、沈降速度、および自発性、全血、白血球カウントを測定することもできる。自己抗体応答、慢性炎症および／または急性期応答のさらなる指標をもたらす他のタンパク質をアッセイすることもできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、図示される(A)組織学的切片、および(B)網膜ニューロンに見られるように、網膜および脈絡膜の模式図である。A、アマクリン細胞；B、双極細胞；BM、Bruch膜；C、錐体細胞；CC、脈絡毛細管板；ELM、外部境界膜；G、神経節細胞；GCL、神経節細胞層；H、水平細胞；ILM、内部境界膜；INL、内部核層；IPM、光受容器間マトリックス；IS、桿体および錐体の内部セグメント；IPL、内部網状層；NFL、神経線維層；ONL、外部核層；OPL、外部網状層；OS、桿体および錐体の外部セグメント；PE、色素上皮；PRL、光受容器層；PT、光受容器細胞末端；R、桿体細胞；ST、脈絡膜の血管支質。

【図2】

図2は、ヒト・ドナーの眼のRPE-脈絡膜におけるC5b-9の分布および強度を示す。

【図3】

図3は、4名のヒト・ドナーの眼から単離されたヒトRPE細胞の細胞質ゾルおよび膜画分におけるC5b-9のキャプチャーELISA測定を示す。

【図4】

図4は、5名のドナーに由来するヒト脈絡膜の細胞質ゾルおよび膜画分におけるC5b-9レベルのキャプチャーELISA測定を示す。これらの膜関連画分はこれらの調製品において一貫して高レベルのC5b-9を示し、かなりの割合の複合体が常在

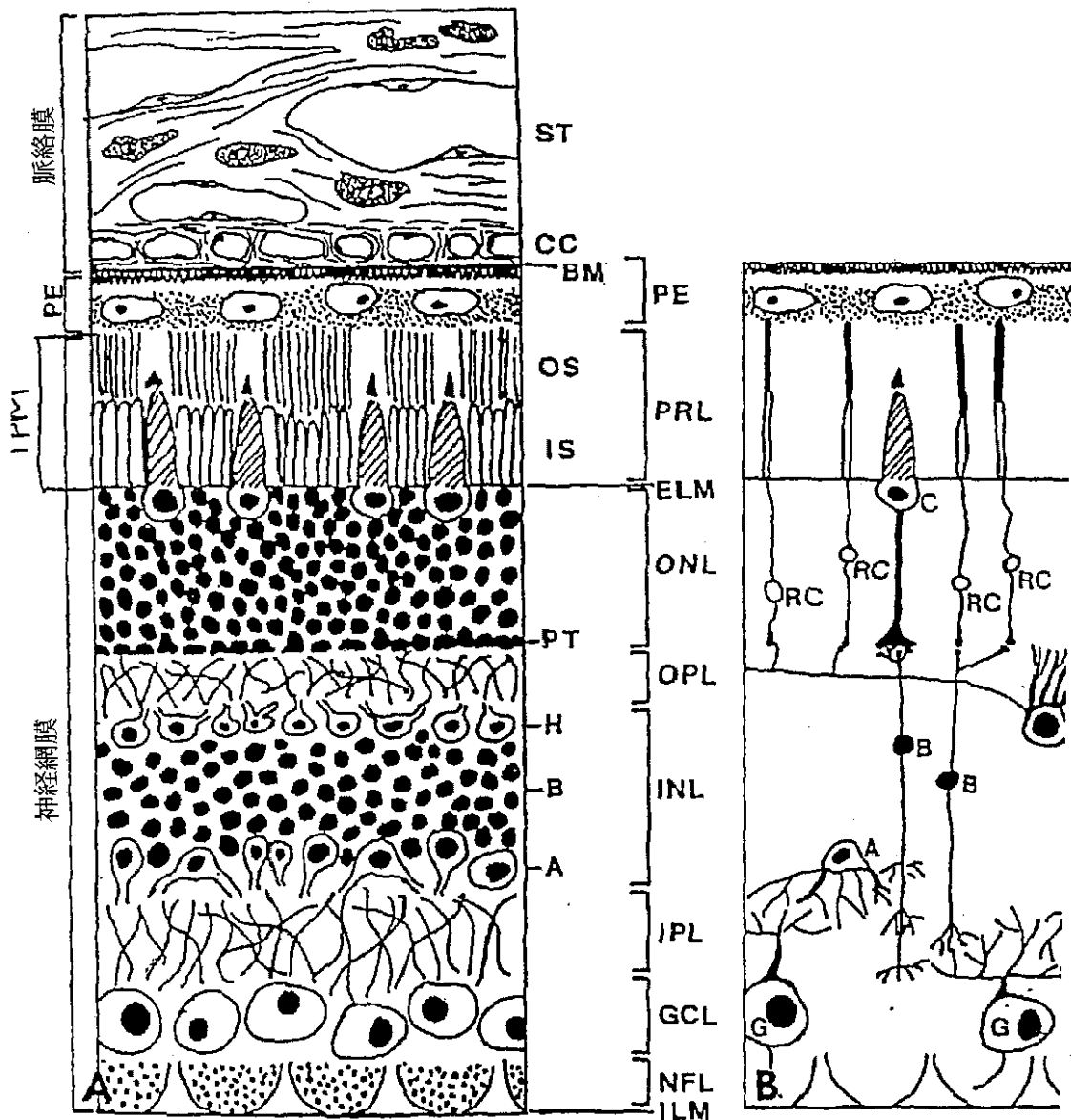
性および／または一時的脈絡膜細胞の原形質膜に挿入されていることが示される。
。

【図5】

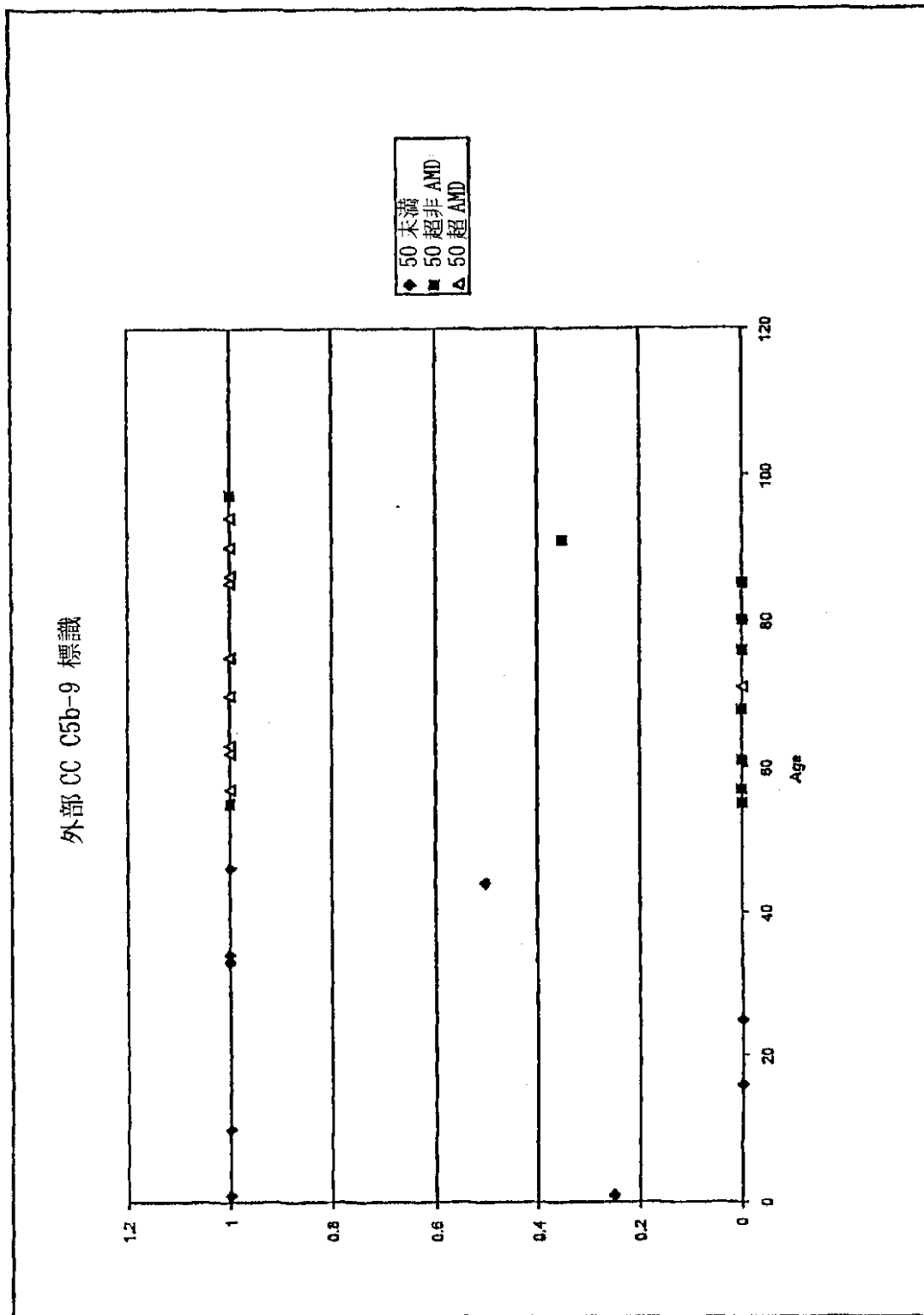
図5は、標準ELISA方法論を用いるキャプチャーELISAの結果の確認を提供する。以下の5名のドナー（彼らのうちの2名はAMDを患う）に由来する組織をこれらの実験において用いた。

364-00	78CM	
409-00	10CF	
457-00	89CF	AMD
243-00	80CF	
239-00	80CF	CNV（脈絡膜血管新生）を伴うAMD

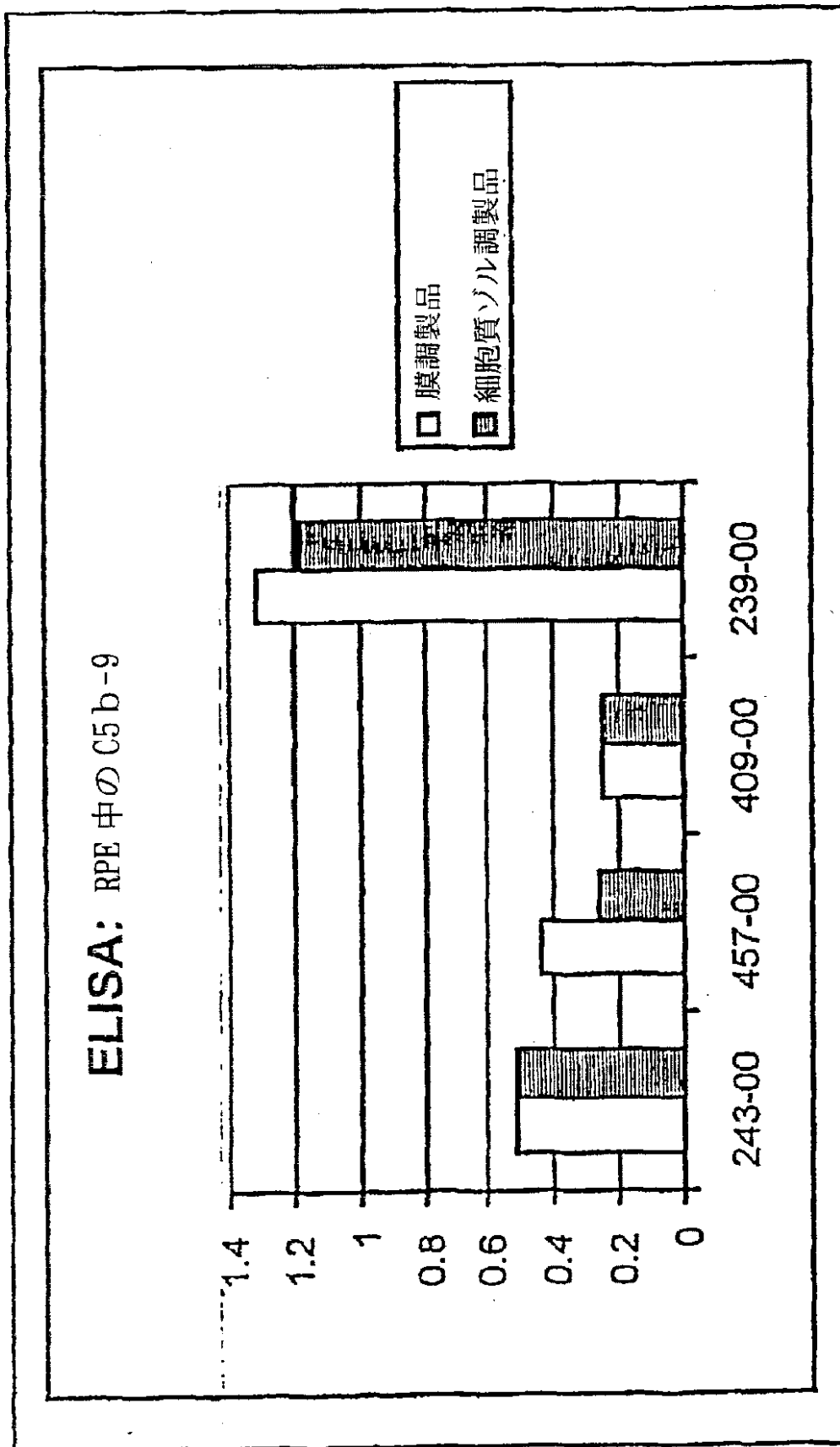
【図1】



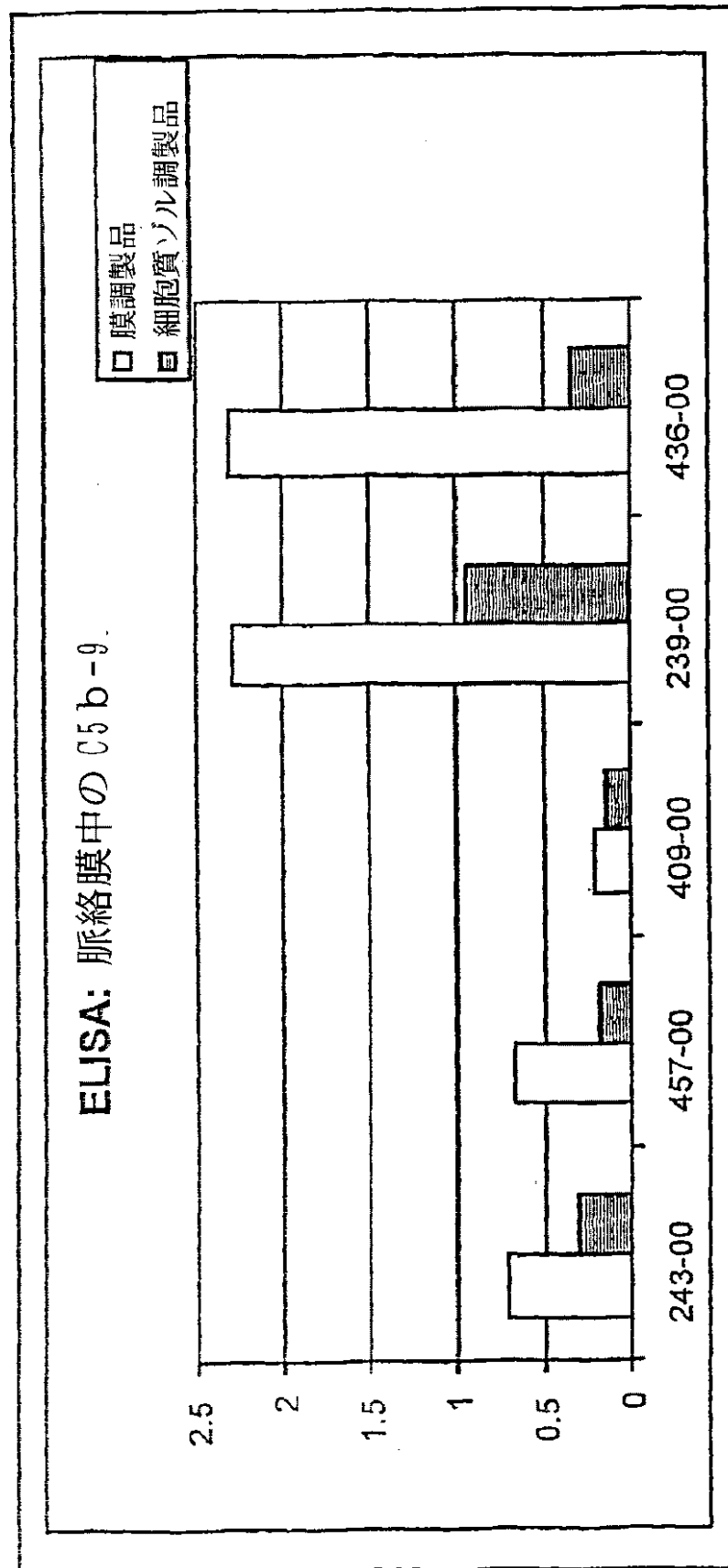
【図2】



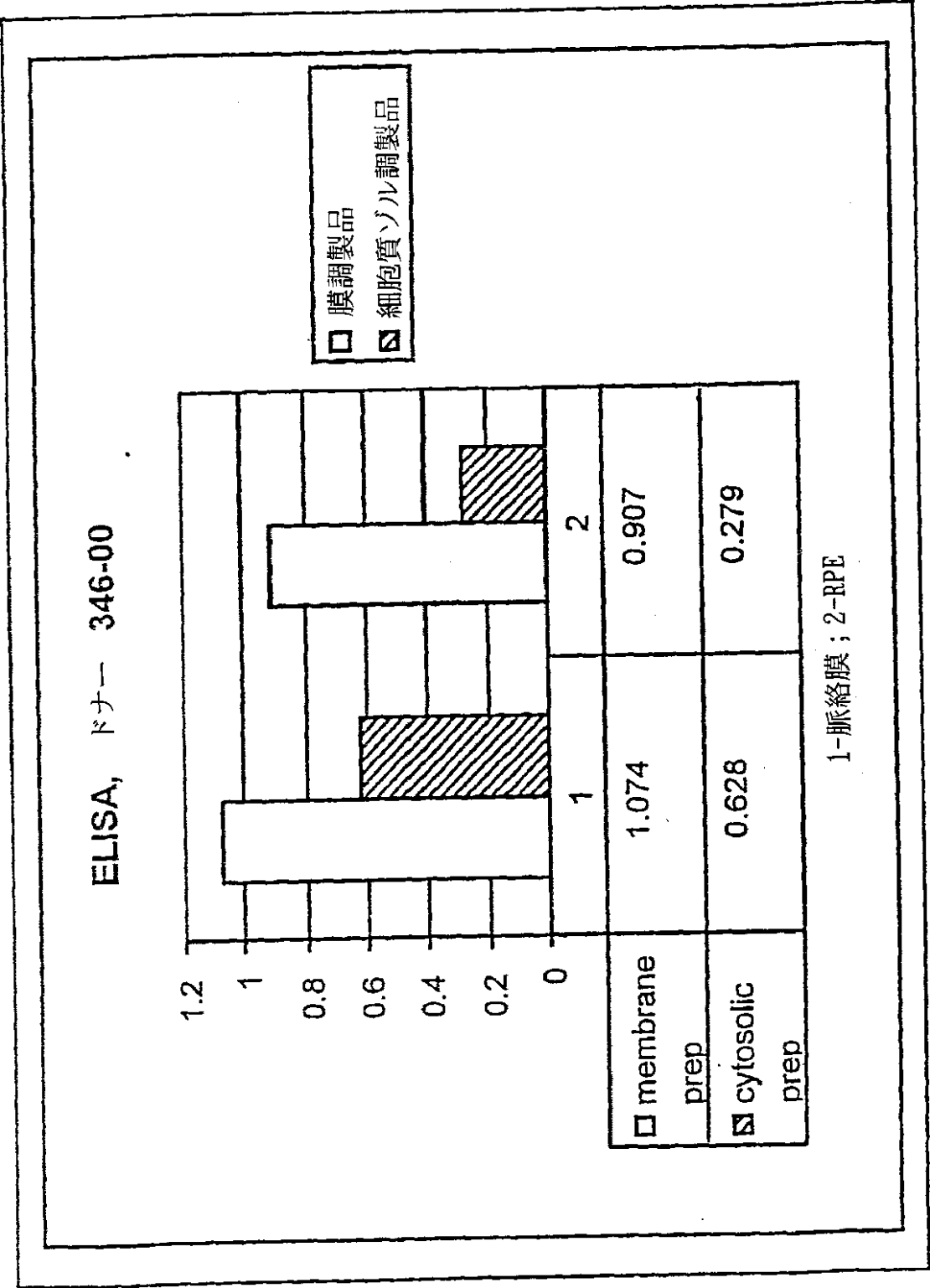
【図3】



【図4】



【図5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/13971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 17673 A (OCUTECH, INC.) 29 June 1995 (1995-06-29) page 3, line 35 -page 6; claims 1-29 ---	1-37
A	SACKS J G ET AL: "THE PATHOGENESIS OF OPTIC NERVE DRUSEN" ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY, XX, XX, vol. 95, no. 3, March 1997 (1997-03), pages 425-428, XP000911974 ISSN: 0003-9950 the whole document --- -/--	1-37
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 April 2002		Date of mailing of the international search report 16/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/13971

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DETRICK B ET AL: "CLASS II ANTIGEN EXPRESSION AND GAMMA INTERFERON MODULATION OF MONOCYTES AND RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS FROM PATIENTS WITH RETINITIS PIGMENTOSA" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 36, no. 2, August 1985 (1985-08), pages 201-211, XP000900830 ISSN: 0090-1229 the whole document ---	1-37
Y	TSCHOPP, JÜRGE ET AL.: "Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8beta and the bdomain of C9" J. IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 4, 15 August 1993 (1993-08-15), pages 2159-2165, XP001068925 cited in the application the whole document ---	1-37
Y	GREEN, W.R. : "Histopathology of age-related macular degeneration" MOLECULAR VISION, vol. 5, no. 27, 3 November 1999 (1999-11-03), XP001069182 the whole document ---	1-37
P,X	MULLINS R.F. ET AL.: "Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease" THE FASEB JOURNAL, vol. 14, no. 7, pages 835-846, XP001069183 USA the whole document -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/13971

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517673	A	29-06-1995	AU WO	1441395 A 9517673 A1
				10-07-1995 29-06-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/493	Z
G 0 1 N 33/493		33/50	L
33/50			T
		33/53	R
33/53		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	ムリンス ロバート、エフ アメリカ合衆国 アイオワ州 52241、コーラルヴィル、 ツェルブス ストリート、 2342		
Fターム(参考)	2G045 AA35 BB20 BB41 BB50 CA25 CA26 CB01 CB03 CB11 DA13 DA36 FB03 4B024 AA11 BA80 CA04 CA12 HA11 4B063 QA13 QA17 QA19 QQ08 QQ42 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR55 QR77 QS33 QS34 QX02 4C084 AA17 ZA332 ZB072		

专利名称(译)	黄斑变性相关疾病的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2003535581A	公开(公告)日	2003-12-02
申请号	JP2001581122	申请日	2001-04-30
[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		
[标]发明人	ヘイジマングレゴリーエス ムリンスロバートエフ		
发明人	ヘイジマン グレゴリー、エス ムリンス ロバート、エフ		
IPC分类号	G01N33/493 A61K38/00 A61K45/00 A61P27/02 A61P37/02 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P27/02 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/564 G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2333/4716 G01N2800/164 A61K47/46 A61K51/10		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K45/00 A61P27/02 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/493.Z G01N33/50.L G01N33/50.T G01N33/53.R C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/BB41 2G045/BB50 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB11 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/HA11 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/ZA332 4C084/ZB072		
优先权	60/200698 2000-04-29 US		
其他公开文献	JP2003535581A5 JP4764590B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及治疗，预防和诊断黄斑变性相关疾病的方法。

