(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-500910
(P2006-500910A)
(43)公表日　平成18年1月12日(2006.1.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
A01K 67/027	(2006.01)	A01K	67/027		4B024
A61K 31/7088	(2006.01)	A61K	31/7088		4B063
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4B064
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-584309 (P2003-584309)
(86)(22)出願日　平成15年4月16日 (2003.4.16)
(85)翻訳文提出日　平成16年12月20日 (2004.12.20)
(86)国際出願番号　PCT/EP2003/004003
(87)国際公開番号　WO2003/087368
(87)国際公開日　平成15年10月23日 (2003.10.23)
(31)優先権主張番号　02008761.5
(32)優先日　平成14年4月18日 (2002.4.18)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　60/431,173
(32)優先日　平成14年12月5日 (2002.12.5)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　505095121
アキュイティ　ファーマシューティカルズ、インク.
アメリカ合衆国、１９１０４　ペンシルバニア州、フィラデルフィア、マーケットストリート　３７０１
(74)代理人　100104411
弁理士　矢口　太郎
(74)代理人　100104215
弁理士　大森　純一
(74)代理人　100099656
弁理士　山口　康明
(72)発明者　ドルム、カリナ
ドイツ国、９７０７０　ヴルツブルグ、イネール　グラベン　１２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＮＳと眼の標的遺伝子を特異的に調節するための手段と方法及びその同定法

(57)【要約】
【課題】
【解決手段】　特に、ＣＮＳおよび／または眼の疾患を治療する医薬品を調整するため、標的の遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物を有する組成物を使用することについて報告し、前記組成物は血液ＣＮＳ関門と血液網膜関門の外に投与するように設計する。さらに、ＣＮＳまたは眼の疾患に関与するポリペプチドをコードする核酸分子を同定、入手する方法、前記疾患を診断する方法、及び前記に説明した方法に沿って同定された標的遺伝子の発現が欠乏した遺伝子組換え動物について提示する。さらに、ＣＮＳおよび／または眼に関連した疾患の治療に特に有用な薬物を同定し、単離する方法を提示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
治療有効量で標的遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物を有する組成物を被験者に投与する方法を有する、中枢神経系（ＣＮＳ）と眼の疾患の両方または一方を治療する方法であって、前記組成物は血液脳関門と血液網膜関門の両方または一方の外に投与されるものである。
【請求項２】
中枢神経系（ＣＮＳ）と眼の疾患の両方または一方を治療する医薬品を調合するため、標的遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物の使用法であって、前記組成物は血液脳関門と血液網膜関門の両方または一方の外に適用されるように設計するものである。
【請求項３】
請求項１の方法または請求項２の使用法において、前記疾患は眼に関連するものである。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか１つの方法または使用法において、前記疾患は血管新生（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ）および／または新血管新生（ｎｅｏｖａｓｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ）に関連するものである。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか１つの方法または使用法において、前記疾患は網膜色素上皮（ＲＰＥ）、神経感覚網膜、脈絡（ｃｈｏｒｉｏｄｅａ）のすべてまたはいずれかに関連するものである。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか１つの方法または使用法において、前記疾患は滲出型加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）または糖尿病性網膜症である。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１つの方法または使用法において、前記医薬品は眼球の内節に効果的であり（適用される）ように設計されているものである。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１つの方法または使用法において、前記組成物は血液網膜関門の網膜領域の外に適用されるように設計された形である。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか１つの方法または使用法において、前記化合物は前記遺伝子または遺伝子産物のインヒビター（阻害物質）／アンタゴニスト（拮抗物質）である。
【請求項１０】
請求項９の方法または使用法において、前記アンタゴニスト／インヒビターは遺伝子の発現または血管形成と血管新生の両方または一方に関係する遺伝子産物の活性を阻害するものである。
【請求項１１】
請求項９または１０の方法または使用法において、前記アンタゴニスト／インヒビターは前記遺伝子または遺伝子産物の核酸分子、ポリペプチド、抗体、またはリガンド結合分子であるか、これらに由来するものである。
【請求項１２】
請求項９または１１の方法または使用法において、前記アンタゴニスト／インヒビターは前記遺伝子または遺伝子産物のリボザイム、アンチセンス、またはセンス核酸分子である。
【請求項１３】
請求項９～１２のいずれか１つの方法または使用法において、前記アンタゴニスト／インヒビターは実質的にリボヌクレオチドで構成されるものである。
【請求項１４】

請求項１３の方法または使用法において、前記アンタゴニスト／インヒビターは実質的に二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）の一部を有するものである。
【請求項１５】
請求項１４の方法または使用法において、前記ｄｓＲＮＡは２１～２３ヌクレオチド長である。
【請求項１６】
請求項１４または１５の方法または使用法において、前記ｄｓＲＮＡ分子は末端３’水酸基を含むものである。
【請求項１７】
請求項１２～１６のいずれか１つの方法または使用法において、前記核酸分子は天然由来ＲＮＡの類似体である。
【請求項１８】
請求項１７の方法または使用法において、１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、または修飾により、前記核酸分子のヌクレオチド配列が前記遺伝子または遺伝子産物のヌクレオチド配列とは異なるものである。
【請求項１９】
請求項１０～１８のいずれか１つの方法または使用法において、前記遺伝子またはそのｃＤＮＡはヌクレオチド配列を有するか、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１～４のいずれか１つから成るグループから選択したアミノ酸配列をコードするものである。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれか１つの方法または使用法において、前記化合物は核酸分子であるか、核酸分子によってコードされ、ＣＮＳまたは眼の細胞に発現されるように設計されるものである。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１つの方法または使用法において、前記組成物は、血液脳関門または血液網膜関門の外に適用することで特徴付けられる、適当な担体により、ＣＮＳまたは眼の細胞または組織に導入されるように設計された形態である。
【請求項２２】
請求項１～２１のいずれか１つの方法または使用法において、前記組成物は全身投与またはイオン注入による投与用に設計されているものである。
【請求項２３】
請求項１～２１のいずれか１つの方法または使用法において、前記組成物は球後投与または点眼用に設計されている。
【請求項２４】
請求項１～６のいずれか１つで定義される通り、疾患に関与するポリペプチドをコードした核酸分子を同定、入手する方法であって：
（ａ）ＣＮＳまたは眼性疾患に関連した病的状態の刺激につながるストレス条件下で、細胞、組織、または非ヒト動物を培養・育成する工程と；
（ｂ）前記細胞、組織、または動物のサンプルから核酸及び／若しくはタンパク質を単離する工程と；
（ｃ）少なくとも１つの上述の核酸および／またはタンパク質の発現または活性プロフィールを、対応する非投与細胞、組織、または動物のそれら、及び／若しくは異なるストレス条件で投与された細胞、組織、または動物のそれらと比較する工程と；
（ｄ）異なって発現された少なくとも１つの核酸および／またはタンパク質を決定する工程であって、それにより前記の少なくとも１つの核酸の発現または活性量の変化、または少なくとも１つの前記タンパク質の活性、または前記タンパク質の局在化変化がＣＮＳまたは眼の疾患に影響していることを示す、決定する工程と、
を有する。
【請求項２５】
請求項２４の方法において、前記ストレス条件は前記細胞、組織、または動物の培養条

件が異常に供給されることによって生じるものである。
【請求項２６】
請求項２４または２５の方法において、前記の異常な供給は前記眼の内節の異常な供給である。
【請求項２７】
請求項２４～２６のいずれか１つの方法において、前記方法は細胞培養を基本とした方法である。
【請求項２８】
請求項２７の方法において、前記細胞はＲＰＥ細胞である。
【請求項２９】
請求項２８の方法において、前記細胞は細胞株ＡＲＰＥ－１９などのＲＰＥ由来細胞株に由来するものである。
【請求項３０】
請求項２４～２６のいずれか１つの方法において、前記方法は非ヒト動物を用いて行われるものである。
【請求項３１】
請求項２４～３０のいずれか１つの方法において、前記ストレス条件は例えば酸化的ストレス、低酸素の培養条件、不十分な栄養および／または成長因子、ｐＨ値の変化および／または桿体外節（ＲＯＳ）および／またはＡ２－Ｅの病態生理学的濃度を供給する工程を有するものである。
【請求項３２】
請求項２４～３１のいずれか１つの方法において、核酸の発現を発現アレイおよび／またはリアルタイムＰＣＲにより分析するものである。
【請求項３３】
請求項２４～３２のいずれか１つの方法において、タンパク質発現をイムノブロットアッセイ若しくはＥＬＩＳＡアッセイ、または２Ｄゲル電気泳動若しくはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦで分析するものである。
【請求項３４】
請求項３３の方法において、血管新生および／または新血管新生に関与するタンパク質に特異的な抗体が利用されるものである。
【請求項３５】
請求項２４～３４のいずれか１つの方法であって、さらに、前記細胞、組織、または動物の表現型の反応変化を誘導できるかについて、前記細胞、組織、動物中の同定された核酸候補またはコードされたポリペプチドの発現を過剰発現または抑制する方法を有し、前記表現型はＣＮＳまたは眼の疾患に関連するものである。
【請求項３６】
請求項２４～３５のいずれか１つの方法であって、さらに、
（ｅ）ステップ（ａ）の細胞またはその分泌された因子、またはその細胞可溶化物を内皮細胞培養にさらす工程と、
（ｆ）細胞増殖、電気生理学的活性、ＤＮＡ合成、細胞成長、細胞遊走、ケモキネシス、走化性、血管の発達、マーカー遺伝子の発現または活性、アポトーシス、生存度のいずれかまたはすべてを分析する工程と、
を有するものである。
【請求項３７】
請求項２４～３６のいずれか１つの方法において、前記細胞のサンプルは、前記候補核酸またはコードされたポリペプチドに特異的なインヒビターで処理され；さらに、前記細胞、その分泌された因子、またはその細胞可溶化物が前記表現型の前記反応変化を誘導できなかったか否かを決定する工程を有するものである。
【請求項３８】
請求項３５～３７のいずれか１つの方法または使用法において、前記表現型は血管新生

および／または新血管新生、変性性網膜障害のすべてまたはいずれかに関連するものである。

【請求項３９】

請求項３８の方法において、前記インヒビターは請求項１０～１９のいずれか１つで定義されたインヒビターであるものである。

【請求項４０】

請求項２４～３９のいずれか１つの方法であって、さらに前記の少なくとも１つの核酸および／またはタンパク質の配列を同定し、任意に対応するコード遺伝子またはそのｃＤＮＡを同定する工程を有するものである。

【請求項４１】

請求項４０の方法であって、さらに前記遺伝子、ｃＤＮＡ、またはその断片をクローニングする工程を有するものである。

【請求項４２】

請求項２４～４１のいずれか１つの方法により得られる核酸分子。

【請求項４３】

血管新生および／または新血管新生、および／または網膜疾患に関与するポリペプチドをコードした、請求項４２の核酸分子。

【請求項４４】

請求項４２または４３の核酸分子に特異的にハイブリダイズする核酸分子であって、請求項３５～３８のいずれか１つで定義したとおり、表現型の反応変化を誘導することができなくなったタンパク質の変異体をコードする核酸分子。

【請求項４５】

請求項４２～４４のいずれか１つの核酸分子において、この核酸分子はＤＮＡである。

【請求項４６】

請求項４５の核酸分子において、この核酸分子はｃＤＮＡである。

【請求項４７】

請求項４２～６４のいずれか１つの核酸分子において、この核酸分子は哺乳類に由来するものである。

【請求項４８】

請求項４７の核酸分子において、前記哺乳類はマウスまたはヒトである。

【請求項４９】

請求項４２～４８のいずれか１つの核酸分子、またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズする、少なくとも１５ヌクレオチド長の核酸分子。

【請求項５０】

請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子を有するベクター。

【請求項５１】

請求項５０のベクターにおいて、前記核酸分子は原核生物または真核生物の宿主細胞の発現を可能にする制御要素と操作可能に結合するものである。

【請求項５２】

請求項５０または５１のベクターを有する宿主細胞。

【請求項５３】

請求項５２の宿主細胞は、細菌、真菌、植物、または動物細胞である。

【請求項５４】

請求項５３の宿主細胞は、哺乳類細胞である。

【請求項５５】

請求項５４の宿主細胞は、ＲＰＥ細胞または神経感覚網膜細胞である。

【請求項５６】

請求項３５～３８のいずれか１つで定義されるとおり、表現型の反応変化を誘導することができるポリペプチドを生産する方法であって、ポリペプチドの発現を可能にする条件下で請求項５２～５５のいずれか１つの宿主細胞を培養する工程と、前記培養で生産され

たポリペプチドを回収する工程と
を有するものである。
【請求項５７】
請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子でコードされているか、または請求項５６による方法で得られるポリペプチド。
【請求項５８】
請求項５７のポリペプチドを特異的に認識する抗体。
【請求項５９】
請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子、またはそのような核酸分子に相補的な核酸分子、請求項５０または５１のベクター、請求項５２～５５のいずれか１つの宿主細胞、請求項５７のポリペプチド、請求項５８の抗体のいずれかまたはすべてと、任意に医薬品として認められた担体を有する医薬品。
【請求項６０】
請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子、請求項５０または５１のベクター、請求項５２～５５のいずれか１つの宿主細胞、請求項５７のポリペプチドおよび／または請求項５８の抗体と、任意に適当な検出法とを有する診断構成。
【請求項６１】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を治療する方法において、有効量の請求項５９の医薬品を被験者に投与する方法を有するものである。
【請求項６２】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患に関与する遺伝子の発現を検出する方法であって、
（ａ）細胞からｍＲＮＡを採取する工程と；
（ｂ）ハイブリダイゼーションの条件下で請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子またはそのフラグメントを有するプローブを用い、そのように採取されたｍＲＮＡをインキュベートする工程と；
（ｃ）プローブにハイブリダイズさせたｍＲＮＡの有無を検出する工程と、
を有するものである。
【請求項６３】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患に関与する遺伝子の発現を検出する方法であって、
（ｄ）前記被験者から細胞サンプルを採取する工程と；
（ｅ）そのように採取された細胞サンプルを請求項５８の抗体と接触させる工程と；
（ｆ）前記遺伝子でコードされたタンパク質に結合した抗体の有無を検出する工程と、
を有するものである。
【請求項６４】
請求項４４の核酸分子によってコードされたタンパク質発現を検出するための、請求項６２～６３の方法。
【請求項６５】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患であるか、またはそのような疾患に罹患しやすい被験者を診断する方法であって：
（ａ）前記疾患に罹患した患者からＤＮＡを単離する工程と；
前記ステップ（ａ）で単離されたＤＮＡを少なくとも１つの制限酵素で消化する工程と；
（ｂ）サイジングゲル上で得られたＤＮＡフラグメントを電気泳動により分離する工程と；
（ｃ）検出可能なマーカーで標識した、請求項４２～４９の何れか１つの核酸分子またはそのフラグメントを有するプローブとともに、前記の得られたゲルをインキュベートする工程と；
（ｄ）前記疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンを作ると定義されているプローブとハイブリダイズしたゲル上で、標識バンドを検出する工程と；

（ｅ）ステップ（ａ）～（ｅ）により被験者のＤＮＡを調整し、ゲル上で検出可能な標識バンドを生成する、調整する工程と；
（ｆ）ステップ（ｅ）の疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンとステップ（ｆ）の被験者のＤＮＡを比較する工程であって、前記パターンが同一か、異なっているかを決定し、前記パターンが同一の場合は、それによって前記疾患または前記疾患への罹患しやすさを診断する、比較する工程と、
を有するものである。
【請求項６６】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患であるか、そのような疾患に罹患しやすいと、診断する方法であって：
（ａ）診断チップ、プライマー伸長法、一塩基多型、または配列決定の方法により、請求項４２～４９の核酸分子を有する被験者の核酸サンプルを分析する工程と、
（ｂ）前記結果を前記疾患に罹患した患者から得られたサンプルの結果と比較する工程とを有し、
前記発現プロフィールおよび／またはヌクレオチドの配列の同一性は、前記疾患を示すものである。
【請求項６７】
体細胞遺伝子治療により請求項１～６のいずれか１つで定義した被験者の疾患を治療、予防、および／または遅延させる組成物を調整するための、請求項４２～４９のいずれか１つの有効量の前記核酸分子、またはそのような核酸分子に相補的な核酸分子、または請求項５０または５１のベクターの利用法。
【請求項６８】
請求項１～６のいずれか１つで定義されるとおり、被験物質が疾患に関与する核酸分子またはポリペプチドに作用するか否かを決定する方法であって：
（ａ）請求項５７のポリペプチドを発現した細胞とスクリーニングする化合物とを接触させる工程と；
（ｂ）前記化合物が、前記ポリペプチドの発現または活性を調節するか否かを決定する工程と、
を有するものである。
【請求項６９】
請求項６８の方法において、前記ポリペプチドはＧＧＴＢプロモーターの制御下で発現されるものである。
【請求項７０】
請求項６８または６９の方法において、前記被験物質は化学療法剤である。
【請求項７１】
請求項６８～７０のいずれか１つの方法において、前記被験物質は化学療法剤の混合物である。
【請求項７２】
請求項６８～７１のいずれか１つの方法において、前記細胞は単細胞生物または多細胞生物に由来するものである。
【請求項７３】
請求項６８～７２のいずれか１つの方法において、前記細胞は請求項２８、２９、３５、または５２～５５のいずれか１つで定義された細胞である。
【請求項７４】
請求項６８～７３のいずれか１つの方法において、好ましくは第１のスクリーニングで前記被験物質が被験物質の集合を構成し、被験物質の集合となるものである。
【請求項７５】
請求項７４の方法において、前記被験物質の集合は約10^3～約10^5の多様性を持つものである。
【請求項７６】

請求項７４または７５の方法において、前記被験物質の集合の多様性は連続的に減少するものである。

【請求項７７】

請求項６８～７６のいずれか１つの方法において、前記方法は組織または非ヒト動物を構成するものである。

【請求項７８】

請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を治療する薬物またはプロドラッグを生産する方法であって：

（ａ）被験化合物または被験化合物の集合を合成する工程と；

（ｂ）前記被験化合物または被験化合物の集合に対して、請求項６８～７７のいずれか１つの方法を実施する工程と；

（ｃ）ステップ（ｂ）の修飾因子またはその誘導体として同定された化合物を生産する工程と、

を有するものである。

【請求項７９】

請求項６８～７８のいずれか１つの方法によって同定、単離、生産された被験物質であって、前記被験物質が、これまで請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患の治療薬として知られていないもののものである。

【請求項８０】

請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を治療する組成物を調整するため、請求項６８～７８のいずれか１つの方法によって同定、単離、生産された化合物の使用法。

【請求項８１】

請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を治療する方法であって、前記疾患に罹患した被験者に、請求項８０の使用法または請求項７８の方法に沿って調整した組成物を投与する方法を有するものである。

【請求項８２】

固体支持体を有し、そこに請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子を１つ以上結合させたチップ。

【請求項８３】

請求項２４～４１または６２～７８のいずれか１つの方法で使用するキットであって、請求項８２のチップ、または請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子、または請求項５８のポリペプチドの発現および／または活性を検出する他の方法を有するものである。

【請求項８４】

請求項６８～７８の方法で同定、単離、生産された化合物を、新薬発見及び薬物またはプロドラッグの調整のリード化合物として使用する方法。

【請求項８５】

請求項１～６のいずれか１つで定義した疾患を治療するため、または請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子またはそのコードされた遺伝子産物を有する遺伝子の調節に反応する、下流遺伝子を同定及び単離するため、被験物質、リード化合物、薬物及びプロドラッグの妥当性を確認するために、請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子または請求項５７のポリペプチドを使用する方法。

【請求項８６】

請求項５７のポリペプチドの異常な発現または活性を示す遺伝子組換え非ヒト動物。

【請求項８７】

請求項８６の非ヒト動物において、前記動物は請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を再現するものである。

【請求項８８】

請求項８６または８７の動物において、哺乳類である。

【請求項８９】

請求項８６～８８のいずれか１つの遺伝子組換え非ヒト動物を、請求項１～６のいずれ

か１つで定義された疾患を治療するため、新薬発見のプロセスに利用する方法。
【請求項９０】
請求項１～６のいずれか１つで定義された疾患を治療するために用いる医薬品であって、１つ以上の二本鎖オリゴヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）を有し、請求項４２～４９のいずれか１つの核酸分子１つ以上の対応するｍＲＮＡのＲＮＡ干渉と、任意に医薬品として認められた担体を介するものである。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、中枢神経系（ＣＮＳ）と眼の疾患を治療する方法に関するものである。特に、本発明はＣＮＳと眼の疾患を治療する医薬品を調整するため、標的の遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物を有する組成物を使用することに関するものであり、前記組成物は血液ＣＮＳ関門と血液網膜関門の外に投与するように設計する。本発明は、さらに、ＣＮＳ疾患または眼に関与するポリペプチドをコードする核酸分子を同定、単離する方法、前記疾患を診断する方法、及び遺伝子組換え動物に関するものであり、本発明の方法に沿って同定された標的遺伝子の発現を調節する。さらに、本発明は、ＣＮＳおよび／または眼に関連した疾患の治療に特に有用な薬物を同定し、単離する方法に関するものである。
【０００２】
いくつかの特許文献はこの明細書の本文を通じて引用される。ここに引例された各特許文献（あらゆる製造者の仕様書、取り扱い説明書等を含む）は本明細書でこの参照によりここに組み込まれるが、引例されたすべての特許文献が実際に本発明の先行技術であるという承認ではない。
【背景技術】
【０００３】
現在、ＣＮＳおよび／または眼に対して生物学的に活性な薬物を送達するための、様々なアプローチが存在する。これには、他の考えられる方法のうち、経口投与、静脈内、筋肉内、経皮投与、また球眼内注入や点眼薬のような応用も含まれる。前記薬物が全身の血液循環に送達されると、すべての内臓と組織に運ばれ、（ＣＮＳおよび／または眼の内部に作用させるためには）血液脳関門や血液網膜関門を通過しなければならない。明らかに、他のすべての臓器に薬物が作用するため、特に、治療する疾患や標的となる細胞または組織に特異的ではない標的遺伝子または遺伝子産物に、前記薬物が作用する場合には、副作用の発生率が高くなる可能性がある。脳への送達で利用されることが多い別の戦略は、脳室内注射系、脳内（重合体）移植、遺伝子組み換えしたタンパク質分泌細胞の移植、細胞移植などの侵襲的方法を利用するものである。残念ながらこれらの方法は、デポー部位または注射部位に近接した脳または細胞の表面に薬物を送達させる場合にのみ効果的であり、例えば髄膜の癌浸潤の治療などに利用することができる。しかし、脳の実質で有効な薬物濃度を達成できないため、これらの方法には多数の制限がある。
【０００４】
ヒト中枢神経系のように、ヒトの眼は、高度に複雑で組織的な機能を持った、多数の特異的な構造及び組織で特徴付けられる器官である。両者は、有害な環境の影響に対して関門（涙の分泌、酵素、輸送メカニズム、血液網膜関門及び血液ＣＮＳ関門）によって保護される。血液脳関門のように、前記血液網膜関門も眼の内部が薬物を取り込むための生理的な関門であり、現在の技術では、仮に可能であっても眼性疾患の薬理療法は非常に困難である。
【０００５】
眼科疾患を含む、前記ＣＮＳ障害の治療用として市場で現在利用できる薬物は、高用量を投与することが必要であるため、副作用を伴うことが多い臨床症状の治療においてのみに利用可能である。前記ＣＮＳ、特に眼底部の原因療法は、注入の他には不可能である。さらに、現状では、複数要因に由来する網膜疾患の病因の根底にある、複雑な分子代謝相

互関係の情報は限られている。その結果、市場で利用できる薬物は、そのような疾患の症状の治療のみに適している。

【０００６】

ＣＮＳおよび／または眼に関連する疾患を治療するための治療手段の必要性を考慮すると、本発明の技術的な課題は、前記ＣＮＳおよび／または眼の障害に関する遺伝子を同定し、調節する手段と方法を提供することである。より具体的には、本発明の技術課題は、血液脳関門や血液網膜関門を傷つけずに通過させながら、哺乳類のＣＮＳおよび／または眼にある標的遺伝子と遺伝子産物を調節制御するための非侵襲的方法を提供することである。

【０００７】

前記技術課題に対する解決は、請求項で特徴付けられ、以下にさらに記載されている実施例を示すことによって達成される。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は、治療有効量で標的遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物を有する組成物を被験者に投与する方法を有する、中枢神経系（ＣＮＳ）と眼の疾患を治療する方法を対象にしており、前記組成物は血液脳関門や血液網膜関門の外に投与される。特に、前記組成物は１つ以上の二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）を有することができ、１つ以上の標的遺伝子に対応するｍＲＮＡのＲＮＡ干渉を介する。

【０００９】

別の態様では、本発明がＣＮＳおよび／または眼の疾患に関係するポリペプチドをコードした核酸分子を同定、単離する方法を対象とし、

（ａ）ＣＮＳまたは眼性疾患に関連した病的状態を刺激するストレス条件下、細胞、組織、または非ヒト動物を培養・育成する工程と；

（ｂ）前記細胞、組織、または動物から核酸および／またはタンパク質を単離する工程と；

（ｃ）少なくとも１つの前記核酸および／またはタンパク質の発現または活性プロフィールを、対応する非処理細胞、組織、または動物および、異なるストレス条件下で処理された細胞、組織、または動物と比較する工程と；

（ｄ）異なって発現された少なくとも１つの核酸および／またはタンパク質を決定することで、前記の少なくとも１つの核酸の発現または活性量の変化、または少なくとも１つの前記タンパク質の活性、または前記タンパク質の局在化変化がＣＮＳまたは眼の疾患に影響していることを示す、決定する工程とを有する。

【００１０】

また本発明は、特に前記のコードされたポリペプチドが血管新生（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ）および／または新血管新生（ｎｅｏｖａｓｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ）、および／または網膜疾患に関係する場合に、前記方法によって得られる核酸分子に関するものであり、そのような核酸分子を有するベクターと前記ベクターを有する宿主細胞に関するものでもある。

【００１１】

また、本発明は、ポリペプチドの発現が可能な条件下で前記宿主細胞を培養し、培養から生産されたポリペプチドを回収する工程と、および前記培養からのポリペプチドと前記方法によって得られるか前記核酸分子によってコードされたポリペプチドを回収する工程とを有する、表現型の反応変化を誘導することができるポリペプチドを生産する方法を対象としている。

【００１２】

さらに、本発明は、そのようなポリペプチドを特異的に認識する抗体と、そのような抗体または前述した核酸分子、そのような核酸分子に相補的な核酸分子、ベクター、宿主細胞、ポリペプチドのいずれか１つを有する、医薬品や診断用の組成物に関するものであり

、それぞれ任意に医薬品として認められた担体と適切な検出手段に関するものでもある。
【００１３】
さらに、本発明は、効果的な用量で被験者に前記医薬品を投与する方法を有する、ＣＮＳおよび／または眼の疾患を治療する方法を対象とする。
【００１４】
さらに、本発明はＣＮＳおよび／または眼の疾患に関係する遺伝子の発現を検出する方法に関するものであり：
（ａ）細胞からｍＲＮＡを採取する工程と；
（ｂ）ハイブリダイゼーションの条件下で前記の核酸分子またはそのフラグメントを有するプローブを用い、そのように採取されたｍＲＮＡをインキュベートする工程と；
（ｃ）プローブにハイブリダイズさせたｍＲＮＡの有無を検出する工程とを有する、
または
（ａ）前記被験者から細胞サンプルを採取する工程と；
（ｂ）そのように採取された細胞サンプルを前記抗体と接触させる工程と；
（ｃ）前記遺伝子でコードされたタンパク質に結合した抗体の有無を検出する工程とを有する。
【００１５】
本発明はさらに、被験者の前記疾患またはそのような疾患への罹患しやすさを診断する方法を対象とし：
（ａ）前記疾患に罹患した患者からＤＮＡを単離する工程と；
（ｂ）前記ステップ（ａ）で単離されたＤＮＡを少なくとも１つの制限酵素で消化する工程と；
（ｃ）サイジングゲル（ｓｉｚｉｎｇ　ｇｅｌ）上で得られたＤＮＡフラグメントを電気泳動により分離する工程と；
（ｄ）検出可能なマーカーで標識した、本発明の核酸分子またはそのフラグメントを有するプローブとともに、前記で得られたゲルをインキュベートする工程と；
（ｅ）前記疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンを作ると定義されているプローブにハイブリダイズしたゲル上で、標識バンドを検出する工程と；
（ｆ）ステップ（ａ）～（ｅ）により被験者のＤＮＡを調整し、ゲル上で検出可能な標識バンドを生成する工程と；
（ｇ）ステップ（ｅ）の疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンとステップ（ｆ）の被験者のＤＮＡを比較し、前記パターンが同一か、異なっているかを決定し、前記パターンが同一の場合は、それによって前記疾患と前記疾患への罹患しやすさを診断する工程とを有する、
または
（ａ）診断チップ、プライマー伸長法、一塩基多型、または配列決定の方法により、前記の核酸分子を有する被験者の核酸サンプルを分析する工程と；
（ｂ）前記の結果を前記疾患に罹患した患者から得られたサンプルの結果と比較する工程とを有し、
前記発現プロフィールの同一性および／またはヌクレオチドの配列は、前記疾患を示す。
【００１６】
さらなる実施例では、本発明が、被験物質にＣＮＳまたは眼性疾患に関与する核酸分子またはポリペプチドに対する作用があるか否かを決定する方法に関し：
（ａ）前記の方法に沿って同定、単離された標的遺伝子または遺伝子産物を発現した細胞と、スクリーニングする化合物を接触させる工程と；
（ｂ）前記化合物が、前記標的遺伝子または遺伝子産物の発現または活性を調節するか否かを決定する工程とを有する。
【００１７】
さらなる態様では、本発明が上記に定義した疾患の治療に用いられる薬物またはプロドラッグに関するもので：

（ａ）被験化合物または被験化合物の集合を合成する工程と；
（ｂ）前記被験化合物または被験化合物の集合に対して、本発明のスクリーニング法を実施する工程と；
（ｃ）標的遺伝子または遺伝子産物の修飾因子またはその誘導体として同定された化合物を生産する工程とを有する。

【００１８】

さらに、本発明は、前記に定義した標的遺伝子または遺伝子産物の異常発現または活性を示す、遺伝子組換え非ヒト動物と、前記疾患を治療するための薬物発見プロセスにこれを利用することを対象とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１９】

本発明は、中枢神経系（ＣＮＳ）と眼の疾患を治療する医薬品を調合するため、標的遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物を使用することに関するものであり、前記組成物は血液ＣＮＳ関門および／または血液網膜関門の外に投与するように設計する。

【００２０】

１つの態様では、本発明は、眼の組織におけるタンパク質機能の特異的な調節により、眼性疾患の治療で血液網膜関門を通過できるとは考えられない化合物を投与することで、血液網膜関門を通過させることができるという、驚くべき所見を基にしている。血液網膜関門は血液脳関門と機能的に類似しているため、所定の眼性疾患の治療を目的とした、血液網膜関門を通過させる改良法を提供することは、ＣＮＳ疾患の治療にも適していることが予想される。

【００２１】

故に本発明に従うと、前記ＣＮＳまたは眼の中の標的遺伝子または遺伝子産物の調節ができる化合物を有する前記組成物は、好ましくは大量の、すなわち化合物の血液脳関門の通過を促進する送達促進因子の実質的な効果のある量なしで、また侵襲的方法及び装置の適用を必要とせずに、投与されるように設計されている；例えばこれら化合物、方法、及び装置は米国特許出願第ＵＳ２００２１８３６８３号、及び国際公開番号第ＷＯ０３／０００１８号を参照のこと。しかし、本発明の独立した態様である一部の実施例では、例えばＲＮＡ干渉を介する化合物の利用、そのような方法と化合物の利用は、血液脳関門と血液網膜関門を迂回しながら、哺乳類のＣＮＳおよび／または眼に標的遺伝子または遺伝子産物を調節することができる化合物の送達を向上及び管理することに含まれるかもしれない。

【００２２】

これらの後者の実施例は、とりわけ新規の方法を提供し、ＣＮＳ疾患や眼性疾患を引き起こす遺伝子を同定する、従来の実験戦略を応用する際の難しさを克服することと、診断及び医薬品を用いた介入戦略の標的としての妥当性を確認することを基にしている。これは、この疾患の症状が後年、一般には６０歳代に見られるため、特にＡＭＤに当てはまる。現状での病理学的な代謝相互関係についての知識は、ほとんどのＣＮＳ及び眼性疾患の医学的治療に対して十分ではない。前記疾患が複雑であり、ＣＮＳおよび眼の簡単な介入及び処置を行うための適当な戦略がないため、そのような疾患に適切な動物または細胞培養モデルは利用できない。

【００２３】

従って、１つの重要な様態は、本発明がＣＮＳおよび／または眼の疾患に関与する標的遺伝子及び遺伝子産物を同定、単離するための、細胞、組織、動物モデルを基本としたアッセイと、これらをそのような疾患の治療的介入と診断の標的として利用する方法に関する。

【００２４】

ＣＮＳ障害の例は、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、うつ病、双極性障害、統合失語症、健忘症、偏頭痛、脳卒中、不眠症、アルコール依存症、不安症、強迫性障害

、大脳後天性ヒト免疫不全症候群、慢性痛など多数の疾患である。

【００２５】

本発明の組成物は局所的または全身的に、例えば静脈内などに投与してもよい。非経口投与に対する製剤は、無菌水溶液または非水溶液、懸濁液、及び乳濁液を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコールと、ポリエチレングリコールと、例えばオリーブ油などの植物油と、例えばエチルオレイン酸などの注入可能な有機エステルである。水性担体は、生理食塩水、緩衝液などの水、アルコール性溶液／水溶液、乳濁液、または懸濁液を含む。非経口媒体は、塩化ナトリウム水溶液、ブドウ糖リンゲル液、ブドウ糖及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または固定油を含む。静脈内媒体は、液体及び栄養補充液、電解質補充液（例えばブドウ糖リンゲル液に基づく補充液）などを含む。防腐剤など添加物は、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなどであってもよい。さらに、本発明の前記医薬品は、インターロイキンやインターフェロンなど、前記医薬品を意図した使用によって、さらなる因子を有してもよい。

【００２６】

本発明に沿って、前記医薬品は約０．１μｇ～約１０ｍｇ単位／日および／または単位／ｋｇ体重の有効量で、被験者に投与されるが、下記も参照のこと。さらに、適切な投与法は例２１によって決定することができる。

【００２７】

好適な実施例では、治療される前記障害は眼に関連している。そのような疾患には脈絡網膜炎及びヘルペス網膜炎を含み、これは後天性の網膜疾患と考えられ、網膜障害疾患の大部分は遺伝的素因に例えられる。これらは例えば初期網膜剥離（ａｂｌａｔｉｏ ｒｅｔｉｎａｅ）、網膜芽細胞腫、網膜星細胞腫（Ｂｏｕｒｎｅｖｉｌｌｅ‐Ｐｒｉｎｇｌｅ）、網膜血管腫症（Ｈｉｐｐｅｌ‐Ｌｉｎｄａｕ）、コート病（滲出性網膜炎）、イールズ病、中心性漿液性網膜症、眼白子症、網膜色素変性症、白点状網膜炎、アッシャー症候群、レーバー先天性黒内障、錐体ジストロフィー、卵黄様黄斑変性症（ベスト病）、若年性網膜分離症、ノースカロライナ黄斑変性症、ソルスビー（Ｓｏｒｓｂｙ）基底ジストロフィー、ドイン（Ｄｏｙｎｅ’ｓ）ハニカム網膜ジストロフィー（Ｍａｌａｔｔｉａ Ｌｅｖｅｎｔｉｎｅｓｅ）、スタルガルト病、ワーグナー硝子体網膜変性症、または加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）、同様にベスト梅毒またはスタルガルト梅毒のような単一遺伝子網膜症などを含む。さまざまな遺伝的欠陥が、この広範囲の眼性疾患の表現型を導くか、生じやすくすることが知られている。

【００２８】

これらの臨床的な表現型の一部は、血管が病理学的に新規形成されることで特徴付けられ、血管新生（ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ）または新血管新生（ｎｅｏｖａｓｃｕｌａｒｉｚａｔｉｏｎ）と呼ばれる。脈絡毛細管炎（ｃｈｏｒｉｏｋａｐｉｌｌａｒｉｓ）から始まり、眼の内部に新しい血管が成長することで、ヒト網膜の患部で光受容体細胞の退化が促進される。眼科の分野では、血管新生を網膜下（脈絡膜＝ＣＮＶ）血管新生と網膜血管新生の２つに区別することができる。中心窩下血管新生とも呼ばれる網膜下血管新生は、Ｍａｋｕｌａｒ変性などの変性疾患と関連しており、視力喪失と変形視症で特徴付けられる。一方、網膜血管新生、つまり硝子体または虹彩の血管新生は、虚血性プロセス（例えば網膜血管炎や糖尿病性網膜症）と関連している。さらに、血管新生は、腫瘍成長、関節炎、糖尿病性腎症など、異なる眼科以外の疾患パターンでも重要な病理学的機序である。従って、本発明の方法と使用に関する好適な実施例では、治療される前記疾患が血管形成や血管新生と関連し、特に、網膜色素上皮（ＲＰＥ）、神経感覚網膜、脈絡（ｃｈｏｒｉｏｄｅａ）に好ましい。最も好ましいのは、前記疾患が湿性加齢性黄斑変性症（ＡＭＤ）または糖尿病性網膜症の場合である。

【００２９】

以下に続く説明では、遺伝的構成要素を有する複雑な眼科疾患の例としてＡＭＤを扱う。湿性ＡＭＤを考慮すると、疾患パターンの例とすることもでき、明らかに異なる血管新生で特徴付けられる。この例は分子的原因の研究、及び診断と薬物介入戦略の開発に関す

る前記関連技術課題を説明する。

【００３０】

網膜変性のサブタイプとして考えられるＡＭＤは、先進国で視覚疾病の最も一般的な原因であり、有病率は５２歳以上の人で９％、７５歳以上の人では２５％以上に上昇する（Ｐａｅｔｋａｕ ｅｔ ａｌ．１９７８，Ｌｅｉｂｏｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．１９８０，Ｂａｎｋｓ ａｎｄ Ｈｕｔｔｏｎ １９８１，Ｇｈａｆｏｕｒ ｅｔ ａｌ．１９８３，Ｈｙｍａｎ １９８７，Ｈｙｍａｎ ｅｔ ａｌ．１９８３，Ｇｒｅｙ ｅｔ ａｌ．１９８９，Ｙａｐ ａｎｄ Ｗｅａｔｈｅｒｉｌｌ １９８９，Ｈｅｉｂａ ｅｔ ａｌ．１９９４）。

【００３１】

ＡＭＤの病状進展の初期段階では、網膜色素上皮で黄色みがかったリポフスチン様の粒子の蓄積量が増加する（ＲＰＥ；Ｆｅｅｎｅｙ １９７８）。これらの粒子は、未消化の食菌された光受容体の外節膜の残遺物であると考えられ、正常のプロセスでは、基本的にブルッフ膜（Ｂｒｕｎｃｈ'ｓ ｍｅｍｂｒａｎｅ）から脈絡毛細管に排出される。経時的には、リポフスチン様粒子の蓄積がブルッフ膜に影響し、これが進行的に破壊される（Ｈｏｇａｎ ａｎｄ Ａｌｖａｒａｄｏ １９６７，Ｓａｒｋｓ １９７６，Ｆｅｅｎｅｙ－Ｂｕｒｎｓ ａｎｄ Ｅｌｌｅｒｓｉｅｃｋ １９８５，Ｐａｕｌｅｉｋｈｏｆｆ ｅｔ ａｌ．１９９０）。ＲＰＥとブルッフ膜の沈着物は主に脂質で構成されるが、その正確な組成物は、一部の沈着物が極性の高いリン脂質であることが明らかとなった患者では異なり、主に無極性の中性脂質を含むこともある。

【００３２】

このような個々のドルーゼ組成物の違いは、ＡＭＤが臨床的に不均一であることの根拠であると考えられる（Ｇｒｅｅｎら、１９８５）。患者によっては脈絡毛細管炎からブルッフ膜に血管が内側に伸びることもあれば（新血管新生）（Ｂｒｅｓｓｌｅｒら、１９８２）、ＲＰＥ下の滲出により網膜色素上皮の剥離を示すこともあり（Ｇａｓｓ １９６７、Ｇｒｅｅｎら １９８５）、第３群の患者群では、ＲＰＥと上にかかる感覚神経網膜（ｓｅｎｓｏｒｙ ｎｅｕｒｏｒｅｔｉｎａ）の萎縮変化により視力の喪失がゆっくりと低下する（Ｍａｇｕｉｒｅ及びＶｉｎｅ １９８６）。

【００３３】

はるかに一般的ではないが、滲出性／新生血管性のＡＭＤは、視力≦２０／２００の失明の８０％以上を占めている（Ｂｒｅｓｓｌｅｒら ２００２）。前述の「乾性」ＡＭＤとは対照的に、滲出性の「湿性」ＡＭＤは脈絡膜血管新生（ＣＮＶ）と関連し、失明、そのため（精神的疾患、損傷のリスク上昇などが続き）生活の質の喪失に至る（Ｂｒｅｓｓｌｅｒら ２００２）。片方の眼にＣＮＶ－ＡＭＤが発症してから５年以内にもう片方の眼でＣＮＶが生じるリスクは高い（>４０％）（Ｂｒｅｓｓｌｅｒら ２００２）。新生血管ＡＭＤは脈絡膜新生血管の病変で特徴付けられる。これらの病巣は、脈絡膜の異常血管がブルッフ膜の切れ目から網膜色素上皮の下に成長増殖した場合に生じる（Ｂｒｅｓｓｌｅｒら．２００２、Ｃａｍｐｏｃｈｉａｒｏら １９９９）。これらの血管から異常な漏出があると、網膜色素上皮または（網膜色素上皮の上にある）神経感覚網膜の出血や剥離に至る可能性がある。瘢痕が形成することに伴い、網膜組織が置換され、永久的な視力喪失に至る可能性がある。

【００３４】

ＡＭＤは内因性因子と同様、外因性因子によって引き起こされる複雑な病気である（ＭｅｙｅｒｓおよびＺａｃｈａｒｙ １９８８，Ｓｅｄｄｏｎら）。環境要因に加え、例えば遠視、明色皮膚及び虹彩色、血清コレステロールレベルの上昇、高血圧、または喫煙など、いくつかの個人的危険要因が提言されている（Ｈｙｍａｎ ｅｔ ａｌ．１９８３，Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．１９９３，Ｓｐｅｒｄｕｔｏ ａｎｄ Ｈｉｌｌｅｒ １９８６，Ｔｈｅ Ｅｙｅ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃａｓｅ－Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｓｔｕｄｙ Ｇｒｏｕｐ １９９２，Ｂｒｅｓｓｌｅｒ ａｎｄ Ｂｒｅｓｓｌｅｒ １９９５）。ＡＭＤに対する遺伝的構成要素はいくつかの研究グループによって実証されており（Ｇａｓｓ １

９７３，Ｐｉｇｕｅｔ ｅｔ ａｌ．１９９３，Ｓｉｌｖｅｓｔｒｉ ｅｔ ａｌ．１９９４）、前記疾患は遺伝的な素因がある患者において、環境／個人的要因によって誘発されるという仮説が導かれた。変異した場合に、ＡＭＤに対する感受性を与えることができる遺伝子の数は知られていないが、数多くあると考えられる。

【００３５】

症状の発症が遅く、通常は６０歳代であることと、臨床的、また可能性としては遺伝的に不均一であるため、ＡＭＤに罹患しやすくする遺伝子を同定する、従来のアプローチを適用することが困難になっている。臨床的表現型が複雑であるため、変異した場合にＡＭＤ感受性に寄与する遺伝子数は多くなることが推測される。

【００３６】

例えばレーザー光凝固術、光線力学的療法（ｖｅｒｔｅｐｒｏｆｉｎ、商標名Ｖｉｓｕｄｙｎｅ（商標登録）（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）を用いた）、放射線または外科療法など、ＡＭＤの治療のための最近の物理的アプローチを使用しての成功は、中規模の割合の患者でのみ達成された（Ｂｒｅｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．２００２，Ｙｕｚａｗａ ｅｔ ａｌ．２００１）。

【００３７】

そのため、ここに記載された本発明の方法、使用、及び組成物は、他の疾患と同様にこの特定疾患の治療に対する重要な改良、及び代替治療介入を示している。これらの実施例に対して、前記医薬品は好ましくは、前記眼の後部に効果的である（もしくは適用される）ように設計され、好ましくは血液網膜関門の網膜領域の外側に適用されるように設計された形態である。

【００３８】

本発明の１つの実施例では、前記化合物が前記標的遺伝子または遺伝子産物のインヒビター／アンタゴニストであり、好ましくは血管新生や新血管新生に関与する遺伝子の発現または遺伝子産物の活性を抑制する；上記を参照のこと。

【００３９】

本発明に沿った「アンタゴニスト／インヒビター」という用語には、例えば転写または翻訳に影響するなどにより、酵素活性を変化させるか、発現を調節することで、遺伝子の作用または遺伝子産物の活性を調節する化学物質が含まれる。一部の場合、アンタゴニスト／インヒビターが、疾患に関与する遺伝子産物またはリガンド結合分子の基質となることもある。

【００４０】

「インヒビター」という用語には、ポリペプチドの活性を低下させる基質と、それを完全に無効にする基質の両方が含まれる。

【００４１】

遺伝子産物の活性を調節し、例えば以下に説明する細胞アッセイで反応を引き起こす「アンタゴニスト」は、遺伝子産物の活性または活性産物の量を直接または間接的に変化させる化合物を指す。アンタゴニストの効果は、標的遺伝子のアンタゴニストで誘導される活性を遮断するものと見ることができる。アンタゴニストには、競合的アンタゴニストと非競合的アンタゴニストが含まれる。競合的アンタゴニスト（または競合的遮断物質）は、作用物質の結合に特異的な部位と相互作用するか、その近くで相互作用する。非競合的アンタゴニストまたは遮断物質は、作用物質の相互作用部位以外の部位と相互作用することで、前記遺伝子産物の機能を不活化する。好ましくは、アンタゴニスト／インヒビターは小化学分子であり、疾患に関係する標的遺伝子産物、好ましくは血管形成や血管新生に関与する遺伝子産物と直接相互作用する。従って、好ましくは、標的遺伝子の活性を抑制または刺激するために必要な化合物の分子量と、細胞に存在するか存在しない遺伝子産物の分子量との間に直接的な関係がある。前記化合物は、ポリペプチド、抗ポリペプチド抗体、ＲＮＡ分子をコードしたポリペプチド（の一部）、またはそのアンチセンス配列、転写制御因子、リガンド結合分子、ポリペプチド基質、または既知のアゴニスト（作用因子）／アクチベーター（活性化因子）またはアンタゴニスト／インヒビターに由来する可能

性がある。

【００４２】

本発明の好適な実施例では、前記アンタゴニストが、例えばリボソーム、前記遺伝子のアンチセンスまたはセンス核酸分子、またはＲＮＡ干渉を介することができる遺伝子またはｄｓＲＮＡ分子などの核酸を基にしている。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の調整、合理的な選択を行うための方法とコンピュータープログラムは、先行技術で報告されている；例えば、Ｓｍｉｔｈ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．１１（２０００），１９１～１９８；Ｔｏｓｃｈｉ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　２２（２０００），２６１～２６９；Ｓｏｈａｉｌ，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．４４（２０００），２３～３４；Ｍｏｕｌｔｏｎ，Ｊ．Ｃｏｍｐｕｔ．Ｂｉｏｌ．７（２０００），２７７～２９２を参照。これらの処置は、最適なハイブリダイゼーション部位を見つける方法、第２に、例えばＣＮＳおよび／または眼性疾患で過剰発現されたｍＲＮＡに結合する配列を選択する方法を有する。これらの方法には、より系統的な技術に対して、多数のｍＲＮＡに相補的な配列をより経験的に検討することが含まれ、即ちＲＮアーゼＨマッピング、組み合わせ配列の利用、コンピューターを用いた方法でｍＲＮＡの二次構造を予測する方法などがある。構造的ＲＮＡに結合する構造、つまりａｐｔａｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ及び鎖でつながれているオリゴヌクレオチドプローブ、折り畳み三重らせん形成オリゴヌクレオチドも、本発明の目的で利用することができる。コンピューターを用いた分析により補助したアンチセンス配列の選択と関連し、有益なｗｗｗアドレスを以下に示す。

【００４３】

本発明の特に好適な実施例では、前記アンタゴニスト／インヒビターは、実質的に、好ましくは二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）の一部を含むリボヌクレオチドで構成される。標的部位の選択における手段としての二次構造予測及びｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ到達性は、例えばＡｍａｒｚｇｕｉｏｕｉ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８（２０００），４１１３～４１２４に記載されている。修飾デオキシヌクレオシドの取り込みによるＤＮＡ標的の二次構造の最小化：ハイブリダイゼーションによる核酸分析の意義については、Ｎｇｕｙｅｎ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８（２０００），３９０４～３９０９に記載されている。

【００４４】

２１～２３ヌクレオチド長のｄｓＲＮＡが好ましい。前記ｄｓＲＮＡ分子は末端３’ヒドロキシル基も含むことができ、１つ以上のヌクレオチドの付加、欠損、置換、または修飾によって前記遺伝子または遺伝子産物のヌクレオチド配列とは異なる、天然由来ＲＮＡの類似体でもよい。二本鎖構造のＲＮＡ、すなわちｄｓＲＮＡまたはＲＮＡｉを有する細胞の標的遺伝子の遺伝子発現を阻害するため、ＲＮＡを生細胞へ導入する一般的工程は当業者に知られており、国際公開番号第ＷＯ９９／３２６１８号、第ＷＯ０１／６８８３６号、第ＷＯ０１／７７３５０号、第ＷＯ００／４４８９５号、第ＷＯ０２／０５５６９２号、及び第ＷＯ０２／０５５６９３号に記載され、この内容の開示はここで参照により取り込まれる。

【００４５】

前記ｄｓＲＮＡの標的ｍＲＮＡは、好ましくは、以下に説明する本発明の方法に沿って得られた遺伝子またはｃＤＮＡによってコードされる。１つの実施例では、標的ヌクレオチド配列がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２または４のアミノ酸配列をコードするか、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１または３のヌクレオチド配列を有する。

【００４６】

本発明の１つの実施例では、前記組成物に利用される前記化合物が核酸分子であるか、核酸分子によってコードされ、ＣＮＳまたは眼の細胞に発現されるように設計されている。これらの実施例では、遺伝子治療介入が想定されている；下記も参照。

【００４７】

本発明の方法及び使用の好適な実施例において、前記組成物は、ＣＮＳまたは眼の前記細胞または組織に適切な担体によって導入されるように設計され、血液ＣＮＳ関門および

／または血液網膜関門の外側で適用される、例えば点眼薬などで特徴付けられた形態である。これは全身的に、イオン注入的に、または球後注入によって投与され得る。

【００４８】

イオン注入は、電流を用いて組織内にイオン化分子を能動的に導入することと定義されてきた。この技術は、ドナー電極（例えば皮膚など）の下にある組織、また全身の血液循環へのドラッグデリバリーを補強することで、全身に薬物を送達するために用いられてきた。イオン注入装置は少なくとも２つの電極を必要とし、その両方が体の生体膜表面のある部分と電気的に接触している。「供与」または「活性」電極として一般的に言及される１つの電極は、例えば薬物やプロドラッグなどの生理活性物質が体に運搬されるための電極である。反対の極性を有するもう１つの電極は、体と電源の間の電気回路を貫通させるために機能する。この電極は「受容」または「不活性」電極として一般的に言及される。イオン泳動中、薬物溶液及び隣接する組織を通過する電流を形成するため、電極全体に電位が加えられる。イオン泳動は、血液血管関連障害（例えば再狭窄など）、膀胱、子宮、尿道及び前立腺疾患の治療で報告されていた。米国特許番号第６，２１９，５５７号；第５，５８８，９６１号；第５，８４３０１６号；第５，４８６，１６０号；第５，２２２，９３６号；第５，２３２，４４１号；第５，４０１，２３９号、及び第５，７２８，０６８号は、中空、管状器官（膀胱、尿道及び前立腺）、または血管に挿入するイオン注入カテーテルの様々なタイプについて開示している。米国特許出願第ＵＳ２００２１８３６８３号はＣＮＳへの活性物質の運搬法を示している。

【００４９】

多数の活性で、特異的に発現することが多い遺伝子は、前記ＣＮＳと前記網膜の細胞でのプロセス、及び血液ＣＮＳ関門と血液網膜関門の代謝交換を実行し、制御するために必要である。これらの複雑な組織にある多数の成分の構造と機能的統合性を維持するため、特異的な遺伝子活性も必要である。結果として、この独特な高度に進化した系は、特に様々な遺伝的欠陥を受けやすく、そのため広範な疾患の遺伝子型が生じる。前記患者が位置クローニングを実行できるだけ十分に人数が多い家族の一員であれば、単一遺伝子病の研究は比較的容易であるが、多重遺伝子の疾患に寄与しているか、関係している遺伝子、または疾患への罹患しやすさを同定することは、はるかに困難である。

【００５０】

従って、別の態様では、本発明がＣＮＳおよび／または眼の疾患に関係するポリペプチドをコードした核酸分子を同定、単離する方法に関連し：

（ａ）ＣＮＳまたは眼性疾患に関連した病的状態の刺激につながるストレス条件下で、細胞、組織、または非ヒト動物を培養・育成する工程と；

（ｂ）前記細胞、組織、または動物から核酸および／またはタンパク質を単離する工程と；

（ｃ）少なくとも１つの上述の核酸および／またはタンパク質の発現または活性プロフィールを、対応する非投与細胞、組織、動物、および／または異なるストレス条件で投与された細胞、組織、動物と比較する工程と；

（ｄ）異なって発現された少なくとも１つの核酸やタンパク質を決定することで、前記の少なくとも１つの核酸の発現または活性量の変化、または少なくとも１つの前記タンパク質の活性、または前記タンパク質の局在化変化がＣＮＳまたは眼の疾患に影響していることを示す工程とを有する。

【００５１】

第一に、ＣＮＳまたは眼性疾患に関連した病的状態につながるストレス条件下で、細胞、組織、または非ヒト動物を培養・育成する。好ましくは、前記方法が細胞培養を基本とした方法である。（培養または被験動物に含まれる）検討される好適な細胞及び組織は、ＣＮＳおよび／または眼に属する細胞及び組織であり、例えば神経細胞、グリア細胞、網膜細胞などである。

【００５２】

本発明の前記方法に関する特定の好適な実施例では、前記細胞がＲＰＥ細胞、または細

胞株ＡＲＰＥ－１９などのＲＰＥに由来する確立した細胞株である；下記も参照。ＲＰＥ細胞の単離について、下記の例１などで説明する。ＡＲＰＥ－１９細胞株については、Ｄｕｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．６２（１９９６），１５５～１６９で報告されている。例えば、ＡＲＰＥ－１９細胞株は、硝子体を処理することで、増殖性硝子体網膜症中にｉｎ　ｖｉｖｏで観察される修復反応を模倣することに特に適している。

【００５３】

前述のストレス条件は、細胞、組織、または動物の培養条件を異常にすることで発生させることができ、例えば酸化的ストレス、低酸素の培養条件、不十分な栄養および／または成長因子、ｐＨ値の変化および／または桿体外節（ＲＯＳ）とＡ２－Ｅの両方または何れか一方の病態生理学的濃度、を供給することなどを有する；例３～１０も参照。好適なストレス条件は、桿体外節（ＲＯＳ）および／またはＡ２－Ｅの病態生理学的濃度によって与える条件である。例えば、眼の内節組織に異常な状態で供給することができ、これは本発明の方法の好適な実施例である。表１は、変化した発現がアポトーシス、低酸素培養条件、または酸化的ストレスを示し、それによって適用されたストレスと細胞の反応をそれぞれ確認および／または定量するために用いられる、一般的なマーカー遺伝子を示している。

【００５４】

本発明の方法のさらなる工程では、前記細胞、組織、または動物のサンプルから核酸および／またはタンパク質を単離する工程が関与し、さらなる工程では、少なくとも１つの前記核酸および／またはタンパク質の発現または活性プロフィールを、対応する未処理の細胞、組織、または動物のもの、および／または異なるストレス条件下で処理した細胞、組織、動物のものと比較する工程が関与する。核酸及びタンパク質の単離は、当業者に周知の方法で行われ、引用した文献に報告されている；例１１及び１２も参照のこと。

【００５５】

最後の工程では、異なって発現された少なくとも１つの核酸および／またはタンパク質を決定することで、前記の少なくとも１つの核酸の発現または活性量の変化、または少なくとも１つの前記タンパク質の活性、または前記タンパク質の局在化変化がＣＮＳまたは眼の疾患に影響していることを示す。

【００５６】

本発明のスクリーニング法に関する１つの実施例では、核酸の発現を発現アレイおよび／またはリアルタイムＰＣＲにより分析する。チップ及びアレイ技術は当業者に周知であり；例１４～２０も参照のこと。ＤＮＡによる診断アプローチの進歩は、例えばＷｈｉｔｃｏｍｂｅ　ｅｔ　ａｌ．ｉｎ　Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．９（１９９８），６０２～６０８でレビューされている。さらに、ＤＮＡチップとマイクロアレイ技術の装置、システム、応用は、Ｃｕｚｉｎ，Ｔｒａｎｓｆｕｓ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｌ．８（２００１），２９１～２９６及びＨｅｌｌｅｒ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．（２００２），１２９～１５３などで報告されている。同様に、タンパク質チップの生物化学的応用はＮｇ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．６（２００２），３２９～３４０などで知られ、報告されている。

【００５７】

別の実施例では、前記タンパク質発現がイムノブロットアッセイまたはＥＬＩＳＡアッセイ、または２Ｄゲル電気泳動、またはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦで分析され、特に、血管新生や新血管新生に関与するタンパク質に特異的な好適な抗体が利用される。

【００５８】

ベクター及びプラスミドの構築、そのようなベクター及びプラスミドへのポリペプチドをコードする遺伝子の挿入、宿主細胞へのプラスミドの導入に利用される方法など、従来の方法の詳細、その遺伝子及び遺伝子産物の発現と定量法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓなど、多数の文献で知ることができる。そのように同定された核

酸候補またはコードされたポリペプチドは、発現させて表現型を観察することで妥当性を確認することができる。従って、前記スクリーニング方法のさらなる実施例は、前記細胞、組織、または動物の表現型の反応変化を誘導できるかについて、前記細胞、素特、動物中の同定された核酸候補またはコードされたポリペプチドの発現を過剰発現または抑制する方法を有し、前記表現型はＣＮＳまたは眼の疾患に関連している。

【００５９】

前記細胞の表現型の反応変化は、前記細胞、その分泌因子、その細胞可溶化物を内皮細胞培養するか、および／または細胞増殖、電気生理学的活性、ＤＮＡ合成、細胞増殖、細胞遊走、ケモキネシス、走化性、血管の発達、マーカー遺伝子の発現または活性、アポトーシス、生存度など、様々なパラメーターを分析することで観察することができる。そのようなアッセイの例は以下のとおりである。

【００６０】

増殖細胞核抗原アッセイ（ＰＣＮＡ）またはＴＵＮＥＬアッセイについては、Ｍｏｎｔｅｓａｎｏ，Ｒ．：「ｉｎ ｖｉｔｒｏでの血管新生の調節（Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｅｓｉｓ ｉｎ ｖｉｔｒｏ）」Ｅｕｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，２２：５０４～５１５，１９９２．Ｍｏｎｔｅｓａｎｏ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．：「塩基性線維芽細胞成長因子はｉｎ ｖｉｔｒｏで血管新生を誘導する（Ｂａｓｉｃ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｉｎｄｕｃｅｓ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｖｉｔｒｏ）」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，８３：７２９７～７３０１，１９８６．Ｈｏｌｍｇｒｅｎ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．：「微小転移巣の休止：血管新生の抑制がある場合の増殖とアポトーシスのバランス（Ｄｏｒｍａｎｃｙ ｏｆ ｍｉｃｔｒｏｍｅｔａｓｔａｓｅｓ：Ｂａｌａｎｃｅｄ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ ｔｈｅ ｐｒｅｓｅｎｃｅ ｏｆ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ）」Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ，１：１４９～１５３，１９９５で報告されている。

【００６１】

ボイデンチャンバー法については、Ｈｏｌｍｇｒｅｎ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．：「微小転移巣の休止：血管新生の抑制がある場合の増殖とアポトーシスのバランス（Ｄｏｒｍａｎｃｙ ｏｆ ｍｉｃｔｒｏｍｅｔａｓｔａｓｅｓ：Ｂａｌａｎｃｅｄ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ ｔｈｅ ｐｒｅｓｅｎｃｅ ｏｆ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ）」Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ，１：１４９～１５３，１９９５．Ａｌｂｉｎｉ，Ａ．ｅｔ ａｌ．：「腫瘍細胞の侵襲性の可能性を定量するための迅速なｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイ（Ａ ｒａｐｉｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｎｇ ｔｈｅ ｉｎｖａｓｓｉｖｅ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｏｆ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ）」Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４７：３２３９～３２４５，１９８７．Ｈｕ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．：「アンジオゲニンは細胞関連タンパク分解活性を刺激することで、培養された内皮細胞の侵襲性を亢進（Ａｎｇｉｏｇｅｎｅｎ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ｉｎｖａｓｉｓｓｉｖｅ ｏｆ ｃｕｌｔｕｒｅｄ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｅｌｌ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃ ａｃｔｉｖｉｔｉｅｓ）」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，６：１２０９６～１２１００，１９９４．Ａｌｅｓｓａｎｄｒｉ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．：「ｉｎ ｖｉｔｒｏでの毛細管内皮の可動化はｉｎ ｖｉｖｏの血管新生のエフェクターにより誘導される（Ｍｏｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｃａｐｉｌｌａｒｙ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｕｍ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ｅｆｆｅｃｔｏｒｓ ｏｆ ａｎｇｉｏｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｖｉｖｏ）」Ｃａｎｃｅｒ ｒｅｓ，４３：１７９０～１７９７，１９８３で報告されている。

【００６２】

大動脈輪血管新生アッセイについては、Ｚｕｈ，Ｗ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ．：「ラットの血管新生大動脈モデルにおける、マトリックスメタロプロテアーゼによる血管の成長と退化の調節（Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｖａｓｃｕｌａｒ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｒ

egression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis）」Lab Invest, 80：545～555, 2000. Kruger, EA. et al.：「プロテインキナーゼC阻害薬UCN01は、内皮細胞の増殖と血管由来低酸素反応を阻害。（a protein kinase C inhibitor, inhibits endothelial cell proliferation and angiogenic hypoxic resopnse）」Invasion Metastas, 18：209～218, 2000. Kruger, E. A. et al.：「エンドスタチンは、ラット大動脈輪血管形成アッセイで微小血管の形成を抑制（Endostatin inhibits microvessel formation in the rat aortic ring angiogenesis assay）」Biochem Biophys Res Commun, 268：183～191, 2000. Bauer, K. S. et al.：「サリドマイドによる血管形成の抑制では、種依存的な代謝活性が必要（Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species dependent）」Biochem Pharmacol, 55：1827～1834, 1998. Bauer, K. S. et al.：「カルボキシアミドトリアゾールは、カルシウムを介した酸化窒素合成酵素－血管内皮成長因子経路を遮断することで血管新生を抑制（Carboxyamidotriazole inhibits angiogensis by blocking the calcium－mediated nitric－oxide synthase－vascular endothelial growth factor pathway）」J Pharmacol Exp Ther, 292：31～37, 2000. Berger, A. C. et al.：「内皮単球活性化ポリペプチドIIIは内皮細胞アポトーシスを誘導し、腫瘍血管形成を阻害する可能性がある（Endothelial monocyte activating polypeptide III induces endothelial cell apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis）」Microvasc Res, 60：70～80, 2000で報告されている。

【0063】

伏在静脈血管新生アッセイについては、Kruger, E. A. et al.：「エンドスタチンは、ラット大動脈輪血管形成アッセイで微小血管の形成を抑制（Endostatin inhibits microvessel formation in the rat aortic ring angiogenesis assay）」Biochem Biophys Res Commun, 268：183～191, 2000で報告されている。

【0064】

角膜マイクロポケットアッセイについては、Gimbrone, E. A. et al：「腫瘍の増殖と新血管新生：ウサギの角膜を用いた実験モデル（Tumor growth and neovascularization：an experimental model using the rabbit cornea）」J Natl Cancer Inst, 52：413～427, 1974. Kenyon, B. M. et al.：「マウス角膜の血管新生モデル（A model og angiogenesis in the rabbit cornea）」Invest Ophthalmol Vis Sci, 37：1625～1632, 1996. Kenyon, B. M. et al.：「マウス角膜の新血管新生モデルにおけるサリドマイドと関連代謝物の作用（Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization）」Exp Eye Res, 64：971～978, 1997. Proia, A. D. et al.：「ラットの角膜血管新生におけるアン

ジオスタチンステロイドとβ－シクロデキストリンテトラデカスルフェートの作用（The effect of angiostatic steroids and beta－cyclodextrin tetradecasulfate on corneal neovasculatization in the rat）」Exp Eye Res，57：693～698，1993で報告されている。

【0065】

鶏胚漿尿膜アッセイについては、Knighton，D. et al.：「ニワトリ胚の腫瘍増殖因子の無血管期及び血管期（Avascular and vascular phases of tumor growth factor in the chicken embryo）」Br J Cancer，35：347～356，1977．Auerbach，R. et al.：「簡単なニワトリ胚の長期培養法（A simple procedure for the long－term cultivation of chicken embryos）」Dev Biol，41：391～394，1974．Ausprunk，D. H. et al.：「鶏胚漿尿膜の血管内皮の分化：構造及びオートラジオグラフィーの研究（Differentiation of vascular rndthelium in the chick chorioallantois：A structural and autoradiopraphic study）」Dev Biol，38：237～248，1974．Nguyen，M. et al.：「鶏胚漿尿膜の血管新生及び抗血管新生の定量（Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane）」Microvasc Res，47： 31～40，1994で報告されている。

【0066】

さらに、前記細胞のサンプルを、妥当性が確認された候補核酸またはコードされたポリペプチドに特異的なインヒビターで処理し、第２の工程で、前記細胞、その分泌された因子、またはその細胞可溶化物が、インヒビターを用いない場合に観察された表現型の反応変化を誘導する活性がなくなるか否かを判断する。好適な実施例では、前記表現型が血管新生および／または新血管新生である。インヒビターとして、前述の分子を利用することができる。好ましくは、標的遺伝子の発現を抑制するためのｓｉＲＮＡ技術を用いる。本明細書で述べたとおり、本発明の方法に採用できる、哺乳類遺伝子発現のｓｉＲＮＡを介したノックダウンプロトコール集は、例えばＥｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ２６（２００２），１９９～２１３ ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １１０（２００２），５６３～５７４に報告されている。

【0067】

前記遺伝子によって生じた疾患の治療に用いるアッセイと薬物の開発については、これらの核酸とタンパク質の配列を同定することが必要な場合が多く、任意に対応するコード遺伝子またはｃＤＮＡも同定する。ＣＮＳおよび／または眼に特異的な細胞の特異的機能に基づき、遺伝子、つまりＣＮＳまたは眼性疾患を生じる異常機能が、それぞれの組織及び細胞で特異的に発現しているため、薬物介入に好ましい標的となっている。従って、前記の同定された遺伝子、ｃＤＮＡ、またはそのフラグメントは、通常クローニングされ、特に血管新生や新血管新生に関与するポリペプチドをコードしている場合、本発明の一部から本明細書で説明した前記方法により入手可能な核酸分子である。そのような核酸分子は、ＤＮＡまたはｃＤＮＡであり、哺乳類、また好適な実施例ではマウスまたはヒトに由来する。

【0068】

従って、実験の第１の工程では、実際に、とりわけ網膜の光受容体細胞の変性で特徴付けられる常染色体劣性網膜色素変性症（ＡＲＲＰ）に関与することが知られている、いくつかの核酸分子を同定することができる。例えば、核酸分子はヒトサイクリックヌクレオチドのゲート型チャネルα１をコードした遺伝子に一致することが同定することができた

（ＣＮＧＡ１，受入番号ＮＭ＿０００００８７；　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１及び２）。この遺伝子の突然変異は、常染色体劣性網膜色素変性症に関与していることが報告された；Ｄｒｙｊａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２（１９９５），１０１７７～１０１８１を参照。別の実験では、桿体ｃＧＭＰホスホジエステラーゼのβサブユニットをコードするヒト遺伝子（受入番号ＮＭ＿０００２８３；　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　３及び４）に対応する核酸分子が同定された。この遺伝子の機能異常は、常染色体劣性網膜色素変性症、特に先天性定常的夜盲症（ｃｏｎｇｅｎｉｔａｌ　ｓｔａｔｉｏｎａｒｙ　ｎｉｇｈｔ　ｂｌｉｎｄｎｅｓｓ）３型（ＣＳＮＢ３）と関与していた。これらの結果は、本発明の作用方法を確認している。

【００６９】

別の実施例では、前記核酸分子が前記核酸分子の１つと特異的にハイブリダイズし、前記核酸分子が表現型の反応変化を誘導する能力を失ったタンパク質の突然変異型をコードする。加えてまたは代わりに、核酸分子が少なくとも１５ヌクレオチド長を含み、前記核酸分子またはその相補的な鎖と特異的にハイブリダイズすることができる。これらの核酸分子は、特にプローブとして有用である；下記を参照のこと。

【００７０】

前記核酸分子はベクターに含めることができ、好ましくは、原核生物または真核生物の宿主細胞で発現させることができる制御要素に操作可能なように結合させる。前記核酸の発現には、邦訳可能なｍＲＮＡへの転写を有する。真核細胞、好ましくは哺乳類細胞の発現を確実にする制御要素は、当該分野で周知である。通常、その要素は確実に転写を開始させる制御配列と、任意に、確実に転写の停止と転写物の安定化させるポリＡシグナルを有する。さらなる規制要素には、転写エンハンサー及び翻訳エンハンサーや、天然に関連するか、非相同的なプロモーター領域が含まれてもよい。

【００７１】

原核生物の宿主細胞での発現を可能とする、考えられる制御要素は、例えば大腸菌のP_L、ｌａｃ、ｔｒｐ、またはｔａｃプロモーターを有し、真核生物の宿主細胞での発現を可能とする制御要素の例は、酵母のＡＯＸ１またはＧＡＬ１プロモーター、または哺乳類や他動物の細胞のＣＭＶ－プロモーター、ＳＶ４０－プロモーター、ＲＳＶ－プロモーター、ＣＭＶ－エンハンサー、ＳＶ４０－エンハンサー、またはグロブリンイントロンである。

【００７２】

転写開始に関係する要素をはずれて、そのような制御要素は、核酸分子下流のＳＶ４０－ポリ－Ａ部位やｔｋ－ポリ－Ａ部位などの転写停止シグナルを有してもよい。さらに、用いた発現系によっては、ポリペプチドを細胞の成分に誘導するか、媒質に分泌することができるリーダー配列を、本発明のポリペプチドのコード配列に追加することができ、これは本分野で周知である。前記リーダー配列は、翻訳、開始、停止配列、好ましくは、翻訳されたタンパク質またはその一部を細胞膜周辺腔または細胞外媒質に分泌させることができるリーダー配列とともに適切な相で集合させる。任意に、前記の異種配列は、例えば安定化または発現された組換え産物の精製単純化など、望みの特徴を与えるＣ－またはＮ－末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。これに関連して、Ｏｋａｙａｍａ－Ｂｅｒｇ　ｃＤＮＡ発現ベクターｐｃＤＶ１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ｐＣＤＭ８、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐｃＤＮＡ１、ｐｃＤＮＡ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、またはｐＳＰＯＲＴ１（ＧＩＢＣＯ　ＢＲＬ）などの適当な発現ベクターが、当該分野で知られている。

【００７３】

好ましくは、前記発現制御配列は、真核生物の宿主細胞を形質転換または形質移入することができるベクターの真核生物プロモーターシステムであるが、原核生物の宿主の制御配列も利用することができる。前記ベクターを適切な宿主に組み込んだら、前記宿主を高レベルで発現したヌクレオチド配列に適した条件で管理し、適宜そのように生成した前記タンパク質を回収、精製する。

【００７４】
さらに、本発明はベクター、特に従来から遺伝子工学に利用され、本発明の核酸分子を有するプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージに関するものである。好ましくは、前記ベクターが発現ベクターや遺伝子導入またはターゲティングベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウィルス、またはウシパピローマウイルスなどのウイルスに由来する発現ベクターは、標的細胞集団に本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを送達するために用いることができる。当業者に周知の方法を用い、組換え型ウイルスベクターを構築することができる；例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８９）Ｎ．Ｙ．及びＡｕｓｕｂｅｌ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．（１９９４）で報告されている技術を参照されたい。代わりに、本発明のポリペプチドとベクターは、標的細胞に送達するリポソームに再構成することができる。本発明の前記核酸分子を有するベクターは、細胞宿主のタイプによって変わる周知の方法により、宿主細胞に移入することができる。例えば、原核生物の細胞では塩化カルシウムの形質移入が一般的に用いられているが、他の細胞宿主では、リン酸カルシウム処理または電気穿孔法が用いられることもある；前記Ｓａｍｂｒｏｏｋを参照。

【００７５】
本発明の教示することに従って治療および／または診断目的で利用されるベクターは当業者に周知であり；例えば、Ｔａｖｅｒｎａｒａｋｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２４（２０００），１８０～１８３に記載されている、導入遺伝子によってコードされた二本鎖ＲＮＡによる遺伝性及び誘導性の遺伝的干渉などを参照のこと。さらに、遺伝子転移及び遺伝子組換え動物の作成のためのベクター及び方法は先行技術中に記載されており；例えば、Ｑｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．７７（２００３），２７４１～２７４６に報告されている「アデノ随伴ウイルス関連ベクター（ａｄｅｎｏ‐ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ ｒｅｌａｔｅｄ ｖｅｃｔｏｒｓ）」、Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｅｙｅ Ｒｅｓ．２４（２００２），１９６～２０１に報告されている「ヒト免疫不全ウイルス２型（ＨＩＶ－２）ベクターを介したｉｎ ｖｉｖｏの、成獣ウサギ網膜への遺伝子導入（ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ ｔｙｐｅ ２（ＨＩＶ‐２） ｖｅｃｔｏｒ‐ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｉｎｔｏ ａｄｕｌｔ ｒａｂｂｉｔ ｒｅｔｉｎａ）」、Ｋｒｅｐｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ．Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．４３（２００２），１９６５～１９７０に報告されている「高能力アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入後のＲＰＥの長期的な導入遺伝子の発現（ｌｏｎｇ‐ｔｅｒｍ ｔｒａｎｓｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ＲＰＥ ａｆｔｅｒ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｗｉｔｈ ａ ｈｉｇｈ‐ｃａｐａｃｉｔｙ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒ）」、Ｂｏｒｒａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎｅ Ｍｅｄ．３（２００１），４３７～４４９に報告されている「ｉｎ ｖｉｖｏでのサルの眼の前部に繰り返しアデノウイルスＧＦＰ遺伝子を送達する非侵襲的所見（ｎｏｎ‐ｉｎｖａｓｓｉｖｅ ｏｂｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｐｅａｔｅｄ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ＧＦＰ ｇｅｎｅ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｔｈｅ ａｎｔｅｒｉｏｒ ｓｅｇｍｅｎｔ ｏｆ ｔｈｅ ｍｏｎｋｅｙ ｅｙｅ ｉｎ ｖｉｖｏ）」などを参照のこと。

【００７６】
ＣＮＳ遺伝子導入については、Ｌｅｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１（１９９９），４８７～４９２にも報告された。

【００７７】
今度は、前記ベクターを宿主細胞に含めることができる。細菌、真菌、植物、または動物細胞を宿主として用いることができるが、哺乳類細胞、特にＲＰＥや神経感覚網膜細胞

が好ましい。

【００７８】

これらの宿主細胞を、前記ポリペプチドを発現させることができ、前記の生成したポリペプチドを培養液から回収する条件で培養した場合、これは表現型の反応変化を誘導することができるポリペプチドを生産する方法から成る。従って、前記に定義したか、本方法で得られる核酸分子をコードしたポリペプチドは、本発明の好適な実施例であり、抗体はそのようなポリペプチドを特異的に認識する。前述のポリペプチドに対する抗体またはそのフラグメントは、例えばｉｎ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ ”Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”，ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，１９８８で報告されている方法を用いて得ることができる。

【００７９】

さらに、前記の同定、単離された核酸分子によってコードされたポリペプチドを用い、リガンド、基質、結合パートナー、または前記ポリペプチドの受容体に結合する、天然リガンドと同等に効果的な合成化学ペプチドミメティックスを同定することができる；例えばＥｎｇｌｅｍａｎ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９９（１９９７），２２８４～２２９２を参照。例えば、適切なコンピュータープログラムを用い、前記タンパク質の構造モチーフについて、折りたたみのシミュレーションとコンピューターによる再設計を行うことができる（Ｏｌｓｚｅｗｓｋｉ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ２５（１９９６），２８６～２９９； Ｈｏｆｆｍａｎ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．１１（１９９５），６７５～６７９）。ペプチドとタンパク質の詳細モデルの立体配置的、エネルギー的分析において、タンパク質の折りたたみのコンピューターモデルを用いることができる（Ｍｏｎｇｅ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４７（１９９５），９９５～１０１２； Ｒｅｎｏｕｆ，Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．３７６（１９９５），３７～４５）。特に、前記の適切なプログラムは、相補的なペプチド配列に関するコンピューター支援検索により、ポリペプチドとそのリガンドや他の相互作用するタンパク質との相互作用部位の同定に用いることができる（Ｆａｓｓｉｎａ，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ５（１９９４），１１４～１２０）。タンパク質とペプチドの設計に関するさらに適切なコンピューターシステムについては、先行技術で報告されており、例えばＢｅｒｒｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．２２（１９９４），１０３３～１０３６； Ｗｏｄａｋ，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５０１（１９８７），１～１３； Ｐａｂｏ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２５（１９８６），５９８７～５９９１などがある。ペプチドミメティックのコンビナトリアルライブラリの作成法と利用法については、先行技術で報告されており、例えばＯｓｔｒｅｓｈ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２６７（１９９６），２２０～２３４ ａｎｄ Ｄｏｒｎｅｒ，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４（１９９６），７０９～７１５などがある。さらに、本発明のタンパク質の生物活性を模倣したインヒビターの設計に、前記ポリペプチドの三次元構造や結晶構造を用いることができる（Ｒｏｓｅ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３５（１９９６），１２９３３～１２９４４； Ｒｕｔｅｎｂｅｒ，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４（１９９６），１５４５～１５５８）。

【００８０】

天然の生物ポリペプチド活性を模倣した、低分子量の合成分子の構造に基づく設計と合成については、さらにＤｏｗｄ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（１９９８），１９０～１９５； Ｋｉｅｂｅｒ－Ｅｍｍｏｎｓ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．８（１９９７），４３５～４４１； Ｍｏｏｒｅ，Ｐｒｏｃ．Ｗｅｓｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｏｃ．４０（１９９７），１１５～１１９； Ｍａｔｈｅｗｓ，Ｐｒｏｃ．Ｗｅｓｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｏｃ．４０（１９９７），１２１～１２５； Ｍｕｋｈｉｊａ，Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２５４（１９９８），４３３～４３８などで報告されている。

【００８１】

本発明の方法によって同定、単離された前記核酸分子は、活性化因子及びインヒビター

の標的とすることもできる。活性化因子は、例えば、対応する遺伝子のｍＲＮＡに結合することで、例えばＨＩＶ－ＲＮＡのＴａｔタンパク質が作用するように、ｍＲＮＡの天然型の配置を安定化し、転写や翻訳を促進するタンパク質を有する。さらに、化合物が細胞の内部に結合し、細胞増殖や細胞死が遅延する、定義されたもしくは定義されていない標的ＲＮＡ分子の構造を模倣したＲＮＡ断片など、核酸分子を同定する方法が文献に報告されている；例えば国際公開番号第ＷＯ９８／１８９４７号とそこに引用された参考文献などを参照。これらの核酸分子を用い、薬理学的または農業的関心から未知化合物を同定し、疾患を治療するために利用する未知のＲＮＡ標的を同定することができる。代わりに、例えば、結合部位を模倣したＲＮＡ断片の立体配置的構造は、既知のリガンドを標的に結合しやすくするように修飾する、理論的なドラッグデザインに利用することができる。そのような方法の１つは核磁気共鳴（ＮＭＲ）であり、薬物とＲＮＡ配置構造の同定に有用である。まだ他の方法には、例えば国際公開番号第ＷＯ９５／３５３６７号、米国特許公開第ＵＳ－Ａ－５，３２２，９３３号で報告された薬物設計の方法があり、前記ＲＮＡ断片の結晶構造を推論することができ、コンピュータープログラムを利用して抗生物質として作用する新規結合化合物を設計する。

【００８２】

従って、アンタゴニスト／インヒビターは、例えば抗体、アンチセンス核酸分子、リガンド結合分子をとりうる。好ましくは、前記アンタゴニスト／インヒビターがポリペプチドの配置／機能の変化に干渉し、最も好ましくは血管新生や新血管新生に関連した生物活性に干渉する。

【００８３】

本発明の組成物で用いられる抗体、核酸分子、インヒビター、活性物質は、特に刺激が望ましい場合に、天然型リガンドの結合特異性または前記タンパク質の結合パートナーに少なくとも実質的に同等の特異性を持つことが好ましい。抗体またはインヒビターは、少なくとも10^{5} M^{-1}、好ましくは10^{7} M^{-1}以上、抑制が関与する場合、有利には10^{10} M^{-1}までの前記タンパク質に対する結合親和性がある。好適な実施例では、抑制性抗体またはインヒビターに少なくとも約10^{-7} Ｍ、好ましくは少なくとも約10^{-9} Ｍ、最も好ましくは少なくとも約10^{-11} Ｍの親和性があり、活性化因子には約10^{-7} Ｍ未満、好ましくは約10^{-6} Ｍ未満、最も好ましくは10^{-5} Ｍの位数で親和性がある。

【００８４】

アンチセンス核酸分子の場合、コード配列の２０連続ヌクレオチドの完全な相補体よりも多くて２、５、１０倍少ない前記タンパク質をコードする核酸分子に対して、結合親和性があることが好ましい。

【００８５】

本発明の別の実施例は、前記に定義した通り、前記の核酸分子、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、および／または抗体と、任意に医薬品として認められた担体とを有する医薬品である；上記及び下記を参照。これらの組成物は、効果的な用量で医薬品などを被験者に投与することを有する、ＣＮＳまたは眼の疾患の治療法に用いることができる。

【００８６】

同様に、前記核酸分子、ベクター、宿主細胞、ポリペプチド、および／または抗体と、任意に適当な検出法も含めた診断組成物で用いることができる。ＣＮＳまたは眼の疾患に関与する遺伝子の発現は、細胞からｍＲＮＡを採取し、そのように採取された前記ｍＲＮＡを、ハイブリダイズする条件で前記に示した核酸分子を有するプローブまたはそのフラグメントとインキュベートし、前記プローブにハイブリダイズしたｍＲＮＡの有無を検出することで、検出可能である。前記のタンパク質レベルでは、遺伝子の発現を検出する工程に、前記被験者から細胞サンプルを採取する工程、そのように採取された細胞サンプルを前記に定義した抗体と接触させる工程、そのように結合した抗体の有無を検出する工程が関与する。このように、表現型の反応変化を誘導することができなくなった、変異型核酸分子によってコードされるタンパク質の発現を検出することも可能である。

【００８７】
本発明では、被験者で疾患またはそのようなＣＮＳまたは眼の疾患への罹患しやすさを診断する方法を示し：
（ａ）前記疾患に罹患した患者からＤＮＡを単離する工程と；
（ｂ）前記ステップ（ａ）で単離されたＤＮＡを少なくとも１つの制限酵素で消化する工程と；
（ｃ）サイジングゲル上で得られたＤＮＡフラグメントを電気泳動により分離する工程と；
（ｄ）検出可能なマーカーで標識した、前記核酸分子またはそのフラグメントを有するプローブとともに、得られたゲルをインキュベートする工程と；
（ｅ）前記疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンを作ると定義されているプローブとハイブリダイズしたゲル上で、標識バンドを検出する工程と；
（ｆ）ステップ（ａ）～（ｅ）により被験者のＤＮＡを調整し、ゲル上で検出可能な標識バンドを生成する工程と；
（ｇ）ステップ（ｅ）の疾患患者のＤＮＡに特異的なバンドパターンとステップ（ｆ）の被験者のＤＮＡを比較し、前記パターンが同一か、異なっているかを決定し、前記パターンが同一の場合は、それによって前記疾患または前記疾患への罹患しやすさを診断する、決定する工程とを有する。
【００８８】
別の方法では、被験者で疾患またはそのようなＣＮＳまたは眼の疾患への罹患しやすさを診断する方法を示し：
（ａ）診断チップ、プライマー伸長法、一塩基多型、または配列決定の方法により、前記の核酸サンプルを有する被験者の核酸サンプルを分析する工程と；
（ｂ）前記の結果を前記疾患に罹患した患者から得られたサンプルの結果と比較する工程とを有し、前記発現プロフィールの同一性とヌクレオチドの配列は、前記疾患を示す。
【００８９】
これらの実施例では、前記に定義された核酸分子、（ポリ）ペプチド、抗体、または化合物を標識し、検出できることが好ましい。標識生体分子については様々な技術が利用されており、当業者に周知であり、本発明の範囲内と考える。そのような技術は、例えばＴｉｊｓｓｅｎの「酵素免疫アッセイの技術と理論（Ｐｒａｃｔｉｃｅ ａｎｄ ｔｈｅｏｒｙ ｏｆ ｅｎｚｙｍｅ ｉｍｍｕｎｏ ａｓｓａｙｓ）」、Ｂｕｒｄｅｎ，ＲＨ及びｖｏｎ Ｋｎｉｐｐｅｎｂｕｒｇ（Ｅｄｓ）、Ｖｏｌｕｍｅ １５（１９８５）の「分子生物学の基本的方法（Ｂａｓｉｃ ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｂｉｏｌｏｇｙ）」；Ｄａｖｉｓ ＬＧ，Ｄｉｂｍｅｒ ＭＤ；Ｂａｔｔｅｙ Ｅｌｓｅｖｉｅｒ（１９９０），Ｍａｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，（Ｅｄｓ）の「細胞及び分子生物学の免疫化学的方法（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ ｃｅｌｌ ａｎｄ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｂｉｏｌｏｇｙ）」Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ（１９８７）、または「酵素学の方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ）」シリーズＡｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃで報告されている。普通の当業者に知られている標識には、多数の異なる標識と方法がある。一般的に使用される標識は、とりわけ蛍光色素（フルオロセイン、ロダミン、テキサスレッドなど）、酵素（西洋わさびペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、放射性同位元素（^{32}Ｐや^{125}Ｉなど）、ビオチン、ジゴキシゲニン、コロイド金属、化学発光または生物発光化合物（ジオキセタン、ルミノール、またはアクリジニウムなど）を有する。酵素またはビオチン基の共有結合カップリング、ヨウ素化、リン酸化、ビオチン化、ランダムプライミング、ニックトランスレーション、（末端転移酵素を用いた）テーリングなどの標識処理が当該分野で周知である。検出法は、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡、直接的及び間接的酵素反応などを有するが、これだけに限らない。
【００９０】
さらに、前記化合物などは固相に結合してもよい。固相は当業者に周知であり、ポリス

チレンビーズ、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび／またはシリコンチップ及びシリコン表面、ニトロセルロース片、膜、シート、動物赤血球、または赤血球ゴースト、ｄｕｒａｃｙｔｅｓ、及び反応トレー、プラスチックチューブ、または他の試験管の穴壁を有する。核酸、（ポリ）ペプチド、タンパク質、抗体などを固相に固定化するのに適した方法は、イオン、疎水性、共有結合の相互作用などがあるが、これだけに限らない。固相は１つ以上の追加受容体を保有し、前記に定義した部位を結合し固定することができる。この受容体は、試薬自体または捕捉試薬に結合した荷電基質とは反対に荷電した荷電基質を有することができ、または、前記受容体を前記固相に固定化（結合）しているか、前記に定義した試薬を固定することができる特異的結合部位とすることができる。

【００９１】

一般的に利用される検出アッセイは、放射性同位元素法または非放射性同位元素法を有することができる。これは、とりわけＲＩＡ（放射性同位体測定法）及びＩＲＭＡ（免疫放射定量法）、ＥＩＡ（酵素免疫測定法）、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫測定法）、ＦＩＡ（蛍光免疫測定法）、ＣＬＩＡ（化学発光免疫測定法）を有する。他の当該分野で利用される検出法は、トレーサー分子を利用しない方法である。これらの方法の１つの典型は前記凝集アッセイであり、少なくとも２つの粒子を架橋する特定分子の性質に基づいている。

【００９２】

臨床または科学的標本中の（ポリ）ペプチド、ポリヌクレオチドなどの診断と定量については、前記に定義した様々な免疫学的方法や、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、ＰＣＲアッセイ、またはＤＮＡ酵素免疫測定法などの分子生物学的方法（Ｍａｎｔｅｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３７（１９９１），４２２～４２９）が開発され、当該分野で周知である。これに関連して、核酸分子はＰＮＡ、つまりアミド骨格の結合を有する修飾ＤＮＡを有することもできる。そのようなＰＮＡは、とりわけＤＮＡ／ＲＮＡハイブリダイゼーションのプローブとして有用である。

【００９３】

前記組成物は、（ポリ）ペプチドをコードするｍＲＮＡの有無を検出することで、標的遺伝子の発現を検出する工程に用いることもでき、例えば被験者の細胞からｍＲＮＡを採取し、そのように得られた前記ｍＲＮＡを、適切なハイブリダイゼーションの条件で標的遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができる核酸分子を有するプローブ／プライマーと接触させる工程、及び前記プローブ／プライマーとハイブリダイズするｍＲＮＡの有無を検出する工程を有する。サンプル中の核酸分子を検出する、さらなる診断法は、例えば核酸ハイブリダイゼーション、比較ゲノムハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）、またはｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｖｅ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ（ＲＤＡ）と組み合わせたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、サザンブロット法を有する。核酸分子の有無を測定するこれらの方法は当該分野で周知であり、必要以上の実験を行わずに実施することができる。

【００９４】

さらに、本発明は標的遺伝子産物、つまりサンプル（細胞サンプルなど）中のタンパク質の有無を検出する工程を有し、被験者から細胞サンプルを採取する工程、前記抗体を前記タンパク質に結合させる条件下で、前述の抗体の１つと前記サンプルを接触させる工程、例えばラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法などの免疫測定技術を用いて、そのように結合した前記抗体の有無を検出する工程を有する。さらに、当業者は、天然の活性を持つがその不活性体は認識しないか、不活性体を特異的に認識するが天然の活性を持つ対応するポリペプチドを認識しない（ポリ）ペプチドを特異的に認識する抗体を用い、活性が失われたか変化した変異体と機能的な標的タンパク質のポリペプチドを特異的に検出し、区別することができる。

【００９５】

本発明は、患者において、標的遺伝子の対立遺伝子の発現に関連したＣＮＳおよび／ま

たは眼性疾患への罹患しやすさを診断する工程を含む；上記を参照。本発明の検出可能なマーカーは、例えば^{32}Pや^{35}Sなど、一般的に利用される放射性標識で標識することができるが、ビオチンや水銀などの他の標識、また前述の標識を利用することもできる。当業者に周知の様々な方法を用いて、前記の検出可能なマーカーを標識することができる。例えば、ＤＮＡ配列とＲＮＡ配列をランダムプライマー法により^{32}Pまたは^{35}Sで標識することができる。適切な検出可能なマーカーが得られたら、当業者に周知の様々な方法を用いて、前記検出可能なマーカーを対象のサンプルに接触させることができる。例えば、標準的な方法により、ＤＮＡ－ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＲＮＡのハイブリダイゼーションを行うことができる。核酸を検出する様々な方法が当該分野で周知であり、例えばサザンブロット法、ノーザンブロット法、ＰＣＲ、プライマー伸長法などがある。適切なさらなるＤＮＡ増幅法が当該分野で知られており、とりわけリガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅（Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、核酸配列による増幅（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｂａｓｅｄ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ：ＮＡＳＢＡ）、またはＱ－βレプリカーゼを有する。

【００９６】

さらに、前記被験者から採取したｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、ｃＤＮＡ、またはゲノムＤＮＡの配列を決定し、前記標的遺伝子またはその変異型の発現に関連した、前記のＣＮＳおよび／または眼性疾患の標的遺伝子変異に特徴的なフィンガープリントである変異を同定することができる。本発明はさらに、前記被験者から得たＤＮＡまたはＲＮＡのＲＦＬＰまたはＡＦＬＰにより、そのようなフィンガープリントを作成する方法を有し、任意に前記ＤＮＡまたはＲＮＡを分析前に増幅することができ、その方法は当該分野で周知である。例えば前記被験者から採取したＲＮＡサンプルを適当なＲＮＡ－酵素、例えばＲＮアーゼT_1、ＲＮアーゼもT_2など、またはリボザイムで消化し、例えば電気泳動により分離し、前記ＰＡＧＥで前記ＲＮＡ断片を検出することで、ＲＮＡフィンガープリントを行うことができる。好ましくは、ハイブリダイゼーション（及びその後の洗浄）は、厳密な条件で行う；例えば上記引用文中のＳａｍｂｒｏｏｋらの文献を参照。

【００９７】

さらに、本発明は、前記サンプルが毛髪、血液、血清、痰、便、または別の体液に由来している場合、前記方法に関連している。分析する前記サンプルは、とりわけ核酸分子、（ポリ）ペプチド、または抗体を抽出するなどの処理をすることができる。

【００９８】

本発明は、例えばここで以前に記載されたような特異的試薬を含むキット構成にも関するものである。オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡ、抗体またはタンパク質を含むキットを作成することができる。そのようなキットは、例えば前記標的遺伝子のＤＮＡにハイブリダイズするＤＮＡを検出するか、サンプル中のタンパク質またはペプチドフラグメントの有無を検出するために用いることができる。このような特性は、これに限定されるものではないが、本発明の上記方法に従った法医学的分析、診断適用、及び疫学的研究を含む様々な目的で有用である。前記組換え標的タンパク質、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、抗体は、前記標的遺伝子の検出及び分類に適したキットの構築に役立つ。そのようなキットは、一般的に、厳重な管理下にある少なくとも１つのコンテナを保持するのに適した区分化された担体を有する。前記担体はさらに、標的遺伝子または遺伝子産物の発現または活性の検出に適した組換えタンパク質または抗体などの試薬を有する。前記担体は標識化抗原または酵素基質などの検出のための手段も含む。

【００９９】

本発明の別の実施例では、有効量の前記核酸分子またはそのような核酸分子に相補的な核酸分子、または体細胞遺伝子治療により被験者のＣＮＳおよび／または眼の疾患を治療、予防、遅延させる組成物を調整するため、事前に定義したベクターを利用することを有する。

【０１００】

ここで用いるとおり、前記「有効量」という用語は、意味のある患者の利益、つまり、

前記ＣＮＳの疾患に関連した疾患、例えば新血管新生の治療、治癒、予防、回復、またはそのような疾患の治療、治癒、予防、回復率の改善を示すのに十分な薬物またはプロドラッグの総量を意味する。加えてまたは代わりに、特に前記薬物の前臨床試験については、前記「有効量」という用語に、非ヒト動物検査で生理反応を誘発するのに十分な薬物またはプロドラッグの総量を含める。

【０１０１】

前述のとおり、本発明のベクターは発現ベクター、遺伝子導入ベクター、遺伝子ターゲティングベクターであってもよい。遺伝子治療は、ｅｘ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｖｏ技術により細胞に治療遺伝子を導入することに基づいており、遺伝子導入の最も重要な応用の１つである。神経成長因子に対する中和抗体を発現した遺伝子組換えマウスは、「神経抗体（ｎｅｕｒｏａｎｔｉｂｏｄｙ）」法により作成された；Ｃａｐｓｏｎｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７（２０００），６８２６～６８３１及びＢｉｏｃｃａ，Ｅｍｂｏ Ｊ．９（１９９０），１０１～１０８。ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏ遺伝子療法での適切なベクター、方法、または遺伝子送達系については文献で報告されており、当業者に周知である；例えば、Ｇｉｏｒｄａｎｏ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２（１９９６），５３４～５３９；Ｓｃｈａｐｅｒ，Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．７９（１９９６），９１１～９１９； Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６（１９９２），８０８～８１３，Ｉｓｎｅｒ，Ｌａｎｃｅｔ ３４８（１９９６），３７０～３７４；Ｍｕｈｌｈａｕｓｅｒ，Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．７７（１９９５），１０７７～１０８６；Ｏｎｏｄｕａ，Ｂｌｏｏｄ ９１（１９９８），３０～３６；Ｖｅｒｚｅｌｅｔｔｉ，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．９（１９９８），２２４３～２２５１； Ｖｅｒｍａ，Ｎａｔｕｒｅ ３８９（１９９７），２３９～２４２；Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３９２（Ｓｕｐｐ．１９９８），２５～３０；Ｗａｎｇ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ４（１９９７），３９３～４００；Ｗａｎｇ，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２（１９９６），７１４～７１６；ＷＯ ９４／２９４６９； ＷＯ ９７／００９５７；ＵＳ ５，５８０，８５９；ＵＳ ５，５８９，４６６；ＵＳ ４，３９４，４４８、またはＳｃｈａｐｅｒ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７（１９９６），６３５～６４０と、そこで引用されている参考文献を参照。特に、前記ベクターや遺伝子送達系については、神経組織／細胞（とりわけＢｌｏｍｅｒ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７１（１９９７） ６６４１～６６４９を参照）または視床下部（とりわけＧｅｄｄｅｓ，Ｆｒｏｎｔ Ｎｅｕｒｏｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０（１９９９），２９６～３１６またはＧｅｄｄｅｓ，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．３（１９９７），１４０２～１４０４を参照）の遺伝子治療アプローチにも報告されている。神経細胞／組織での利用にさらに適した遺伝子治療構築物が当該分野で知られており、例えばＭｅｉｅｒ（１９９９），Ｊ．Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ．Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．５８，１０９９～１１１０にある。本発明の核酸分子とベクターは、直接導入するか、リポソーム（アデノウィルス、レトロウィルスなど）、電気穿孔法、衝撃（遺伝子銃など）または他の細胞への送達系により導入するように設計することができる。導入及び遺伝子治療法は、好ましくは、本発明の標的遺伝子の機能的コピーを発現させる必要がある。一方、標的遺伝子の発現量が低下した場合、好ましくは、前記の導入したベクターの発現により、例えばアンチセンスＲＮＡやＲＮＡｉ分子など、前述のインヒビターが産生される。これらの実施例では、前記核酸分子が、細胞または組織の両方または一方に特異的なプロモーター、特に好ましくは眼の細胞及び組織で発現を制御するプロモーターに結合していることが好ましい。適切なプロモーターの例としては、アンジオポエチン２プロモーター（Ｈａｃｋｅｔｔ，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１８４（２０００），２７５～２８４を参照）などがあり、特に好ましいプロモーターは、チロシン関連タンパク質－１（Ｔｙｒｐ１）プロモーターなどの網膜色素上皮の発現を標的とすることが可能である；Ｂｅｅｒｍａｎｎ，Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４５（１９９９），９６１～９６８を参照。

【０１０２】

さらなる態様では、本発明が、ＣＮＳまたは眼の疾患に関与するポリペプチドの発現ま

たは活性を調節する化合物のスクリーニング法も提示する。この方法には、事前に説明した方法で同定した前記ポリペプチドを発現した細胞に、スクリーニングする化合物を接触させ、前記発現または活性が変化するか否かを決定する工程が関与する。
前記化合物と細胞との接触に要する時間は、例えば、既知の分子を用いて時間を経過させ、時間の関数として細胞の変化を測定することで、経験的に決定する。本発明の方法の測定手段は、さらに化合物を処理した細胞と前記化合物を同様に処理し、同定された細胞と比較することで定義可能である。代わりに２つの細胞、つまり機能的な標的遺伝子を含む細胞と第１の細胞と同等であるが、機能的標的遺伝子がない第２の細胞を、いずれも前記の同一化合物と接触させ、２つの細胞の差を比較することができる。この技術は、これらのアッセイの雑音を確定する上で有用でもある。当該分野の平均的な技術の１つにより、これらの制御機序が、機能的な標的遺伝子または遺伝子産物の調節に反応した、細胞の変化の選択を容易にしていることが理解される。

【０１０３】

前記の「細胞」という用語は、少なくとも１つの細胞を指すが、前記検出法の感度に適した複数の細胞も含む。本発明に適した細胞は、細菌、酵母、また好ましくは真核生物である。本発明の方法では、特定タイプの細胞、細胞の生物学的状態の面からの変化の特定所見、これらの観察された変化の特定の比較を利用する。本発明のアッセイに利用される好ましい細胞株、特に、ヒト、ブタ、マウス由来のＣＮＳおよび／または眼に由来する細胞及び細胞株は、例及び先行技術に報告されており、例えば、ヒト網膜色素上皮細胞（例えばＤｕｎａｉｅｆ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｅｙｅ Ｒｅｓ．２４（２００２），３９２～３９６を参照）、不死化ヒト角膜上皮細胞株（例えばＡｔｈｍａｎａｔｈａｎ ｅｔ ａｌ．，ＢＭＣ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．３０（２００２），３を参照）、また、例えばヒト神経細胞株（例えばＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｒｅｓ．７１（２００３），５５９～５６６を参照）、ＳＶ４０ラージＴのＮ末端断片で固定したＣＮＳ細胞株（例えばＴｒｕｃｋｅｎｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｎｅｕｒｏｌ．１７５（２００２），３１８～３３７を参照）、マウス脈絡叢の不死化Ｚ３１０脈絡膜上皮細胞株（Ｚｈｅｎｇ ａｎｄ Ｚｈａｏ，Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．９５８（２００２），３７１～３８０を参照）などのＣＮＳ細胞がある。

【０１０４】

適切な細胞株、特に動物及びヒトの細胞株と細胞株の特徴に関する技術的知見、細胞遺伝的分析、細胞培養取り扱い指示などは、例えばＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ），Ｐ．Ｏ．Ｂｏｘ １５４９，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１０８，ＵＳＡ及びＤＳＭＺ － Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ，Ｍａｓｃｈｅｒｏｄｅｒ Ｗｅｇ １ｂ，３８１２４ Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，ＧＥＲＭＡＮＹなどの受託機関から入手できる。ＡＲＰＥ－１９などのＲＰＥ細胞またはＲＰＥ由来細胞株、ＣＮＳまたは眼性疾患に関与した候補遺伝子が過剰発現しているか、発現が抑制された細胞、または前述の宿主細胞が好ましい。

【０１０５】

好適な実施例では、前記ポリペプチドがＧＧＴＢプロモーターの制御下で発現され、これについてはｖａｎ Ｂｏｋｈｏｖｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ３８（１９９６），１３３～１４０で報告されている。被験物質は単一の化学療法剤、または化学療法剤の混合物とすることができる。

【０１０６】

被験物質に接触した前記細胞は、単細胞生物または多細胞生物に由来することができる。前記の多細胞生物は、脊椎動物、哺乳類、霊長類、無脊椎動物、昆虫、植物から成るグループから選択することができる。前記細胞は、組織または生物、つまり非ヒト動物に含まれてもよい。特定のアッセイで測定される細胞または生物で望みの効果を持つ化合物をスクリーニングする一般的な方法は、先行技術で報告されており；例えば米国特許公開第ＵＳ－Ａ－６，１６５，７０９号と本明細書で引用されている参考文献を参照のこと。

細胞、非ヒト動物、標的遺伝子発現、ノックアウト系は先行技術に見ることができ、本発明の方法で採用されている；例えば本明細書で引用されている文献を参照のこと。

【０１０７】

本発明の方法に適した細胞の変化は、直接標的遺伝子産物の機能または量の変化を測定すること、または下流の効果を測定する、例えば二次伝達物質の濃度または転写の変化、または標的遺伝子産物による転写の影響を受ける遺伝子のタンパク質レベルの変化を測定すること、または細胞の表現型変化を測定することを有する。好ましい測定方法には、タンパク質量の変化、機能活性の変化、ｍＲＮＡ量の変化、細胞内タンパク質の変化、細胞表面タンパク質または分泌されたタンパク質の変化、Ca^{2+}、ｃＡＭＰ、またはＧＴＰ濃度の変化などがある。標的遺伝子産物の量または機能活性の変化については、本明細書で説明する。ｍＲＮＡレベルの変化は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）、識別的遺伝子発現、マイクロアレイによって検出する。免疫親和性、リガンド親和性、酵素測定により、宿主細胞のタンパク質レベルの変化を定量する。タンパク質特異的な親和性ビーズまたは特定の抗体を用い、例えば^{35}Ｓ－メチオニン標識タンパク質または非標識タンパク質を単離する。標識タンパク質はＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析する。非標識タンパク質はウェスタンブロット法、蛍光細胞分類による細胞表面の検出、細胞画像分析、ＥＬＩＳＡ、またはＲＩＡを利用した特異的抗体により検出する。前記タンパク質が酵素の場合は、蛍光発生基質または比色分析基質の開裂により、タンパク質の誘導をモニターする。

【０１０８】

内因性遺伝子が可溶性細胞内タンパク質をコードする場合、前記内因性遺伝子の変化は、前記細胞可溶化物に含まれる特定タンパク質の変化によって測定することができる。前記可溶性タンパク質は、本明細書に説明する方法により測定することができる。

【０１０９】

前記アッセイは単純な「イエス／ノー」のアッセイであり、例えば血管新生活性の検出について、発現または機能に変化があるか否か、または前記方法のいずれか１つを有するか否かを決定する。前記アッセイは、被験サンプルの発現または機能を標準サンプルの発現または機能レベルと比較することで定量的とすることができる。このプロセスで同定された修飾因子は治療薬として有用である。

【０１１０】

前記方法は、当然、前記のスクリーニング法または他の当該分野で周知のスクリーニング法の１つ以上の工程と組み合わせることができる。臨床化合物の発見法は、例えば、リード化合物を同定するための極めて高い処理能力のスクリーニング法（Ｓｕｎｄｂｅｒｇ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１１（２０００），４７?５３）、構造を基にしたドラッグデザイン（Ｖｅｒｌｉｎｄｅ ａｎｄ Ｈｏｌ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２（１９９４），５７７?５８７）、リード化合物を最適化するためのコンビナトリアルケミストリー（Ｓａｌｅｍｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １５（１９９７），３１９?３２４）を有する。

【０１１１】

薬物を選択したら、前記方法に、修飾した薬物により合理的なドラッグデザインを行い、前記の修飾した薬物が例えば相互作用／エネルギー分析に沿ってより高い親和性を示すか否かを評価するために用いる方法を繰り返す工程を加えることができる。

【０１１２】

本発明の好適な実施例では、前記細胞、組織、または非ヒト動物が、対応する野生型の動物と比べ、標的遺伝子の発現レベルや遺伝子産物の活性レベルが大幅に低下または上昇して示される、遺伝子組換え細胞、組織、または非ヒト動物である。通常、標的遺伝子の活性レベルが低下した前記遺伝子組換え非ヒト動物は、少なくとも１つの標的遺伝子の変異誘発遺伝子または異なる遺伝子の対応するトランス優性遺伝子を有する。好ましくは、前記遺伝子組換え非ヒト動物はノックアウト動物である。

【０１１３】

好ましくは、前記の標的遺伝子の発現レベルや遺伝子産物の活性レベルが大幅に低下または上昇することで、遺伝子組換え細胞、組織、または非ヒト動物の表現型の反応が変化する。アゴニスト（作用物質）／アクチベーター（活性化因子）またはアンタゴニスト／インヒビターは、候補化合物が特定の濃度で前記遺伝子組換え細胞、組織、または非ヒト動物の表現型の反応を正常に戻すことができるか否かを観察することで同定する。特定の好適な実施例では、前記遺伝子組換え非ヒト動物が前記に定義されたＣＮＳおよび／または眼性疾患を示す。

【０１１４】

本発明のアッセイ法は、従来の実験室で行われる形態であるか、高処理に変更を加えることができる。前記「高処理（ｈｉｇｈ　ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ）」（ＨＴＳ）という用語は、複数のサンプルを同時に、容易に分析することができるアッセイデザインと、ロボット操作能力を指す。高処理アッセイの別の望ましい特徴は、望ましい分析を行うため、試薬の使用を減少させるか、操作回数を最小限とするために最適化されたアッセイデザインである。アッセイ形態の例としては、液体を扱う実験に用いる９６ウェル、３８４ウェル、またはこれ以上のウェルプレート、浮揚液滴、「ラボ・オン・チップ（ｌａｂ　ｏｎ　ａ　ｃｈｉｐ）」マイクロチャンネルチップなどがある。プラスチック鋳型と液体操作装置の小型化が進歩するにつれ、または改良されたアッセイ装置がデザインされるに従って、より多数のサンプルが本発明の設計を用いて実施されることは、当業者に周知である。

【０１１５】

本発明の方法に従って検査、同定される被験物質は、例えばｃＤＮＡ発現ライブラリ、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体、有機小化合物、ホルモン、ペプチドミメティックス、ＰＮＡｓ、アプタマーなどの発現ライブラリであってもよい（Ｍｉｌｎｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　１（１９９５），８７９～８８０；Ｈｕｐｐ，Ｃｅｌｌ　８３（１９９５），２３７～２４５；Ｇｉｂｂｓ，Ｃｅｌｌ　７９（１９９４），１９３～１９８、及び上記に引用された文献）。検査される前記被験物質は、「ｆａｓｔ　ｓｅｃｏｎｄｓ」と呼ばれている既知の薬物であってもよい。本発明はさらに被験細胞を第１の被験物質の存在下、第２の被験物質、または被験物質の混合物と接触させる工程にも関する。

【０１１６】

本発明の方法では、前記細胞が好ましくは容器、例えば２４、９６、３８４、または１５８６ウェルプレートのマイクロタイタープレートのウェルに含まれる。代わりに、Ｃａｌｉｐｅｒ（Ｎｅｗｔｏｎ、米国マサチューセッツ州）が提供している装置など、マイクロ流体装置に前記細胞を導入することができる。別の好適な実施例では、本発明の方法のステップ（ｂ）が、前記容器の異なる位置で２、３、４、５、７、１０回またはそれ以上の測定を行う工程を有する。本発明の方法のいくつかの実施例では、ステップ（ｂ）の前に、標的遺伝子または遺伝子産物を活性化または抑制することが知られている化合物を培地に加える。

【０１１７】

好ましくは、最初のスクリーニングに前記被験物質が含まれ、化合物の集合とする。前記の化合物の集合は約10^3～10^5の多様性とすることができる。ペプチドミメティックのコンビナトリアルライブラリを作成、使用する方法は、先行技術に報告されており、例えばＯｓｔｒｅｓｈ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　２６７（１９９６），２２０～２３４及びＤｏｒｎｅｒ，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４（１９９６），７０９～７１５などがある。動的コンビナトリアルライブラリによる新薬発見については、例えばＮａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．１（２００２），２６～３６及びＤｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．Ｔｏｄａｙ　７（２００２），１１７～１２５に報告されている。

【０１１８】

さらに、前記方法は、当然、前記のスクリーニング法または他の当該分野で周知のスク

リーニング法の１つ以上の工程と組み合わせることができる。臨床化合物の発見法は、例えば、リード化合物を同定するための高処理スクリーニング法（Ｓｕｎｄｂｅｒｇ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１１（２０００），４７－５３）、構造を基にしたドラッグデザイン（Ｖｅｒｌｉｎｄｅ ａｎｄ Ｈｏｌ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２（１９９４），５７７－５８７）、リード化合物を最適化するためのコンビナトリアルケミストリー（Ｓａｌｅｍｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ １５（１９９７），３１９－３２４）を有する。薬物を選択したら、前記方法に、修飾した薬物により合理的なドラッグデザインを行い、前記の修飾した薬物が例えば相互作用／エネルギー分析に沿ってより高い親和性を示すか否かを評価するために用いる方法を繰り返す工程を加えることができる。本発明の前記方法は、前記化合物の集合の多様性が連続的に減少するように、１回以上繰り返すことができる。好ましくは、前記標的ポリペプチドが血管形成または血管新生に関与する。

【０１１９】

上述のとおり、本発明は遺伝子活性を調節できる薬物を同定し、得るための簡便なアッセイ、好ましくは細胞をもとにしたｉｎ ｖｉｖｏアッセイを提供し、それにより（例えば）前述の疾患など、統合失語症、パーキンソン病、アルツハイマー病を含むＣＮＳ障害に関連した疾患の治療のための治療薬として効果的である。これに従うと、適切に標的遺伝子活性を調節することができることが本分野で知られているが、標的遺伝子活性またはその欠落によって誘発された生物の表現型反応に関する知識の不足により、これまで医療的な使用が示唆されなかった、化合物の使用法も示す。

【０１２０】

本発明の１つの実施例は、特に前記物質がこれまでＣＮＳまたは眼の障害の治療用薬物として知られていなかった場合、そのようなスクリーニングによって修飾因子またはその誘導体として同定された薬物またはプロドラッグの製造方法を有する。

【０１２１】

これらのｉｎ ｖｉｖｏ投与の後、排泄または代謝によって除去されるために、物質は１つ以上の活性代謝産物または不活性代謝産物に代謝される（Ｍａｙｅｒ，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔ．Ｂｉｏｐｈａｒｍ．２４（１９９６），４４９～４５９）。従って、本発明の方法に従って同定され得られた、実際の化合物または薬物を用いるよりも、プロドラッグとして対応する製剤を用いることができ、これは代謝によって患者の中で活性型に変換されるものである。プロドラッグ及び薬物の適用に対して取られる予備的手段については、前記文献に記載されている；レビューについてはＯｚａｗａ，Ｊ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ｓｃｉ．２１（１９９６），３２２～３２９を参照のこと。

【０１２２】

さらに、本発明は前記ＣＮＳ及び眼性疾患の治療用組成物を調整するため、これらの方法のいずれかによって同定、単離、生産された化合物の使用に関連する。治療法として、同定された物質またはそれを含む組成物は、そのような障害に罹患している被験者に投与することができる。上記の方法によって同定、単離、生産された化合物は、新薬発見や薬物またはプロドラッグの調整におけるリード化合物としても用いることができる。

【０１２３】

これは通常、リード化合物またはその誘導体または単離した化合物を調整することに関連し、（ｉ）修飾された作用部位、活性範囲、臓器特異性、（ｉｉ）力価の改善、（ｉｉｉ）毒性低下（治療指数の改善）、（ｉｖ）副作用の減少、（ｖ）治療作用の発生、作用持続期間の調節、（ｖｉ）薬物動態学的パラメーター（吸収、分布、代謝、排泄）の調節、（ｖｉｉ）物理化学的パラメーター（溶解性、吸湿性、色、味、匂い、安定性、状態）の調節、（ｖｉｉｉ）全身の特異性、臓器／組織特異性の改善、（ｉｘ）投与剤形と投与経路の最適化のいずれかまたはすべてを達成し、これは、（ｉ）カルボキシル基のエステル化、（ｉｉ）カルボン酸を用いた水酸基のエステル化、（ｉｉｉ）水酸基の例えばリン酸塩、ピロリン酸塩、または硫酸塩、またはヘミコハク酸塩へのエステル化、（ｉｖ）医薬品として認められた塩の形成、（ｖ）医薬品として認められた複合体の形成、（ｖｉ）

医薬品として活性なポリマーの合成、（ｖｉｉ）親水性構造の導入、（ｖｉｉｉ）芳香族または側鎖の置換基の導入／交換、置換パターンの変化、（ｉｘ）等比体積または生物学的等価性の構造を導入することによる修飾、（ｘ）相同的化合物の合成、（ｘｉ）枝分かれした側鎖の導入、（ｘｉｉ）アルキル置換基の環状類似体への変換、（ｘｉｉｉ）水酸基のケタール、アセタールへの誘導体化、（ｘｉｖ）アミド、フェニルカルバメートへのＮ－アセチル化、（ｘｖ）Ｍａｎｎｉｃｈ塩基、イミンの合成、（ｘｖｉ）ケトンまたはアルデヒドのＳｃｈｉｆｆ塩基、オキシム、アセタール、ケタール、エノールエステル、オキサゾリジン、チオゾリジン、またはその組み合わせへの変換のいずれかによる経路をとり；（ｂ）医薬品として認められた担体を用いて前記修飾の生成物を形成する。

【０１２４】

上に列挙された様々な工程は本分野において一般的に知られている。例えば、これらの技術を実行するためのコンピュータプログラムが利用でき；例えばＲｅｉｎ，Ｃｏｍｐｕｔｅｒ－Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｍｏｄｅｌｉｎｇ ｏｆ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－Ｌｉｇａｎｄ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ（Ａｌａｎ Ｌｉｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９）などがある。化学的誘導体及び類似体の調整法は当業者に周知であり、例えばＢｅｉｌｓｔｅｉｎ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ ｅｄｉｔｉｏｎ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ｉｎｃ．，１７５ Ｆｉｆｔｈ Ａｖｅｎｕｅ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１００１０ Ｕ．Ｓ．Ａ．及びＯｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＵＳＡ．に記載されている。さらにペプチドミメティックスや適切な誘導体及び類似体のコンピュータを用いた設計は、例えば上記の方法に従って利用することができる。新薬発見におけるリード化合物の生産法は、タンパク質の使用、及び質量分析計（Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１７（１９９５），８８５９～８８６０）やいくつかの核磁気共鳴（ＮＭＲ）法（Ｆｅｊｚｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．６（１９９９），７５５～７６９；Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６２（１９９７），８９３０～８９３１）などの検出方法を含む。これには定量的構造活性相関（ＱＳＡＲ）分析（Ｋｕｂｉｎｙｉ，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４１（１９９３），２５５３～２５６４，Ｋｕｂｉｎｙｉ，Ｐｈａｒｍ．Ｕｎｓｅｒｅｒ Ｚｅｉｔ ２３（１９９４），２８１～２９０）、コンビナトリアルケミストリー、古典的化学など（例えば、Ｈｏｌｚｇｒａｂｅ ａｎｄ Ｂｅｃｈｔｏｌｄ，Ｐｈａｒｍ．Ａｃｔａ Ｈｅｌｖ．７４（２０００），１４９～１５５を参照）もあり、これらに依存する。さらに、担体の例及び製剤化の方法はＲｅｍｉｎｇｔｏｎ‘ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓに見ることができる。

【０１２５】

薬物を本発明の前記方法のいずれか１つに沿って選択したら、前記薬物またはそのプロドラッグを治療有効量で合成することができる。ここで用いるとおり、前記「有効量」という用語は、意味のある患者の利益、つまり、前記ＣＮＳおよび／または眼の疾患に関連した状態の治療、治癒、予防、回復、またはそのような疾患の治療、治癒、予防、回復率の改善を示すのに十分な薬物またはプロドラッグの総量を意味する。加えてまたは代わりに、特に前記薬物の前臨床試験については、前記「治療有効量」という用語に、非ヒト動物検査で生理反応を誘発するのに十分な薬物またはプロドラッグの総量を含める。

【０１２６】

さらに、今度は前記核酸分子を、ＣＮＳまたは眼の疾患の治療に対する被験物質、リード化合物、薬物及びプロドラッグの妥当性の確認、または下流遺伝子の確認と単離に用いることができる。

【０１２７】

本発明は、固体支持体を有するチップまたはアレイに関するものでもあり、そこに１つ以上の核酸分子またはコードされた前記（ポリ）ペプチドが結合し、そのチップまたはアレイが前記の方法のいずれか１つを実行するために有用である。チップを基本とするか、他の前記核酸分子またはそれぞれのポリペプチドの発現および／または活性を検出する方法は、キットの形で提供することができ、このキットは本発明の好適な実施例を構成する

。同様に、キットは活性分子の同定、生産、スクリーニング法として開発することができる。

【０１２８】

さらに好適な実施例では、本発明が、特に前記動物がＣＮＳおよび／または眼の疾患を再現する場合に、前述した、前記方法により同定、入手した異常な発現または活性の前記標的遺伝子および／または遺伝子産物を示す、遺伝子組換え非ヒト動物に関するものである。好ましくは、前記動物が哺乳類である。

【０１２９】

本発明にも含まれる、例えば遺伝子組換えマウスなどの遺伝子組換え非ヒト動物を生産するための方法は、ポリヌクレオチドまたは前記ポリペプチドをコードした標的ベクターを、生殖細胞、胚細胞、幹細胞または卵またはそれに由来する細胞へ導入する方法を有する。前記非ヒト動物はここに記載された発明のスクリーニング方法に従って用いることができる。遺伝子組換え胚の産生及びこれらのスクリーニングは、例えばＡ．Ｌ．Ｊｏｙｎｅｒ Ｅｄ．，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９３），Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ．に記載されているように実行することができる。遺伝子組換え非ヒト動物を作成するための一般的な方法は当技術分野で報告されており、例えば国際公開番号第ＷＯ９４／２４２７４号を参照のこと。遺伝子組換え非ヒト生物体（標的非ヒト動物を相同的に含む）を作成するために、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）は好ましい。有糸分裂が不活性なＳＮＬ７６／７細胞支持細胞層（ＭｃＭａｈｏｎ ａｎｄ Ｂｒａｄｌｅｙ，Ｃｅｌｌ ６２：１０７３～１０８５（１９９０））上に培養されたＡＢ－１系統などのマウスＥＳ細胞は、報告されているとおり（Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ，Ｅ．Ｊ．（１９８７） ｉｎ Ｔｅｒａｔｏｃａｒｃｉｎｏｍａｓ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ．Ｅ．Ｊ．Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ，ｅｄ．（Ｏｘｆｏｒｄ：ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ），ｐ．７１～１１２）、基本的に相同的遺伝子ターゲティングに対して用いることができる。他の適切なＥＳ株は、限定されるものではないが、Ｅ１４株（Ｈｏｏｐｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２６：２９２～２９５（１９８７））、Ｄ３株（Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｍｂｒｙｏｌ．Ｅｘｐ．Ｍｏｒｐｈ．８７：２７～４５（１９８５））、ＣＣＥ株（Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３２３：４４５～４４８（１９８６））、ＡＫ－７株（Ｚｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ７７：８７５～８８４（１９９４））などがある。特異的標的変異を有するＥＳ細胞からマウス系列の作成に成功するか否かは、ＥＳ細胞の多分化能（すなわち、胚盤胞または桑実胚など、胚が発達している宿主に注入された場合、胚発生に関与し、その結果生まれる動物の生殖細胞に寄与する能力）に依存する。注入されたＥＳ細胞を含む前記胚盤胞は、偽妊娠の非ヒト雌の子宮内で発達してもよく、キメラマウスとして生まれる。その結果得られた遺伝子組換えマウスは、リコンビナーゼまたはレポーター遺伝子座を有する細胞がキメラであり、リコンビナーゼまたはレポーター遺伝子座について遺伝子組換えマウスがヘテロ接合性かを同定するために、子孫のＤＮＡ尾生検のＰＣＲまたはサザンブロット分析によって、正しい標的導入遺伝子があるか否かをスクリーニングする。

【０１３０】

キイロショウジョウバエなどの遺伝子組換えハエを作成する方法は、当該分野でも報告されており、例えば米国特許公開第ＵＳ－Ａ－４，６７０，３８８号，Ｂｒａｎｄ ＆ Ｐｅｒｒｉｍｏｎ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（１９９３） １１８：４０１～４１５；及びＰｈｅｌｐｓ ＆ Ｂｒａｎｄ，Ｍｅｔｈｏｄｓ（Ａｐｒｉｌ １９９８） １４：３６７～３７９などがある。線虫などの遺伝子組換え虫は、Ｍｅｌｌｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｍｂｏ Ｊ．１０（１９９１），３９５９～３９７０，Ｐｌａｓｔｅｒｋ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ４８（１９９５），５９～８０に報告されているとおり、作成することができる。

【０１３１】

好ましくは、遺伝子組換え非ヒト動物が、ＣＮＳおよび／または眼性疾患に関与する、

対応する遺伝子の活性化または抑制された野生型遺伝子を少なくとも１つ有する；上記を参照。この実施例では、例えば、臨床症状の発症に対する、これらの遺伝子または遺伝子産物の様々な変異体の相互作用を研究することができ、および／または研究する疾患で前記遺伝子の関与を確認するために用いることができる。遺伝子組換え動物について、これまでに本明細書で考察したすべての応用は、２つ、３つ、またはそれ以上の導入遺伝子を持った動物にも当てはまる。発生の特定の工程および／または遺伝子組換え動物の一生で、標的遺伝子の発現または機能を不活性化することも望ましいかもしれない。これは例えば、組織特異的（上記参照）、発達調節性、細胞調節性、誘導性プロモーターのすべてまたはいずれか１つなどを用いて達成することができ、このプロモーターは、例えば前記標的遺伝子ｍＲＮＡをコードするＲＮＡ転写物に対するアンチセンスまたはリボザイムの発現を促進する；上記も参照のこと。適切な誘導性システムは、例えばＧｏｓｓｅｎ ａｎｄ Ｂｕｊａｒｄ（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８９ ＵＳＡ（１９９２），５５４７～５５５１）、及びＧｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（ＴｒｅｎｄｓＢｉｏｔｅｃｈ １２（１９９４），５８～６２）に報告されるような、テトラサイクリンにより調節される遺伝子発現である。同様に、標的変異遺伝子の発現はそのような制御要素によって制御されることもある。好ましくは、遺伝子組換え動物の細胞中に導入遺伝子があると、好ましくは上記に記載されたようなＣＮＳおよび／または眼の障害に関連した状態に対して、様々な生理的、発達上、形態学的な変化のすべてまたはいずれかを導く。

【０１３２】

別の実施例では、前記遺伝子組換え非ヒト動物を、ＣＮＳおよび／または眼の障害を治療するための薬物を発見する過程に用いる。特に、哺乳類動物、特にマウスやラットが好ましい。本発明に従って適応することができる対応する動物システムは当業者に知られており；例えばＳｈｉｂａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２２（２００２），３３７～３４９に報告された、ノックアウト及び遺伝子組換えマウスモデルを含む、神経学的障害に対する分子生物学的アプローチを参照のこと。ただし、このモデル系は有益な予測結果を出すことが示されているため、広く用いられているゼブラフィッシュも利用できる；Ｇｅｒｌａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｅｈａｖ．６７（２０００），７７３～７８２を参照のこと。

【０１３３】

本発明の好適な実施例では、前記ＣＮＳおよび／または眼性疾患の治療に用いる医薬品が、１つ以上の二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）を有し（上記を参照）、前記疾患に関連することが示された、１つ以上の核酸分子の対応するｍＲＮＡのＲＮＡ干渉と、任意に医薬品として認められた担体を媒介する。二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）による遺伝子の特異的な阻害法は国際公開番号第ＷＯ０１／７５１６４号に知られている。この明細書の開示は本説明により盛り込まれている。

【０１３４】

この出願書類は、二本鎖オリゴリボヌクレオチド（ｄｓＲＮＡ）が標的細胞へ送達された後、ｍＲＮＡの特異的な分解を誘導することについて記載している。この過程の特異性は、前記標的遺伝子のｍＲＮＡに対する２つのｄｓＲＮＡ鎖の１つの相補性が介している。

【０１３５】

ｄｓＲＮＡ分子による遺伝子の遺伝子特異的、転写後スイッチオフの過程は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）と呼ばれる。この用語は、初めにＦｉｒｅらが、線虫Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ ｅｌｅｇａｎｓへのｄｓＲＮＡ分子の送達により観察される、遺伝子発現の遮断を説明するために開発された（Ｆｉｒｅ ｅｔ ａｌ．，１９９９）。その後、ＲＮＡｉは植物、原生動物、昆虫（Ｋａｓｓｃｈａｕ ａｎｄ Ｃａｒｒｉｎｇｔｏｎ １９９８）、及び最近では哺乳類細胞（Ｃａｐｌｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｅｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，２００１）においても証明することができた。ＲＮＡｉによる遺伝子発現抑制メカニズムはまだ完全に理解されていない。非哺乳類細胞の研究により、ｄｓＲＮＡ分子は内因性リボヌクレアーゼによって低分子干渉ＲＮＡ分子（ｓｉＲＮＡ分子

）に形質転換されることが示された（Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｇｒｉｓｈｏｋ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｈａｍｉｌｔｏｎ ａｎｄ Ｂａｕｌｃｏｍｂｅ，１９９９；Ｋｎｉｇｈｔ ａｎｄ Ｂａｓｓ，２００１；Ｚａｍｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，２０００）。

【０１３６】

望ましくは、二本鎖配座にある二本鎖ＲＮＡ領域に、少なくとも５、１０、２０、３０、５０、７５、１００、または２００ヌクレオチドが含まれる。好ましくは、二本鎖領域に１５～３０ヌクレオチド、最も好ましくは２０～２５、特に好ましくは２１～２３ヌクレオチドが含まれ、標的遺伝子を特異的に阻害するため、二本鎖オリゴリボヌクレオチドが標的遺伝子と同一の２１～２３ヌクレオチド（塩基対）長の配列を示すことで十分である；例えばＥｌｂａｓｈｉｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ２６（２００２），１９９～２１３及びＭａｒｔｉｎｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １１０（２００２），５６３～５７４を参照。ｄｓＲＮＡ、ベクター、選択可能なマーカー、組成物、検出法などの定義、調整法など、転写後の遺伝子サイレンシングを利用することで、細胞機能を調節する核酸配列を同定する細胞アッセイの一般的な手段と方法で、本発明の教示に従って適応可能な手段と方法は、欧州特許出願書類ＥＰ １ ２２９ １３４ Ａ２に記載され、その開示内容はここで参考文献として盛り込まれている。

【０１３７】

細胞培養に対してのみ記載されている、ｓｉＲＮＡ及び他のＲＮＡを基本とした分子を使用している引用文献とは対照的に、本発明に従って実行された実験は、驚いたことに、長さ２１～２３ヌクレオチドのｄｓＲＮＡ分子が、例えば静脈注射などの全身適用後、血液網膜関門を通過し、眼底の組織中の標的遺伝子を特異的に不活性にする能力があるということを示している。これまで、ｄｓＲＮＡによって血液網膜関門を克服することを示すことができた実験はなかったため、この関門を克服することはなおさら注目に値する。従って、実施例の手段によって以下に説明されている本発明の方法及び使用は、動物モデルの提供に適しており、この動物モデルにより、標的、つまり眼の疾患を引き起こす制限された機能を同定、確認することができる。これらの方法は、例えば影響を受ける細胞または組織の部位に直接適用する必要がない、分子レベルでのＣＮＳ及び眼性疾患の特異的干渉にさらに適している。標的細胞中に特異的に発現した遺伝子を阻害するために好ましいＲＮＡｉなどの選択的インヒビターの特異性は、望ましくない副作用のリスクを最小限とする。

【０１３８】

上記の本発明の方法及び使用のすべてにおける医薬品の投与法は、主治医の判断、及び臨床的要因によって決定される。医学分野で周知のように、患者一人一人に対する用量は多くの要因に依存しており、この要因としては患者のサイズ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間及び経路、全身の健康、及び併用投与される他の薬物などがある。典型的な用量は、例えば０．００１μｇ～１０ｍｇの範囲内（またはこの範囲内で発現させるか発現を阻害する核酸の範囲内）であるが；特に前記要因を考慮すれば、この典型的な範囲以下または以上の用量も想定される。一般的に、前記医薬品の標準投与としての前記投与法は、１日当たり０．０１μｇ～１０ｍｇ単位の範囲内とする必要がある。前記投与法が連続的な注入の場合は、特に１分当たり０．０１μｇ～１０ｍｇ単位／ｋｇ体重の範囲内とする必要がある。経過は定期的な評価によってモニターすることができる。用量は変わるが、核酸の静脈内投与に好ましい用量は、約10^{6}～10^{12}コピーの核酸分子である。

【０１３９】

本発明の治療用または診断用の組成物は、標的遺伝子または遺伝子産物の調節が適応となる障害を治療または診断するのに十分である、効果的な用量で患者に投与される。前記の効果的な量は、例えば患者の状態、体重、性別、及び年齢などの様々な要因に従って変化することがある。他の要因としては投与形態を含む。前記医薬品は、冠内、腹腔内、皮下、静脈内、経皮、滑膜内、筋肉内、または経口経路など、様々な経路で患者に投与され

る。さらに、他の薬物の同時投与または経時的な投与も望ましい。

【０１４０】

治療有効量とは、前記症状または状態を回復させるために必要な、本発明に従って記載された化合物の量を指す。そのような化合物の治療効果及び毒性は、細胞培養または実験動物中で標準的な薬理学的処置、例えばＥＤ５０（集団の５０％で治療に有効な用量）及びＬＤ５０（集団の５０％に対して致死的な用量）によって決定することができる。治療効果と毒性効果の用量比が前記の治療指標であり、比ＬＤ５０／ＥＤ５０として表される。

【０１４１】

これらの実施例は、本発明の説明と例によって開示され、含まれる。さらに本発明に従って利用される前記物質、方法、使用法、化合物のいずれか１つに関する文献は、電子装置などを利用し、公共の図書館及びデータベースで検索することができる。例えば公共のデータベース「Ｍｅｄｌｉｎｅ」を用いることもでき、これは国立衛生研究所の全米バイオテクノロジー情報センターや米国立医学図書館が主催している。ヨーロッパ分子生物学研究所（ＥＭＢＬ）の一部である欧州バイオインフォマティクス研究所（ＥＢＩ）など、他のデータベース及びウェブアドレスは当業者に周知であり、インターネットの検索エンジンを用いて入手することができる。さかのぼり検索やカレント・アウェアネスに役立つ、バイオテクノロジーの特許情報の概要や、特許情報の関連情報源の調査は、Ｂｅｒｋｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ １２（１９９４），３５２～３６４に記載されている。

【０１４２】

前記開示は、全般的に本発明について述べている。説明の目的のみでここに提供され、本発明の範囲を制限する意図はない、以下の特定の例と図を参照することで、より完全な理解が得られる。（参考文献、発行された特許、本出願書類で引用された既発表特許出願書類、製造業者の仕様書、使用説明書など）すべての引用された参考文献の内容は、参照によって明示的にここに取り込まれるが；これら文書が実際に本発明の先行技術であるということを承認するものではない。

【０１４３】

本発明の方法では、他に明記していない限り、当該分野の技術の範囲内にある、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換え型ＤＮＡ、免疫学を利用する。そのような技術は文献に十分説明されており；例えば、ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ ａｎｄ ＩＩ（Ｄ．Ｎ．Ｇｌｏｖｅｒ ｅｄ．，１９８５）；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ ｅｄ．，１９８４）；Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，６８３，１９５；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ（Ｂ．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）；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（１９８４）；ｔｈｅ ｔｒｅａｔｉｓｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ Ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｈ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ．，１９８７，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｓ．１５４ ａｎｄ １５５（Ｗｕ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．），Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｃｅｌｌ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｍａｙｅｒ ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ，ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，１９８７）；Ｈａｎｄｂｏｏｋ Ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ－ＩＶ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ｂｌ

ａｃｋｗｅｌｌ，ｅｄｓ．，１９８６）を参照のこと。

【０１４４】

ベクター及びプラスミドの構築、そのようなベクター及びプラスミドへのポリペプチドをコードする遺伝子の挿入、宿主細胞へのプラスミドの導入、その遺伝子及び遺伝子産物の発現と定量法に利用される方法など、従来の方法の詳細については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓなど、多数の文献で知ることができる。

【実施例】

【０１４５】

例１ 一次ブタ網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）の単離。

以下の例では、典型的な一次ブタＲＰＥ細胞の単離について説明し、これは滅菌条件下で行われる。ブタ、ヒト、ウシからのＲＰＥ細胞の単離は、原則的に同じである。

【０１４６】

ブタの眼は地元の屠殺場から入手した。残りの眼筋から前記眼を単離した後、ペニシリン（１００ Ｕ／ｍｌ）とストレプトマイシン（１００ μｇ／ｍｌ）を含む、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水（１ｘＰＢＳ：１．１５ｇ／ｌ Na_2HPO_4、０．２０ｇ／ｌ KH_2PO_4 ｘ H_2O、８．００ｇ／ｌ ＮａＣｌ、０．２０ｇ／ｌ ＫＣｌ、０．１０ｇ／ｌ $MgCl_2$、０．１０ｇ／ｌ $CaCl_2$）で１回洗浄した。前記眼を鋸状縁の周囲でスライスし、接眼レンズと硝子体を除去した。視神経を切除後、前記アイカップから前記網膜を連結部で慎重に剥離し、取り除いた。前記網膜は、例２で説明するとおり、桿体外節の単離に用いた。残りのアイカップを１ｍｌ １ｘＰＢＳで満たし、その細胞を洗浄した。前記溶液は廃棄し、前記細胞を１～１．５ｍｌのトリプシン／ＥＤＴＡ溶液（０．２５％／０．０２％）中、３７℃で１５分間インキュベーターとした。前記溶液を廃棄し、前記カップを３７℃、１時間、再度１ｍｌのトリプシン／ＥＤＴＡ溶液で満たした。ピペットで上下に取ることで慎重にＲＰＥ細胞を除き、６個の眼の細胞を細胞培養液２０ｍｌ（ＤＭＥＭ Ｆ１２（Ｂｉｏ Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ）と、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）、ペニシリン（１００ Ｕ／ｍｌ）、ストレプトマイシン（１００ μｇ／ｍｌ）、２ｍＭグルタミン、１．５ｇ／ｍｌ炭酸水素ナトリウム）で希釈した。前記細胞を室温、１２０×ｇで５分間遠心分離し、細胞培養液で２回洗浄した。Ｔ２５細胞培養フラスコ１個につき、網膜３つ分の細胞を培養した。壊死細胞片を取り除くため、翌日、前記細胞を１ｘＰＢＳで洗浄した。約１週間、ＲＰＥ細胞を１０％ ＦＣＳを含む細胞培地で培養した。細胞が飽和密度（ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｙ）に達したら、培地を２％ ＦＣＳを含む培地と交換した。さらに１週間インキュベーションした後、前記細胞を１：２の比で細胞培養皿に分け、次の実験に用いる。

【０１４７】

例２ ブタの眼からの桿体外節（ＲＯＳ）の単離。

前記ＲＯＳの単離は滅菌条件下で行った。ＲＰＥ細胞の調整（例１を参照）で単離した３０個の網膜は、氷冷した１５ｍｌのホモジナイズ用緩衝液（２０％（ｗ／ｖ）スクロース、２０ｍＭトリスアセテートｐＨ７．２、２ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭグルコースを含む）に移した。前記懸濁液を１分間優しく振盪し、平織りの薄い綿布で３回ろ過し、組織フラグメントを除去し、２０ｍＭトリスアセテートｐＨ７．２、１０ｍＭグルコースを含む、２５～６０％ｗ／ｖで連続的に濃度を勾配させたスクロース２４ｍｌ上で層にする。Ｂｅｃｋｍａｎ ＳＷ－２７ローターで２４，０００ｒｐｍ、１時間、４℃で遠心分離を行った。勾配上部の白黄色のバンドを集め、同量の１０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ緩衝液ｐＨ７．４、１１５ｍＭ ＮａＣｌ、２．５ｍＭ ＫＣｌ、１ｍＭ ＤＴＴ、１ｍＭ $MgCl_2$で注意しながら希釈し、Ｓｉｇｍａ ４Ｋ１５遠心機、２９８９ｘｇ、４℃で１０分間遠心分離した。前記の上澄みを慎重に取り除き、前記ＲＯＳのペレットをさらに使用するため、－２０℃で保存した。１つの網膜から約$1x10^7$個のＲＯＳが単離された。

【０１４８】

例３（生理学的濃度の）ＲＯＳを用いた一次ブタＲＰＥ細胞のインキュベーション。

ＲＯＳを用いたブタ、ヒト及びウシのＲＰＥ細胞のインキュベーションは原則的に同様であるため、以下の例ではブタの眼から単離したＲＰＥ細胞のインキュベーションについて述べている（例２を参照）。

【０１４９】

－２０℃で保存したＲＯＳのペレットを徐々に室温に昇温した。一次ＲＰＥ細胞の数によって、細胞１個あたり１０～１００個のＲＯＳをＲＯＳ懸濁液から取り出した。インキュベーション中、細胞培養液は毎日取り替え、新たなＲＯＳを加えた。

【０１５０】

ＲＰＥ細胞によるＲＯＳの食作用は２つのアプローチで同時に制御した。アプローチ１は、二波長蛍光染色ＳＮＡＦＬ－２（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、オランダ、ライデン）を用いて共有結合により標識したＲＯＳを検出する方法を有する。前記の酸型（ｐＨ ５）は緑黄色に見えるが、アルカリ型（ｐＨ ９）は黄橙色に見える。ＳＮＡＦＬ－２（１μｌのジメチルホルムイミド中ＳＮＡＦＬ－２ １０μｇ）を加え、スクロース緩衝液１００μｌ（２０％スクロース、２ｍＭ ＭｇＣｌ２、１０ｍＭグルコース、２０ｍＭトリスアセテートｐＨ ８．０）に単離したＲＯＳを加え、前記ＲＯＳを暗所でゆっくりと撹拌しながら、１時間室温で標識した。前記の標識したＲＯＳを、同量のｈｅｐｅｓ緩衝液ｐＨ ８．０で希釈し、Ｈｅｒａｅｕｓ Ｂｉｏｆｕｇｅ ｐｉｃｏ中、５分間２０００ｒｐｍで遠心沈降させ、１００μｌの前記ｈｅｐｅｓ緩衝液ｐＨ ８．０で２回洗浄した。前記の標識したＲＯＳを細胞培地に再懸濁し、前記細胞に加えた。４～８時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、蛍光顕微鏡用に細胞培地ｐＨ ９．０を加えた。アプローチ２では、ＲＯＳ処理細胞を１ｘＰＢＳ（Ca^{2+}及びMg^{2+}を含む）中で洗い、内部ＲＯＳの自己蛍光活性を蛍光顕微鏡で分析した。

【０１５１】

例４ 特定の標的遺伝子の転写後遺伝子スライシング（ＰＴＧＳ）。

以下の例では、異なる生物（つまりブタ、ヒト、ウシ）から単離した一次細胞または細胞株（つまりＡＲＰＥ－１９）における、特定の標的遺伝子（成長因子）ＸのＰＴＧＳについて述べる。

【０１５２】

ｄｓＲＮＡの同一性、その濃度、適当な形質移入試薬について実験条件を最適化した後、業者（特にＰｒｏｌｉｇｏ）が合成するか、市販のキット（特にＳｉｌｅｎｃｅｒ^{TM} ｓｉＲＮＡ Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ，Ａｍｂｉｏｎ）を用いて対応するオリゴヌクレオチドから合成した、標的遺伝子のｍＲＮＡの異なる部位に相同的な、３（～５）個のｄｓＲＮＡを用いてＰＴＧＳを行った。１ｎｇから１００μｇの各ｓｉＲＮＡを、市販の遺伝子移入試薬（特にＧｅｎｅ Ｅｒａｓｅｒ／Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｔｒａｎｓｍｅｓｓｅｎｇｅｒ／Ｑｉａｇｅｎ，Ｏｌｉｇｏｆｅｃｔａｍｉｎ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により、細胞に導入した。

【０１５３】

形質移入後５日間まで、細胞をリアルタイムＰＣＲにより、ｍＲＮＡ発現プロフィールの分析用に採取し、形質移入後１週間まで、細胞をウェスタンブロット分析またはＥＬＩＳＡによるタンパク質発現の分析用に採取した。

【０１５４】

例５ Ａ２－Ｅの合成と精製。

Ｐａｒｉｓｈ ｅｔ ａｌ．（１９９８）（Ｐａｒｉｓｈ ＣＡ，Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ Ｍ，Ｎａｋａｎｉｓｈｉ Ｋ，Ｄｉｌｌｏｎ Ｊ，Ｓｐａｒｒｏｗ Ｊ．：「Ａ２Ｅ及びイソ型Ａ２Ｅの単離と１工程での調整、ヒト網膜色素上皮のフルオロフォア」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９８ Ｄｅｃ ８；９５（２５）：１４６０９－１３）に報告されているとおり、Ａ２－Ｅはすべてトランス型のレチナールとエタノールアミンから合成し、Ｅｌｄｒｅｄ及びＫａｔｚ（１９８８）（Ｅｌｄｒｅｄ ＧＥ，Ｋａｔｚ ＭＬ．：「ヒト網膜色素上皮のフルオロフォア：分離とスペクトル特性

」Ｅｘｐ Ｅｙｅ Ｒｅｓ．１９８８ Ｊｕｌ；４７（１）：７１～８６）の一次展開系を用いたシリカゲル６０薄層クロマトグラフィープレートでクロマトグラフィーにより精製した。５０～１５０ｍｇのレチナールを１．５～５．５ｍｌのエタノールに溶解した。５～１５μｌのエタノールアミンを加えて撹拌した。撹拌しながら５～１５μｌの酢酸をゆっくりと加えた。前記混合物をアルミニウムホイルで包み、２日間室温で撹拌した。前記反応混合物を４つのエッペンドルフ試験管に４回分配し、ｓｐｅｅｄｖａｃで一晩濃縮乾固した。２つのエッペンドルフ反応試験管の内容物を、合計２００～６００μｌの「一次展開系」（１４．５ｍｌヘプタン、８．８ｍｌヘキサン、９．８ｍｌクロロホルム、３ｍｌエーテル、３ｍｌアセトン、１４．８ｍｌイソプロパノール、２７ｍｌエタノール、２．５ｍｌメタノール、０．４ｍｌ酢酸、７，４ｍｌ H_2O）に溶解した。次に、この溶液をそれぞれ２０～６０μｌずつ含む５～１５等分を、約２時間、前記「一次展開系」で展開したシリカクロマトグラフィープレートで展開した。３６６ｎｍの光で照射した蛍光により、プレートのＡ２－Ｅを検出した。Ａ２－Ｅを含むシリカをかき取り（Ａ２－Ｅ：上のスポット；イソ型Ａ２－Ｅ：下のスポット）、ボルテックスしながらクロロホルム／メタノール／水で２～３回溶出した。上澄みを合わせ、数時間ｓｐｅｅｄｖａｃで乾燥した。前記の乾燥した物質を２００～６００μｌの「一次展開系」に入れ、再度クロマトグラフィーを行った。前記の抽出と乾燥も繰り返し行った。前記の乾燥した物質を約１ｍｌのMe_2SOまたはエタノールのＡ２－Ｅ保存溶液としてとり、暗所、－２０℃で保存した。Me_2SOまたはエタノールに希釈したすべてのＡ２－Ｅを３６，９００のモル吸光係数、４３９ｎｍで定量した（Ｐａｒｉｓｈ ＣＡ，Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ Ｍ，Ｎａｋａｎｉｓｈｉ Ｋ，Ｄｉｌｌｏｎ Ｊ，Ｓｐａｒｒｏｗ Ｊ．：「Ａ２Ｅ及びイソ型Ａ２Ｅの単離と１工程での調整、ヒト網膜色素上皮のフルオロフォア」Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９８ Ｄｅｃ ８；９５（２５）：１４６０９～１３）。

【０１５５】

例６ Ａ２－Ｅを用いたＲＰＥ細胞のインキュベーションとＡ２－Ｅ蓄積の分析。

１～１００μＭ Ａ２－Ｅ及び０．５％ Me_2SOまたはエタノール濃度まで、Ａ２－Ｅを前記ＲＰＥ細胞培地に希釈した。アポトーシス以下の（ｓｕｂ－ａｐｏｐｔｏｃｉｃａｌ）Ａ２Ｅ濃度を見出すため、ネガティブコントロールとしてＡ２－Ｅがない状態で０．５％Me_2SOまたはエタノールを用い、アポトーシスのコントロールとして１～２００μＭのスタウロスポリンを用い、コントロールインキュベーションを行った。５％CO_2を用い、３７℃、暗所で（アルミホルイルで包んで）１日１回２４～１４４時間インキュベーションを行った。光源の下に細胞を置き、３９０～５５０ｎｍで１４４時間まで様々な時間、光に照射することができる。培地のみで対照実験も行った。ＲＰＥ集団あたりの自己蛍光の平均値を決定するため、蛍光顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ；励起波長４５０～４９０ｎｍ、発光波長>５１０ｎｍ）及びＳａｆｉｒｅ（Ｔｅｃａｎ；励起波長４５６ｎｍ、発光波長６１０ｎｍ）を用い、栄養補給後の様々な時間で細胞内蛍光を評価した。

【０１５６】

例７ アポトーシスアッセイ。

以下の例では、Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ＥＬＩＳＡ Ｐｌｕｓ（Ｒｏｃｈｅ）を用いたアポトーシスの誘導分析について述べる（Ｗｙｌｌｉｅ ＡＨ，Ｋｅｒｒ ＪＦ，Ｃｕｒｒｉｅ ＡＲ．：「細胞死：アポトーシスの重要性」Ｉｎｔ Ｒｅｖ Ｃｙｔｏｌ．１９８０；６８：２５１～３０６．Ｒｅｖｉｅｗ）。マウスモノクローナル抗体を用いた定量的サンドイッチ酵素免疫測定法の原則に基づいたアッセイは、それぞれＤＮＡ及びヒストンに対して行った。これにより、アポトーシスにより死亡した細胞の細胞質に放出される、モノヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを特異的に定量することができる。前記サンプル（細胞可溶化物、血清、培養の上澄みなど）を、ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロプレートに入れた。続いて、抗ヒストン－ビオチン及び抗ＤＮＡ－ＰＯＤの混合物を加え、２時間インキュベートした。インキュベーション中、前記抗ヒストン抗体はヌクレオソームのヒストン成分に結合し、同時に、ビオチン化

によりストレプトアビジンでコートされたマイクロプレートに前記免疫複合体を固定する。さらに、前記抗－ＤＮＡ－ＰＯＤ抗体はヌクレオソームのＤＮＡ成分と反応する。洗浄工程により結合していない抗体を除去した後、免疫複合体にある前記ＰＯＤにより、ヌクレオソームの量を定量した。ＰＯＤは基質としてＡＢＴＳ（２，２’－アジノ－ジ［３－エチル－ベンズ－チアゾリン－スルホナート］）を用い、光度測定により決定した。

【０１５７】

例８　低酸素症の誘導。

ｖｏｌ（正常酸素（ｎｏｒｍｏｘｉｃ）条件）により、飽和密度（１００％　ｃｏｎｆｌｕｅｎｃｅ）（約10^7細胞／１００ｍｍプレート）まで、３７℃、空気９５％、$CO_2$５％に維持したインキュベーター（Ｈｅｒａｃｅｌｌ，Ｋｅｎｄｒｏ）で、ＲＰＥ細胞をインキュベートした。次に１時間～７日間、３７℃でO_2レベルを０～８％、５％　CO_2、９５～８７％　N_2（N_2を平衡状態）で維持した自動CO_2／O_2インキュベーター（Ｂ　５０６１　ＥＣ／O_2，Ｋｅｎｄｒｏ）に細胞を置き、細胞を低酸素状態とした。誘導されていない細胞は正常酸素条件のままとした。培地のPO_2及びPCO_2は血液ガス分析装置（Ｃｏｒｎｉｎｇモデル１７８）で測定した。正常酸素値は、ｐＨ＝７．２＋／－０．１、PO_2＝３９．３＋／－０．６ｍｍＨｇ、及びPCO_2＝１３１．５＋／－０．９ｍｍＨｇであった。低酸素値は、ｐＨ＝７．２＋／－０．１、PO_2＝７～３５＋／－１．１ｍｍＨｇ、PCO_2＝１４．９＋／－１．２ｍｍＨｇであった（Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５；Ｐａｌｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）（Ｌｉｕ　Ｙ，Ｃｏｘ　ＳＲ，Ｍｏｒｉｔａ　Ｔ，Ｋｏｕｒｅｍｂａｎａｓ　Ｓ．：「低酸素症は内皮細胞の血管内皮成長因子の遺伝子発現を制御する。５’エンハンサーの同定」Ｃｉｒｃ　Ｒｅｓ．１９９５　Ｓｅｐ；７７（３）：６３８～４３；Ｐａｌｍｅｒ　ＬＡ，Ｓｅｍｅｎｚａ　ＧＬ，Ｓｔｏｌｅｒ　ＭＨ，Ｊｏｈｎｓ　ＲＡ．：「低酸素症はＨＩＦ－１を介して肺の動脈内皮細胞のＩＩ型ＮＯＳ遺伝子発現を誘導する」Ａｍ　Ｊ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９８　Ｆｅｂ；２７４（２　Ｐｔ　１）：Ｌ２１２～９）。

【０１５８】

例９　必須要素の制限。

以下の例では、必須要素を欠乏させることでＲＰＥ細胞にストレスを誘導するための、調整ＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ　ｍｅｄｉｕｍ）（高グルコース、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）でのＲＰＥ細胞の培養について述べる。正常なＲＰＥ細胞培地において、３７℃で５％　CO_2を含む加湿した大気中、２％の熱により不活化したウシ胎仔血清（Ｒｏｃｈｅ）、１００単位／ｍｌのペニシリン、１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、１×非必須アミノ酸、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウム（すべてＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を補充した、調整ＤＭＥＭ（高グルコース、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）で前記細胞を培養させる。正常な細胞培地には様々な無機塩が含まれ、ビタミン、アミノ酸、グルコース、ヌクレオチド、その他多数の物質が加えられている。ウシ胎仔血清など、ほとんどの細胞が血清を培養するために必要である。前記血清は、タンパク質、ホルモン、成長因子、中間産物を補充する。これらの必須要素を制限するため、細胞を血清を含まない培地で培養した、さらに、調整ＤＭＥＭを用いた。前記培地には無機塩（例えばＫＣｌ、ＮａＣｌ）、アミノ酸（例えばＬ－グルタミン、Ｌ－プロリン）、ビタミン（例えばビオチン、リボフラビン、葉酸）または他の物質（例えばグルコース、リポ酸（ｌｉｐｏｎ　ａｃｉｄ）、ヌクレオチド）を入れなかった。

【０１５９】

例１０　代謝性アシドーシスの誘導。

以下の例では、ｐＨ値を変化させることで、培養したＲＰＥ細胞の代謝性アシドーシス（ｐＨ<７．２＋／－０．１）を誘導させる方法について述べる。ｉｎ　ｖｉｖｏと同様、哺乳類細胞培養にはｐＨ７．２～７．４の最適条件のｐＨが必要である。培養した細胞は乳酸を産生するため、ｐＨ値を低下させる。培地のｐＨ値は血液ガス分析装置（Ｃｏｒｎｉｎｇモデル１７８）で測定した。代謝性アシドーシスを誘導するため、２つの方法、

つまり培地の漏出したHCO_3^-とともに（５％から０％に）CO_2圧を変化させる方法（Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９８）（Ｐａｌｍｅｒ ＬＡ，Ｓｅｍｅｎｚａ ＧＬ，Ｓｔｏｌｅｒ ＭＨ，Ｊｏｈｎｓ ＲＡ．：「低酸素症はＨＩＦ－１を介して肺の動脈内皮細胞のＩＩ型ＮＯＳ遺伝子発現を誘導する」Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９８ Ｆｅｂ；２７４（２ Ｐｔ １）：Ｌ２１２～９）と、２０ ｍＭ Ｈｅｐｅｓ緩衝液を含む調節ＤＭＥＭを利用する方法を用いた。Ｈｅｐｅｓで緩衝とした培地は３７℃、５％CO_2を含む加湿した大気中で酸性となるため、Ｈｅｐｅｓ緩衝培地は細胞のｐＨストレスに利用することができる。

【０１６０】

例１１ 培養した一次ＲＰＥ細胞のＲＮＡ調整。

一次ＲＰＥ細胞から調整したＲＮＡを開始物質とし、リアルタイムＰＣＲ及びＤＮＡマイクロアレイの発現分析を行った。ストレスの提示後（低酸素培養条件、栄養、成長因子の欠乏、またはｐＨ変化など）、ＲＰＥ細胞を細胞の溶解前にＰＢＳで１回洗浄した。約$1x10^6$個の細胞（例えば細胞培養プレート６ウェル中１ウェル）を、プレートを軽く振盪させ、ＲＬＴ緩衝液（Ｑｉａｇｅｎ ＧｅｒｍａｎｙのＲｎｅａｓｙミニキット）を含む８００μｌのβ－メルカプトエタノールで溶解した。可溶化液をすぐに－８０℃に凍結した。３７℃で１５分間解凍後、製造業者（Ｒｎｅａｓｙミニキット、Ｑｉａｇｅｎ）のプロトコールに従い、可溶化物を処理して全ＲＮＡを単離した。（$1x10^6$細胞ごとの）１カラムの充填材のＲＮＡを、適当量（１０～１００μｌ）のＲＮアーゼを含まない水で溶出した。全く同様に培養した細胞のＲＮＡをプールし、１つの培養条件から均一なＲＮＡを生産した。

【０１６１】

例１２ ゲノムＤＮＡが混入した場合のＤＮアーゼＩによる消化。

その後ＲＮＡを分析するためには、ゲノムＤＮＡの混入を取り除くため、注意が必要である。従って、ＤＮＡポリメラーゼＩ（ＲＮアーゼを含まないＤＮアーゼＩ）を用いた酵素制限により、ゲノムＤＮＡの消化を行った。要するに、１００μｌの反応用量には、５０μｇまでのＲＮＡと、２０μｌの２５ｍＭ $MgSO_4$（最終濃度５ｍＭ）、３．４μｌ ３Ｍ ＮａＡｃ ｐＨ ４．７（最終濃度１００ｍＭ）、及び２０Ｕ ＤＮアーゼＩ（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓなどの１０Ｕ／μｌストック２μｌ）を一緒に含めた。３７℃で１時間消化を行った。その後、供給者の指針に従ってＲｎｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ）を利用し、再度ＤＮアーゼと制限したＤＮＡ断片からＲＮＡを精製した。

【０１６２】

例１３ リアルタイムＰＣＲによる発現分析を行うためのｃＤＮＡ合成。

リアルタイムＰＣＲ及びマイクロアレイ技術により発現分析を行うため、全ＲＮＡからｃＤＮＡを合成することが必要である。異なる培養条件に由来するｍＲＮＡの遺伝子発現を比較できるようにするため、１μｌのオリゴ－ｄＴ－プライマー（５００μｇ／ｍｌ、Ｑｉａｇｅｎ－Ｏｐｅｒｏｎ、＃ ５５０００１４２）、ブタＲＰＥ細胞のＲＮＡ２μｇ、１μｌの１０ ｍＭ ｄＮＴＰ－ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、及びＲＮアーゼを含まない水（Ｑｉａｇｅｎ）、合計１２μｌまでにより、同量の総ＲＮＡ（ここでは、例えば異なるＲＮＡにつき２μｇ）をｃＤＮＡに逆転写した。前記混合物を６５℃で５分インキュベートした後、２分氷冷した。短時間遠心分離を行った後、４μｌ ５ｘ Ｆｉｒｓｔ Ｓｔｒａｎｄ緩衝液、２μｌ ０．１Ｍ ＤＴＴ、及び１μｌ ＲＮａｓｉｎ（４０Ｕ／μｌ、Ｐｒｏｍｅｇａ、＃ Ｎ２５１１）のキットの成分（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃ １８０６４～０１４）を加えた。上下にピペットで混ぜた後、前記反応液を水浴で４２℃にして、２分間インキュベートした。次に、１μｌの逆転写酵素（Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎキット、上記参照）を加え、上下にピペットで混合した。前記反応液を水浴中、４２℃で５０分間インキュベートし、次に前記反応試験管を１５分間７０℃の加熱ブロックに切り替えて反応を停止した。短時間氷でインキュベートした後、新たに合成されたｃＤＮＡを遠心分離し、使用前まで－２０℃で保存した。

【０１６３】

例１４　リアルタイムＰＣＲ。

リアルタイムＰＣＲで鋳型として用いるｃＤＮＡの濃度は、（最初のＲＮＡによって）１００ｐｇ～１００ｎｇと変化する。所定の遺伝子と対照遺伝子それぞれについて、（蛍光色素と失活剤分子を含む）特定のＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブを設計することができる。代わりに、前記色素ＳＹＢＲ（登録商標）－Ｇｒｅｅｎを用いることもでき、すべての二本鎖ＤＮＡ分子でインターカレートし、生じたＰＣＲ産物を処理中に測定することができる。（リアルタイムＰＣＲとマイクロアレイ分析で）ＰＣＲ増幅するオリゴヌクレオチドを設計し、通常１５０～６００塩基対（ｂｐ）のサイズのＰＣＲ断片を達成した。所定の遺伝子に加え、βアクチン（ＡＣＴＢ）、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤ）、またはヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ１）などの対照またはハウスキーピング遺伝子とともに、ＰＣＲプローブを２回または３回設定した。典型的な２５μｌのＰＣＲ反応は、鋳型ｃＤＮＡ（１００ｐｇ～１００ｎｇ）、ＨｏｔＳｔａｒｔ　Ｔａｑ－ポリメラーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）０．５　Ｕ／μｌ、１ｘポリメラーゼ反応緩衝液、０．２ｍＭの各ｄＮＴＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、１．５～７ｍＭの$MgCl_2$（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、５０～３００ｎＭの範囲のオリゴヌクレオチド（ドイツのＱｉａｇｅｎ－Ｏｐｅｒｏｎなど）、ＳＹＢＲ(r)－Ｇｒｅｅｎ（Ｂｉｏ　Ｗｈｉｔｔａｋｅｒ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓなど、＃５０５１２、濃度１０，０００ｘ）０．１～０．５ｘ（ストックを希釈）などで構成された。リアルタイムＰＣＲの典型的なＰＣＲ条件は、５～１５分の９５℃での活性化段階、９４℃で各３０ｓの変性サイクル４５回、３０ｓのプライマーのアニーリング（温度はプライマーの融解温度による）、及び最長１分間の７２℃でのプライマーの伸長であった。各サイクルの後、ＰＣＲ増幅中の前記プローブの蛍光増加を、リアルタイムＰＣＲ装置の光学ユニットで決定した（例えばＢＩＯＲＡＤのｉＣｙｃｌｅｒ）。対照と処置を行ったサンプルから作成したリアルタイムＰＣＲのデータは、ｍＲＮＡの発現変化について、意味深い情報を与えた。

【０１６４】

例１５　マイクロアレイスライドをスポットするための標的遺伝子のＰＣＲ増幅。

選択したすべての標的遺伝子から、以下のプロトコールにより、（鋳型として）ＲＰＥ／網膜－または肝臓特異的なｃＤＮＡから１５０～６００ｂｐのＰＣＲ断片を増幅した：ＰＣＲ反応は、典型的には合計５０μｌに設定した。この反応には通常、１ｘポリメラーゼ反応緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、１．５～４ｍＭ（最終濃度）の$MgCl_2$（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、０．２ｍＭの各ヌクレオチド（１０ｍＭ　ｄＮＴＰストック、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、最高１μＭの遺伝子特異的ｆｏｒｗａｒｄ及びｒｅｖｅｒｓｅプライマー（Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｐｅｒｏｎ）、０．０２５～１ＵのTaqポリメラーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎなど）、適当量の鋳型ｃＤＮＡ（１～１０μｌ、ｃＤＮＡの品質による）、及びヌクレアーゼを含まない水を最終量５０μｌまで含めた。ＰＣＲの典型的な条件は、５分間の９５℃での単回変性段階、９４℃で各３０ｓの変性サイクル３０回、３０ｓのプライマーのアニーリング（通常４５～６５℃、温度はプライマーの融解温度による）、最長１分間の７２℃でのプライマーの伸長であった。

【０１６５】

例１６　ＰＣＲの精製。

製造業者の指針に従いＱｉａＱｕｉｃｋ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）を利用し、ＰＣＲの精製を行った。

【０１６６】

例１７　コーティングしたガラススライドにＰＣＲ生成物をスポットする。

スポット用の緩衝液として５０％　ＤＭＳＯを用いたＧｅｎｅｐａｋスポッター（Ｇｅｎｅｔｉｘ）により、２つに分かれたピン（Ｔｅｌｅｃｈｅｍ）でＣＭＴ　ＧＡＰＳコートしたスライド（Ｃｏｒｎｉｎｇ）上のＰＣＲ産物のＤＮＡを配列した。スポットしたスライドは６ヵ月まで保存した。

【０１６７】

例１８　ハイブリダイゼーションのためのＲＮＡの標識。

各標識反応について、ＲＮＡは５μｇ（少なくとも３００ｎｇ／μｌ、$OD_{260/280}$は１．８～２．０）が望ましい。Ｑｉａｇｅｎのキット「Ｌａｂｅｌ　Ｓｔａｒ」を用い、供給者のプロトコールに従って、（対照／非処理細胞の）対照ＲＮＡと（ストレス／処理細胞の）被験ＲＮＡをＣｙ３及びＣｙ５（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓまたは Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒから供給）で直接標識した。

【０１６８】

例１９　マイクロアレイによるＲＮＡのハイブリダイゼーション。

自動Ｌｕｃｉｄｅａ　Ｓｌｉｄｅｐｒｏハイブリダイゼーションステーション（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）により、洗練されたハイブリダイゼーション及び洗浄の条件下でマイクロアレイにスポットしたＤＮＡと混合したＲＮＡのハイブリダイゼーションを、４２℃で一晩行った：ハイブリダイゼーション緩衝液は、２５％ホルムアミド、５ｘ　ＳＳＣ、及び０．１％　ＳＤＳで構成された。

【０１６９】

例２０　配列の画像処理とデータ分析。

ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイのシグナルをレーザースキャナー（ＳｃａｎＡｒｒａｙ　４０００，Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）でスキャンし、未処理の画像データを得た。上記で作成した画像からタブで区切ったテキストファイルにシグナル情報を抽出するため、ＳｃａｎＡｌｙｚｅ（Ｍｉｋｅ　Ｅｉｓｅｎ、カリフォルニア州スタンフォード大学、ｈｔｔｐ：／／ｒａｎａ．ｌｂｌ．ｇｏｖ／ＥｉｓｅｎＳｏｆｔｗａｒｅ．ｈｔｍ）などのソフトウェアツールを適用した。データの規格化は、ＭｉｃｒｏｓｏｆｔのＥｘｃｅｌ及びＡｃｃｅｓｓプログラム（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｏｆｆｉｃｅパッケージの一部）を適応して行った。そのように調整したデータは、例えば、異なって発現された遺伝子を見つけるため、複雑なクラスター分析が可能なＳｉｌｉｃｏｎ　ＧｅｎｅｔｉｃｓのＧｅｎｅＳｐｒｉｎｇなどのソフトウェアを用いて分析した。

【０１７０】

例２１　ｄｓＲＮＡ分子による、遺伝子組換えマウスの網膜色素上皮（ＲＰＥ）と網膜中の緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）の発現抑制。

この例は、マウス動物モデルにおける標的遺伝子ｅＧＦＰのｄｓＲＮＡによる特異的転写後遺伝子サイレンシングについて説明しており、この間、全身適用において、転写後遺伝子サイレンシングに対する最適なｄｓＲＮＡ濃度が決定される（実験手順１、結果は図１を参照のこと）。前記手順には遺伝子組換えマウス（ＦＶＢ．Ｃｇ－Ｔｇ（ＧＦＰＵ）５Ｎａｇｙ，Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）のｉｎ　ｖｉｖｏ処理が含まれ、標的遺伝子ｅＧＦＰに対するｄｓＲＮＡオリゴリボヌクレオチド分子の全身適用により、これらの体細胞中で緑色蛍光タンパク質（ｅＧＦＰ）の活性型を発現する。対照動物も非サイレンシングｄｓＲＮＡ分子を用いて全身に処理する。転写後遺伝子サイレンシングの目的で、鎮痛剤または麻酔の影響を受けていない動物に、１００または２００μｇ　ｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ／ｋｇ体重（ＢＷ）、また対照群では２００μｇの非サイレンシングｄｓＲＮＡ／ｋｇ　ＢＷの尾静脈注入を連日静脈内から行う（投与１日目：０日、投与最終日：２０日）。緩衝液で処理した対照群の動物（０．１ｍｇの緩衝液を尾静脈に連日静脈内注射）も保持した。実験動物の各群は８匹とし、最大注射量／注射は０．１ｍｌである。２１日目に前記動物はCO_2吸入により屠殺する。

前記マウス中の眼における緑色蛍光タンパク質の発現は免疫組織学的に検討する（自発的ｅＧＦＰ蛍光：蛍光顕微鏡評価、ｅＧＦＰ特異的免疫蛍光染色：蛍光顕微鏡評価）。

【０１７１】

ｄｓＲＮＡ構築物及びプラスミド：

ｄｓＲＮＡ分子の設計に対して、２ヌクレオチド長で対称的な３’オーバーハングを有する２１ヌクレオチド（ｎｔ）長のセンス鎖及びアンチセンス鎖を得るため、タイプＡＡ（Ｎ１９）ＴＴ（Ｎはすべてのヌクレオチドを表す）の配列を標的ｍＲＮＡの配列から選

択した。３’オーバーハングでは、ウリジンの代わりに２’デオキシチミジンを用いた。前記ｄｓＲＮＡ分子が標的遺伝子のみに対応していることを確認するため、前記の選択したｄｓＲＮＡ配列をＢＬＡＳＴ解析でマウスゲノムに対して検討する。前記２１－ｎｔＲＮＡ分子は化学的に合成、精製する。二本鎖を形成するため、１００μｇの各センス及びアンチセンスオリゴリボヌクレオチドを、１０ｍＭＴｒｉｓ／ＨＣｌ、２０ｍＭＮａＣｌ（ｐＨ７．０）中で混合し、９５℃に加熱、１８時間以上室温に冷却する。前記ｄｓＲＮＡ分子をエタノールで沈殿し、滅菌緩衝液（１００ｍＭ酢酸カリウム、３０ｍＭＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ、２ｍＭ酢酸マグネシウム、ｐＨ７．４）に再懸濁する。前記ｄｓＲＮＡの整合性及び二本鎖の特性は、ゲル電気泳動法で確認する。代わりに、前記ｄｓＲＮＡ分子を市販の供給業者から購入してもよい。前記標的遺伝子の配列及び対応するｄｓＲＮＡ分子は以下の通りである：

【０１７２】

【表１】

GFP dsRNA

DNA 標的配列	：	5′ G CAA GCT GAC CCT GAA GTT CA (配列ＩＤ：５) コード領域：開始コドンの最初のヌクレオチドに対して １２１～１４１（アクセッション番号. Ｕ５５７６１）
dsRNA (センス)		5′ r(GCA AGC UGA CCC UGA AGU U) (配列ＩＤ：６)
dsRNA (アンチセンス)		5′ r(AA CUU CAG GGU CAG CUU GC) (配列ＩＤ：７)

非サイレンシングｄｓＲＮＡ、対照

DNA 標的配列	：	5′ AATTCTCCGAACGTGTCACGT (配列ＩＤ：８)
dsRNA (センス)		5′ r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)d(TT) (配列ＩＤ：９)
dsRNA (アンチセンス)		5′ r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT) (配列ＩＤ：１０)

【０１７３】

マウスの鎮痛または麻酔：

全身に適用するため、前記動物を固定し、前記ｄｓＲＮＡを尾静脈中に静脈注射し（最大注射量：０．１ｍｌ）、鎮痛または麻酔は静脈注射自体より動物にストレスを与えるため控える。球後注射（最大注射量：０．００５ｍｌ）を行うため、前記動物に短期間イソフルラン吸入麻酔を行い、鎮痛を行うためメタミゾールナトリウムを投与する。次に、前記動物をいつも飼育している動物ケージの周りで保定する。ｉｎ　ｖｉｖｏ診断の完了後（各動物実験の最後は例１～５にそれぞれ記載する）、前記動物をCO_2吸入により屠殺し、眼球除去し、この眼は組織学的（免疫組織学的）に研究する。

【０１７４】

網膜色素上皮及び網膜中のｅＧＦＰ発現の研究：

除去後、前記眼を４％ホルマリン／ＰＢＳ溶液で２４時間固定する。標準的な方法により、次に前記固定サンプルを連続的に濃度を増加させたアルコール中で脱水し、パラフィンに包む。ミクロトームを用い、標準的には５～１２μｍの連続切片を作成し、加熱した水浴中で伸展し、ポリリジンでコートしたカバーグラスに移す。次に前記切片をインキュベーター中で２時間、５２℃で乾燥する。前記乾燥切片はキシロール中で脱パラフィン化し、連続的に濃度を減少させたアルコール中に移した後、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ７．４）に入れる。ブロッキング後、前記切片を一次抗ｅＧＦＰ抗血清（ポリクローナルヤギ抗ｅＧＦＰ抗血清、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｎｏ．ｓｃ－５３８４）で２時間インキュベートする。Ｃｙ２共役ウサギ抗ヤギＩｇＧ（Ｄｉａｎｏｖａ，Ｎｏ．３０５－２２５－０４５）を用い、免疫蛍光染色の手法により検出する。前記サンプルを包み、次に２０Ｘ及び

４０Ｘ／１．３対物レンズを装備したＥｃｌｉｐｓｅ　ＴＥ－２０００－Ｓ顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ）で顕微鏡検査を行うため、マウントする。脱パラフィン化を行った、未処理切片中の自然ｅＧＦＰ特異的蛍光は、蛍光顕微鏡を用いて解析する。

【０１７５】

実験手順全身のｓｉＲＮＡ適用。転写後遺伝子サイレンシングに関する最適ｄｓＲＮＡ濃度の決定。

【０１７６】

【表２】

群	物質	動物数
対照動物	緩衝液	8
ネガティブコントロール 200 μg dsRNA/kg BW	非サイレンス dsRNA	8
200 μg dsRNA/kg BW	ｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ	8
100 μg dsRNA/kg BW	ｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ	8
１実験当たりの動物数		32

【０１７７】

結果は図１を参照のこと。

【０１７８】

【表３－１】

遺伝子名	受入番号	マーカー対象	CDS	種類	別記号	引用
BAX	NM_138761	アポトーシス	53..631	BCL2 関連 X タンパク質 (BAX) 転写変異体 α	不明	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
BBC3	NM_014417	アポトーシス	1..582	BCL2 結合要素 3 (BBC3)	JFY1, PUMA, PUMA/JFY1	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
BCL2	NM_000633	アポトーシス	32..751	B 細胞 CLL/リンパ腫 2 (BCL2), 転写変異体 α a	不明	Nicotera. Toxicol Lett. 2002 Feb 28;127(1-3):189-95.
BIRC2	NM_001166	アポトーシス	1160..3016	バキュロウイルス IAP リピートコンテイニング 2 (BIRC2)	API1, MIHB, CIAP1, HIAP2	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
BIRC3	NM_001165	アポトーシス	725..2539	バキュロウイルス IAP リピートコンテイニング 3 (BIRC3)	API2, MIHC, CIAP2, HAIP1, HIAP1	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
BIRC4	NM_001167	アポトーシス	34..1527	バキュロウイルス IAP リピートコンテイニング 4 (BIRC4)	ILP, API3, ILP1, MIHA, XIAP, Xiap, hILP, ILP-1	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
CDKN1A	NM_078467	アポトーシス	236..730	サイクリン依存性キナーゼインヒビター1A (p21, Cip1)(CDKN1A), 転写変異体 2	P21, CIP1, SDI1, WAF1, CAP20, CDKN1, MDA-6	Almond & Cohen. Leukemia. 2002 Apr;16(4):433-43.
ENDOG	NM_004435	アポトーシス	167..1060	エンドヌクレアーゼ G (ENDOG)	不明	Almond & Cohen. Leukemia. 2002 Apr;16(4):433-43.
HSPD1	NM_002156	アポトーシス	25..1746	熱ショック 60kDa タンパク質 1(シャペロニン) (HSPD1)	GROEL, HSP60, SPG13	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
HSPE1	NM_002157	アポトーシス	42..350	熱ショック 10kDa タンパク質 1 (シャペロニン 10) (HSPE1)	CPN10, GROES, HSP10	Ravagnan et al. J Cell Physiol. 2002 Aug;192(2):131-7.
LRDD	NM_145886	アポトーシス	144..2876	ロイシンリッチデスドメインコンテイニング(LRDD), 転写変異体 1	PIDD, MGC16925	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.

【０１７９】

【表３－２】

				骨髄細胞白血病配列１(BCL2 関連)(MCL1)	EAT	Bae et al. J. Biol. Chem. 275: 25255-25261, 2000.
MCL1	NM_021960	アポトーシス	64..1116			
P53AIP1	AB045830	アポトーシス	211..585	ｐ５３ＡＩＰ１、完全ｃｄｓ	不明	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
PMAIP1	NM_021127	アポトーシス	174..338	アオルボール-12-ミリスチン酸-13-酢酸誘導性タンパク質１(PMAIP1)	APR, NOXA	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
TNFRSF10B	NM_147187	アポトーシス	286..1521	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、１０ｂ番（ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ）、転写変異体２	DR5, KILLER, TRICK2, TRICKB, ZTNFR9, TRAILR2, TRICK2A, TRICK2B, TRAIL-R2, KILLER/DR5	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
TNFRSF6	NM_000043	アポトーシス	347..1354	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、６番（ＴＮＦＲＳＦ６）、転写変異体１	FAS, APT1, CD95, APO-1, FASTM	Hueber. Nature Cell Biol. 2: E23-E25, 2000.
TOP2B	NM_001068	アポトーシス	1..4866	トポイソメラーゼ（ＤＮＡ）ＩＩβ１８０ｋＤａ（ＴＯＰ２Ｂ）	TOPIIB	Solovyan et al. J Biol Chem. 2002 Jun 14;277(24):21458-67.
TP53	NM_000546	アポトーシス	252..1433	腫瘍タンパク質ｐ５３（リ・フラウメニ症候群）（ＴＰ５３）	P53, p53, TRP53	Almond & Cohen. Leukemia. 2002 Apr;16(4):433-43.
EPO	NM_000799	低酸素培養条件	182..763	エリスロポエチン（ＥＰＯ）	EP	Grimm et al. Nature Med. 8: 718-724, 2002.
FGF2	NM_002006	低酸素培養条件	302..934	線維芽細胞成長因子２（ベーシック）（ＦＧＦ２）	BFGF, FGFB, HBGH-2	Grimm et al. Nature Med. 8: 718-724, 2002.
LDHA	NM_005566	低酸素培養条件	98..1096	乳酸脱水素酵素Ａ	不明	Semenza et al. J Biol Chem. 1996 Dec 20;271(51):32529-37.
NGB	NM_021257	低酸素培養条件	376..831	ニューログロブリン（ＮＧＢ）	不明	Burmester et al. Nature 407 (6803), 520-523 (2000)
VEGF	NM_003376	低酸素培養条件	702..1277	血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）	VEGFA	Grimm et al. Nature Med. 8: 718-724, 2002.

【０１８０】

【表３－３】

				アポトーシス、カスパーゼ活性化因子（ＡＶＥＮ）	PDCD12	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
AVEN	NM_020371	酸化的ストレス	53..1141			
BCL2A1	NM_004049	酸化的ストレス	184..711	ＢＣＬ２関連タンパク質Ａ１（ＢＣＬ２Ａ１）	GRS, BFL1, HBPA1, BCL2L5	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
CAT	NM_001752	酸化的ストレス	69..1652	カタラーゼ(CAT)	不明	Cai et al. Prog Retin Eye Res. 2000 Mar;19(2):205-21.
DUSP1	NM_004417	酸化的ストレス	249..1352	二重特異性ホスファターゼ１（ＤＵＳＰ１）	HVH1, CL100, MKP-1, PTPN10	Wu et al. J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):44208-13.
GADD45	NM_001924	酸化的ストレス	296..793	増殖抑制ＤＮＡ損傷誘発性, α (GADD45A), .	DDIT1, GADD45	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
HMOX1	NM_002133	酸化的ストレス	81..947	ヘムオキシゲナーゼ（ｄｅｃｙｃｌｉｎｇ）１（ＨＭＯＸ１）	HO-1, bK286B10	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
IL6	NM_000600	酸化的ストレス	63..701	インターロイキン６（インターフェロン、β２）（ＩＬ６）	HGF, HSF, BSF2, IL-6, IFNB2	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
MAP2K6	NM_002758	酸化的ストレス	341..1345	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ６（ＭＡＰ２Ｋ６）、転写変異体１	MEK6, MKK6, MAPKK6, PRKMK6, SAPKK3	Seger & Krebs. FASEB J. 9: 726-735, 1995.
MAPK8	NM_139049	酸化的ストレス	18..1301	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ８（ＭＡＰＫ８）、転写変異体１	JNK, JNK1, PRKM8, SAPK1, JNK1A2, JNK21B1/2	Almond & Cohen. Leukemia. 2002 Apr;16(4):433-43.
MAPK9	NM_002752	酸化的ストレス	50..1324	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ９（ＭＡＰＫ９）、転写変異体１	JNK2, JNK2A, JNK2B, PRKM9, JNK-55, JNK2BETA, P54ASAPK, p54aSAPK, JNK2ALPHA	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.

【０１８１】

【表３－４】

NFKB2	NM_002502	酸化的ストレス	164..2965	Bβ細胞の核因子κ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサー2（ｐ49／ｐ100）（ＮＦＫＢ２）	LYT10, LYT-10	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
PRDX2	NM_005809	酸化的ストレス	90..686	ペルオキシレドキシン2（ＰＲＤＸ２）	PRP, TSA, NKEFB, TDPX1	Fujii & Ikeda. Redox Rep. 2002;7(3):123-30. Review.
SFN	NM_006142	酸化的ストレス	166..912	ストラティフィン (SFN),	不明	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
SHC1	NM_003029	酸化的ストレス	195..1946	ＳＨＣ（Ｓｒｃホモロジー２ドメイン含有）トランスフォーミングタンパク質１（ＳＨＣ１）	SHC, SHCA	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
SOD1	NM_000454	酸化的ストレス	1..465	スーパーオキシドディスムターゼ１、可溶性（筋萎縮性側索硬化症１（成人））（ＳＯＤ１）	ALS, ALS1, IPOA	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
SOD2	NM_000636	酸化的ストレス	5..673	スーパーオキシドディスムターゼ２、ミトコンドリア（ＳＯＤ２）	IPO-B, MNSOD	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
TNFAIP3	NM_006290	酸化的ストレス	67..2439	腫瘍壊死因子、α誘導タンパク質３（ＴＮＦＡＩＰ３）	A20, TNFA1P2	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
TRAF1	NM_005658	酸化的ストレス	79..1329	ＴＮＦ受容体関連因子１（ＴＲＡＦ１）	EBI6, MGC:10353	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.
TRAF2	NM_021138	酸化的ストレス	58..1563	ＴＮＦ受容体関連因子２（ＴＲＡＦ２）、転写変異体１	TRAP, TRAP3, MGC:45012	Martindale et al. J Cell Physiol. 2002 Jul;192(1):1-15.

【０１８２】

【表４－１】

References

Banks CN, Hutton WK. Blindness in New South Wales: an estimate of the prevalence and some of the contributing causes. Aust J Ophthalmol 9:285-288 (1981).

Bohler C, Nielsen PE, Orgel LE. Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. Nature. 376(6541):578-81 (1995).

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409(6818):363-6 (2001).

Bressler NM. Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration. J Am Board Fam Pract. 15:142-152 (2002).

Bressler NM, Bressler SB. Preventative ophthalmology. Age-related macular degeneration. Ophthalmology 102:1206-1211 (1995).

Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Age-related macular degeneration. Surv Ophthalmol 32:375-413 (1988).

Bressler SB, Bressler NM, Fine SL, Hillis A, Murphy RP, Olk RJ, Patz A. Natural course of choroidal neovascular membranes within the foveal avascular zone in senile macular degeneration. Am J Ophthalmol 93:157-163 (1982).

Campochiaro PA, Soloway P, Ryan SJ, Miller JW. The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. Mol Vis. 5:34 (1999).

Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., and Morgan R.A. Specific inhibition og gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc. Natl. Acad. Sci. 09:9742-9747 (2001).

Davis LG, Kuehl M, Kuehl MW, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Sec. Ed. Elsevier (1990).

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschel T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498 (2001).

Feeney L. Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 17:583-600 (1978).

Feeney-Burns L, Ellersieck MR. Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane. Am J Ophthalmol 100:686-697(1985).

Finn PJ, Gibson NJ, Fallon R, Hamilton A, Brown T. Synthesis and properties of DNA-PNA chimeric oligomers. Nucleic Acids Res. 24: 3357-3363 (1996).

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Coenorhabditis elegans. Nature 391:806-811(1998).

Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proc Natl Acad Sci U S A. 80(6):1579-83 (1983).

Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. Arch Ophthalmol 90:206-217 (1973).

【０１８３】

【表４－２】

Gass JD. Pathogenesis of disciform detachment of the neuroepithelium. Am J Ophthalmol 63: Suppl:1-139(1967).

Ghafour IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. Br J Ophthalmol 67: 209-213 (1983).

Gossen M, Bonin AL, Freundlieb S, Bujard H. Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. Curr Opin Biotechnol. 5(5):516-20 (1994).

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(12):5547-5551 (1992).

Gotoh M, Hasebe M, Ohira T, Tosu M. [Gene diagnosis with an affinity sensor, BIACORE--principle and applications]. Rinsho Byori. 45(3):224-8 (1997). Japanese.

Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. Ophthalmology 92:615-27 (1985).

Grey RH, Burns-Cox CJ, Hughes A. Blind and partial sight registration in Avon. Br J Ophthalmol 73:88-94(1989).

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing. Cell 106(1):23-34 (2001).

Hamilton AJ and Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286: 950-952(1999).

Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. Genet Epidemiol 11:51-67 (1994).

Hogan MJ, Alvarado J. Studies on the human macula. IV. Aging changes in Bruch's membrane. Arch Ophthalmol 77:410-420(1967).

Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris FL, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. Am J Epidemiol 118:213-227 (1983).

Hyman L. Epidemiology of eye disease in the elderly. Eye 1: 330-341 (1987).

Jalkanen M, Nguyen H, Rapraeger A, Kurn N, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells: localization on the cell surface with a monoclonal antibody. J Cell Biol. 101(3):976-984 (1985).

Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. J Cell Biol. 105:3087-96 (1987).

Jensen KK, Orum H, Nielsen PE, Norden B. Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. Biochemistry 36(16):5072-5077 (1997).

Joyner A. Gene Targeting, A Practical Approach, Second edition, Oxford University Press (1999).

Kasschau KD and Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell 95:461-470(1998).

Klein R, Klein BE, Franke T. The relationship of cardiovascular disease and its risk factors to age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. Ophthalmology 100:406-414 (1993).

【０１８４】

【表４－３】

Knight SW and Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans. Science 2: 2269-2271(2001).

Koch T, Hansen HF, Andersen P, Larsen T, Batz HG, Otteson K, Orum H. Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. J Pept Res. 49(1):80-8 (1997).

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256(5517):495-497 (1975).

Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP, Loewenstein JI, Dawber TR. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. Surv Ophthalmol 24(Suppl): 335-610 (1980).

Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P. Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(12):4712-4716 (1990).

Maguire P, Vine AK. Geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. Am J Ophthalmol 102:621-625 (1986).

Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P, Primi D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. Clin Chem. 37(3):422-429 (1991).

Mayer RJ, Walker JH, eds. Immunochemical methods in cell and molecular biology. Academic Press, London (1987).

Melani C, Rivoltini L, Parmiani G, Calabretta B, Colombo MP. Inhibition of proliferation by c-myb antisense oligodeoxynucleotides in colon adenocarcinoma cell lines that express c-myb. Cancer Res. 51:2897-2901 (1991)

Meyers SM, Zachary AA. Monozygotic twins with age-related macular degeneration. Arch Ophthalmol 106:651-653 (1988).

Paetkau ME, Boyd TA, Grace M, Bach-Mills J, Winship B. Senile disciform macular degeneration and smoking. Can J Ophthalmol 13:67-71 (1978).

Pauleikhoff D, Harper CA, Marshall J, Bird AC. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. Ophthalmology 97:171-178(1990).

Piguet B, Wells JA, Palmvang IB, Wormald R, Chisholm IH, Bird AC. Age-related Bruch's membrane change: a clinical study of the relative role of heredity and environment. Br J Ophthalmol 77:400-403 (1993).

Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. Br J Ophthalmol 60:324-341 (1976).

Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. J Mol Med. 75(10):694-8 (1997)

Seddon JM, Ajani UA, Mitchel BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. Am J Ophthalmol 123: 199-206 (1997).

Smith and Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene 67:31-40 (1988)

【０１８５】

【表４－４】

Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE. Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? Eye 8:564-568 (1994).

Sobol RE, Astarita RW, Chisari FV, Griffiths JC, Royston I. Use of immunoglobulin light chain analysis to detect bone marrow involvement in B-cell neoplasms. Clin Immunol Immunopathol. 24(1):139-144 (1982).

Sobol RE, Dillman RO, Collins H, Griffiths JC, Green MR, Royston I. Applications and limitations of peripheral blood lymphocyte immunoglobulin light chain analysis in the evaluation of non-Hodgkin's lymphoma. Cancer 56(8):2005-2010 (1985).

Sperduto RD, Hiller R. Systemic hypertension and age-related maculopathy in the Framingham Study. Arch Ophthalmol 104:216-219 (1986).

Steinecke, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds Academic Press, Inc.: 449-460 (1995).

The Eye Disease Case-Control Study Group. Risk factors for neovascular age-related macular. Arch Ophthalmol 110:1701-1708 (1992).

Tijssen P.; Burden, RH and von Knippenburg (Eds). Practice and theory of enzyme immuno-assays. Elsevier, Amsterdam, Vol. 15 (1985).

Verma R.S.;Babu A. Human chromosomes; Manual of basic techniques. New York, Pergamon Press (1989).

Veselkov AG, Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD, Nielsen PE. PNA as a rare genome-cutter. Nature. 379(6562):214 (1996).

Wahl RL, Parker CW, Philpott GW. Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')2. J Nucl Med. 24(4):316-25 (1983).

Weiler J, Gausepohl H, Hauser N, Jensen ON, Hoheisel JD. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. Nucleic Acids Res. 25(14):2792-9 (1997).

Yap M, Weatherill J. Causes of blindness and partial sight in the Bradford Metropolitan District from 1980 to 1985. Ophthalmic Physiol Opt 9:289-292 (1989).

Yuzawa M, Isomae T, Mori R, Shimada H, Utsunomiya I. Surgical excision versus laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascular membrane with age-related macular degeneration: comparison of visual outcomes. Jpn J Ophthalmol. 45(2):192-8 (2001).

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101: 25-33(2000).

【図面の簡単な説明】

【０１８６】

【図１】全身的ｄｓＲＮＡ処理ＦＶＢ．ＤＧ－ＴＧ（ＧＦＰＵ）５ＮＡＧＹマウスの網膜及び網膜色素上皮（ＲＰＥ）のｅＧＦＰ発現。この図は、ｄｓＲＮＡ処理ＦＶＢ．Ｄｇ－Ｔｇ（ＧＦＰＵ）５ＮＡＧＹマウスの眼のパラフィン切片中のｅＧＦＰ発現を示している。全身的ｄｓＲＮＡ処理ＦＶＢ．ＤＧ－ＴＧ（ＧＦＰＵ）５ＮＡＧＹマウスの網膜及び網膜色素上皮（ＲＰＥ）中の発現は対照の緩衝液中で最も高く、非サイレンシングｄｓＲＮＡで処理したマウスではわずかに減少し、ｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ処理マウスでは明らかに減少した（対照緩衝液>２００μｇ／ｋｇＢＷ非サイレンシングｄｓＲＮＡ>１００μｇ／ｋｇＢＷｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ>２００μｇ／ｋｇＢＷ　ｅＧＦＰ特異的ｄｓＲＮＡ）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lynkeus Biotech GmbH

<120> Means and Methods for the Specific Modulation of Target Genes in the CNS and the Eye and Methods for Their Identification

<130> LY01A04/P-WO

<150> EP02008761.5

<151> 2002-04-18

<150> US 60/431,173

<151> 2002-12-05

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2500

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(2097)

<223> Homo sapiens cyclic nucleotide gated channel alpha 1

<400> 1

tatattactt aaacaaccaa agat atg aaa cta tcc atg aag aac aat att 51
Met Lys Leu Ser Met Lys Asn Asn Ile
1 5

atc aat aca cag cag tct ttt gta acc atg ccc aat gtg att gta cca 99
Ile Asn Thr Gln Gln Ser Phe Val Thr Met Pro Asn Val Ile Val Pro
10 15 20 25

```
gat att gaa aag gaa ata cga agg atg gaa aat gga gca tgc agc tcc      147
Asp Ile Glu Lys Glu Ile Arg Arg Met Glu Asn Gly Ala Cys Ser Ser
                30                  35                  40

ttt tct gag gat gat gac agt gcc tat aca tct gaa gaa tca gag aat      195
Phe Ser Glu Asp Asp Asp Ser Ala Tyr Thr Ser Glu Glu Ser Glu Asn
            45                  50                  55

gaa aac cct cat gca agg ggt tcc ttt agt tat aag tca ctc aga aag      243
Glu Asn Pro His Ala Arg Gly Ser Phe Ser Tyr Lys Ser Leu Arg Lys
        60                  65                  70

gga gga cca tca cag agg gag cag tac ctg cct ggt gcc att gcc att      291
Gly Gly Pro Ser Gln Arg Glu Gln Tyr Leu Pro Gly Ala Ile Ala Ile
    75                  80                  85

ttt aat gtg aac aac agc agc aat aag gac cag gaa cca gag gaa aaa      339
Phe Asn Val Asn Asn Ser Ser Asn Lys Asp Gln Glu Pro Glu Glu Lys
90                  95                  100                 105

aag aaa aag aaa aaa gaa aag aag agc aag tca gat gat aaa aac gaa      387
Lys Lys Lys Lys Lys Glu Lys Lys Ser Lys Ser Asp Asp Lys Asn Glu
                110                 115                 120

aat aaa aac gac cca gag aag aaa aag aag aaa aag gac aaa gag aag      435
Asn Lys Asn Asp Pro Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asp Lys Glu Lys
            125                 130                 135

aaa aag aaa gag gag aaa agc aaa gat aag aaa gaa cac cac aag aaa      483
Lys Lys Lys Glu Glu Lys Ser Lys Asp Lys Lys Glu His His Lys Lys
        140                 145                 150

gaa gtt gtg gtt att gat ccc tcg gga aac aca tat tac aac tgg ctg      531
Glu Val Val Val Ile Asp Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Trp Leu
    155                 160                 165

ttt tgc atc aca tta cct gtt atg tac aac tgg aca atg gtt att gcc      579
Phe Cys Ile Thr Leu Pro Val Met Tyr Asn Trp Thr Met Val Ile Ala
170                 175                 180                 185

aga gca tgt ttt gat gaa ctt caa tct gat tac cta gaa tat tgg ctc      627
Arg Ala Cys Phe Asp Glu Leu Gln Ser Asp Tyr Leu Glu Tyr Trp Leu
                190                 195                 200

att ttg gat tac gta tca gac ata gtc tat tta atc gat atg ttt gta      675
Ile Leu Asp Tyr Val Ser Asp Ile Val Tyr Leu Ile Asp Met Phe Val
            205                 210                 215

cga aca agg aca ggt tac cta gaa caa gga ctg ctg gta aag gaa gaa      723
Arg Thr Arg Thr Gly Tyr Leu Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys Glu Glu
        220                 225                 230

ctt aaa ctc ata aat aaa tat aaa tcc aac ttg caa ttt aaa ctt gat      771
Leu Lys Leu Ile Asn Lys Tyr Lys Ser Asn Leu Gln Phe Lys Leu Asp
    235                 240                 245

gtt ctg tca ctg ata cca act gat ttg ctg tat ttt aag tta ggg tgg      819
Val Leu Ser Leu Ile Pro Thr Asp Leu Leu Tyr Phe Lys Leu Gly Trp
250                 255                 260                 265

aac tat cca gaa att aga tta aac agg ttg tta cgg ttc tct cgt atg      867
Asn Tyr Pro Glu Ile Arg Leu Asn Arg Leu Leu Arg Phe Ser Arg Met
                270                 275                 280
```

```
ttt gag ttc ttc cag aga aca gaa aca agg aca aac tat cca aac atc      915
Phe Glu Phe Phe Gln Arg Thr Glu Thr Arg Thr Asn Tyr Pro Asn Ile
            285                 290                 295

ttc agg att tcc aac ctt gtt atg tat atc gtc atc att atc cac tgg      963
Phe Arg Ile Ser Asn Leu Val Met Tyr Ile Val Ile Ile Ile His Trp
        300                 305                 310

aat gca tgt gtg ttc tac tct att tct aaa gct att gga ttt gga aat      1011
Asn Ala Cys Val Phe Tyr Ser Ile Ser Lys Ala Ile Gly Phe Gly Asn
    315                 320                 325

gat aca tgg gtc tac cct gat att aat gat cct gaa ttt ggc cgt ttg      1059
Asp Thr Trp Val Tyr Pro Asp Ile Asn Asp Pro Glu Phe Gly Arg Leu
330                 335                 340                 345

gct aga aaa tac gta tac agc ctt tac tgg tct aca ctg act ttg act      1107
Ala Arg Lys Tyr Val Tyr Ser Leu Tyr Trp Ser Thr Leu Thr Leu Thr
            350                 355                 360

acc att ggt gaa aca ccc cct ccc gtg agg gat tct gag tat gtc ttt      1155
Thr Ile Gly Glu Thr Pro Pro Pro Val Arg Asp Ser Glu Tyr Val Phe
            365                 370                 375

gtg gtg gtt gat ttc cta att gga gtg tta att ttt gct acc atc gtt      1203
Val Val Val Asp Phe Leu Ile Gly Val Leu Ile Phe Ala Thr Ile Val
        380                 385                 390

ggt aac ata ggt tct atg att tcc aac atg aat gca gcc aga gca gaa      1251
Gly Asn Ile Gly Ser Met Ile Ser Asn Met Asn Ala Ala Arg Ala Glu
    395                 400                 405

ttt caa gca aga att gat gct atc aag caa tat atg cat ttt cga aat      1299
Phe Gln Ala Arg Ile Asp Ala Ile Lys Gln Tyr Met His Phe Arg Asn
410                 415                 420                 425

gta agc aaa gat atg gaa aag agg gtt att aaa tgg ttt gac tac ctg      1347
Val Ser Lys Asp Met Glu Lys Arg Val Ile Lys Trp Phe Asp Tyr Leu
            430                 435                 440

tgg acc aac aaa aaa aca gtt gat gag aaa gaa gtc tta aag tat cta      1395
Trp Thr Asn Lys Lys Thr Val Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys Tyr Leu
            445                 450                 455

cct gat aaa cta aga gca gaa att gcc atc aac gtt cac tta gac aca      1443
Pro Asp Lys Leu Arg Ala Glu Ile Ala Ile Asn Val His Leu Asp Thr
        460                 465                 470

tta aaa aag gta cgc att ttt gct gat tgt gaa gct ggt ctg ttg gtg      1491
Leu Lys Lys Val Arg Ile Phe Ala Asp Cys Glu Ala Gly Leu Leu Val
    475                 480                 485

gag ttg gtc ttg aaa ttg caa ccc caa gtc tac agt cct gga gat tat      1539
Glu Leu Val Leu Lys Leu Gln Pro Gln Val Tyr Ser Pro Gly Asp Tyr
490                 495                 500                 505

att tgc aag aaa ggg gat atc gga cga gag atg tac att atc aag gaa      1587
Ile Cys Lys Lys Gly Asp Ile Gly Arg Glu Met Tyr Ile Ile Lys Glu
            510                 515                 520

ggc aaa ctc gct gtg gtg gca gat gat gga gtc act cag ttt gtg gta      1635
Gly Lys Leu Ala Val Val Ala Asp Asp Gly Val Thr Gln Phe Val Val
```

```
            525                 530                 535

ttg agc gat ggc agc acc ttc ggt gag atc agc att ctt aac att aaa      1683
Leu Ser Asp Gly Ser Thr Phe Gly Glu Ile Ser Ile Leu Asn Ile Lys
        540                 545                 550

ggg agc aaa gct ggc aat cga aga acg gcc aat att aaa agt att ggc      1731
Gly Ser Lys Ala Gly Asn Arg Arg Thr Ala Asn Ile Lys Ser Ile Gly
    555                 560                 565

tac tca gac ctg ttc tgt ctc tca aaa gat gac ctc atg gaa gct cta      1779
Tyr Ser Asp Leu Phe Cys Leu Ser Lys Asp Asp Leu Met Glu Ala Leu
570                 575                 580                 585

act gag tac cca gat gcc aaa act atg cta gaa gaa aaa ggg aag caa      1827
Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys Thr Met Leu Glu Glu Lys Gly Lys Gln
                590                 595                 600

att tta atg aaa gat ggt cta ctg gat cta aac att gca aat gct ggc      1875
Ile Leu Met Lys Asp Gly Leu Leu Asp Leu Asn Ile Ala Asn Ala Gly
            605                 610                 615

agt gat cct aaa gat ctt gaa gag aag gtt act cga atg gag ggg tca      1923
Ser Asp Pro Lys Asp Leu Glu Glu Lys Val Thr Arg Met Glu Gly Ser
        620                 625                 630

gta gac ctc ctg caa acc agg ttt gcc cga atc ttg gct gag tat gag      1971
Val Asp Leu Leu Gln Thr Arg Phe Ala Arg Ile Leu Ala Glu Tyr Glu
    635                 640                 645

tcc atg cag cag aaa ctg aaa caa aga tta acc aag gtt gag aaa ttt      2019
Ser Met Gln Gln Lys Leu Lys Gln Arg Leu Thr Lys Val Glu Lys Phe
650                 655                 660                 665

ctg aaa ccg ctt att gac aca gaa ttt tca agt att gag gga cct tgg      2067
Leu Lys Pro Leu Ile Asp Thr Glu Phe Ser Ser Ile Glu Gly Pro Trp
                670                 675                 680

agc gaa agt ggg ccc atc gac tct aca tag aaccgaaaag ctggtcatta       2117
Ser Glu Ser Gly Pro Ile Asp Ser Thr
            685                 690

acagggacat gcctcatgat ccttttgatc ctatgactga catcaactaa aatttaaaag   2177

aagaggaaga ctcagttggg aaatttttcc atgaggaaaa tgtgctttgg tgcaaggtac   2237

agcccacacc tctctgagag atactatgat taaaaaagct ttatatctgg gatttttcac   2297

aactgataat gtgcaaagat ataaactgat taacttgtca gtgtctgtat tttctgattt   2357

tttcacatac gctcatttta tgtaatattc ttcataaaaa tgaataagta gccctcactt   2417

tcatgccatt tccattgttg agtgaagcgt atttgaagta actgagaatt accatgtaca   2477

tcatatttgg gataacattt tta                                          2500
```

<210> 2

<211> 690

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

```
Met Lys Leu Ser Met Lys Asn Asn Ile Ile Asn Thr Gln Gln Ser Phe
1               5                  10                  15

Val Thr Met Pro Asn Val Ile Val Pro Asp Ile Glu Lys Glu Ile Arg
            20                  25                  30

Arg Met Glu Asn Gly Ala Cys Ser Ser Phe Ser Glu Asp Asp Asp Ser
        35                  40                  45

Ala Tyr Thr Ser Glu Glu Ser Glu Asn Glu Asn Pro His Ala Arg Gly
    50                  55                  60

Ser Phe Ser Tyr Lys Ser Leu Arg Lys Gly Gly Pro Ser Gln Arg Glu
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Leu Pro Gly Ala Ile Ala Ile Phe Asn Val Asn Asn Ser Ser
                85                  90                  95

Asn Lys Asp Gln Glu Pro Glu Glu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Glu Lys
            100                 105                 110

Lys Ser Lys Ser Asp Asp Lys Asn Glu Asn Lys Asn Asp Pro Glu Lys
        115                 120                 125

Lys Lys Lys Lys Lys Asp Lys Glu Lys Lys Lys Lys Glu Glu Lys Ser
    130                 135                 140

Lys Asp Lys Lys Glu His His Lys Lys Glu Val Val Val Ile Asp Pro
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Trp Leu Phe Cys Ile Thr Leu Pro Val
                165                 170                 175

Met Tyr Asn Trp Thr Met Val Ile Ala Arg Ala Cys Phe Asp Glu Leu
            180                 185                 190

Gln Ser Asp Tyr Leu Glu Tyr Trp Leu Ile Leu Asp Tyr Val Ser Asp
        195                 200                 205

Ile Val Tyr Leu Ile Asp Met Phe Val Arg Thr Arg Thr Gly Tyr Leu
    210                 215                 220

Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys Glu Glu Leu Lys Leu Ile Asn Lys Tyr
```

225 230 235 240

Lys Ser Asn Leu Gln Phe Lys Leu Asp Val Leu Ser Leu Ile Pro Thr
245 250 255

Asp Leu Leu Tyr Phe Lys Leu Gly Trp Asn Tyr Pro Glu Ile Arg Leu
260 265 270

Asn Arg Leu Leu Arg Phe Ser Arg Met Phe Glu Phe Phe Gln Arg Thr
275 280 285

Glu Thr Arg Thr Asn Tyr Pro Asn Ile Phe Arg Ile Ser Asn Leu Val
290 295 300

Met Tyr Ile Val Ile Ile Ile His Trp Asn Ala Cys Val Phe Tyr Ser
305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Ile Gly Phe Gly Asn Asp Thr Trp Val Tyr Pro Asp
325 330 335

Ile Asn Asp Pro Glu Phe Gly Arg Leu Ala Arg Lys Tyr Val Tyr Ser
340 345 350

Leu Tyr Trp Ser Thr Leu Thr Leu Thr Thr Ile Gly Glu Thr Pro Pro
355 360 365

Pro Val Arg Asp Ser Glu Tyr Val Phe Val Val Val Asp Phe Leu Ile
370 375 380

Gly Val Leu Ile Phe Ala Thr Ile Val Gly Asn Ile Gly Ser Met Ile
385 390 395 400

Ser Asn Met Asn Ala Ala Arg Ala Glu Phe Gln Ala Arg Ile Asp Ala
405 410 415

Ile Lys Gln Tyr Met His Phe Arg Asn Val Ser Lys Asp Met Glu Lys
420 425 430

Arg Val Ile Lys Trp Phe Asp Tyr Leu Trp Thr Asn Lys Lys Thr Val
435 440 445

Asp Glu Lys Glu Val Leu Lys Tyr Leu Pro Asp Lys Leu Arg Ala Glu
450 455 460

Ile Ala Ile Asn Val His Leu Asp Thr Leu Lys Lys Val Arg Ile Phe
465 470 475 480

Ala Asp Cys Glu Ala Gly Leu Leu Val Glu Leu Val Leu Lys Leu Gln
485 490 495

Pro Gln Val Tyr Ser Pro Gly Asp Tyr Ile Cys Lys Lys Gly Asp Ile
500 505 510

Gly Arg Glu Met Tyr Ile Ile Lys Glu Gly Lys Leu Ala Val Val Ala
515 520 525

Asp Asp Gly Val Thr Gln Phe Val Val Leu Ser Asp Gly Ser Thr Phe
530 535 540

Gly Glu Ile Ser Ile Leu Asn Ile Lys Gly Ser Lys Ala Gly Asn Arg
545 550 555 560

Arg Thr Ala Asn Ile Lys Ser Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Phe Cys Leu
565 570 575

Ser Lys Asp Asp Leu Met Glu Ala Leu Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys
580 585 590

Thr Met Leu Glu Glu Lys Gly Lys Gln Ile Leu Met Lys Asp Gly Leu
595 600 605

Leu Asp Leu Asn Ile Ala Asn Ala Gly Ser Asp Pro Lys Asp Leu Glu
610 615 620

Glu Lys Val Thr Arg Met Glu Gly Ser Val Asp Leu Leu Gln Thr Arg
625 630 635 640

Phe Ala Arg Ile Leu Ala Glu Tyr Glu Ser Met Gln Gln Lys Leu Lys
645 650 655

Gln Arg Leu Thr Lys Val Glu Lys Phe Leu Lys Pro Leu Ile Asp Thr
660 665 670

Glu Phe Ser Ser Ile Glu Gly Pro Trp Ser Glu Ser Gly Pro Ile Asp
675 680 685

Ser Thr
690

<210> 3

<211> 3231

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(2586)

<223> Homo sapiens phosphodiesterase 6B, cGMP-specific, rod, beta (congenital stationary night blindness 3, autosomal dominant)

<400> 3

```
ctccagggac aggcagccac c atg agc ctc agt gag gag cag gcc cgg agc       51
                        Met Ser Leu Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ser
                        1               5                   10

ttt ctg gac cag aac ccc gat ttt gcc cgc cag tac ttt ggg aag aaa       99
Phe Leu Asp Gln Asn Pro Asp Phe Ala Arg Gln Tyr Phe Gly Lys Lys
                15                  20                  25

ctg agc cct gag aat gtt ggc cgc ggc tgc gag gac ggg tgc ccg ccg      147
Leu Ser Pro Glu Asn Val Gly Arg Gly Cys Glu Asp Gly Cys Pro Pro
            30                  35                  40

gac tgc gac agc ctc cgg gac ctc tgc cag gtg gag gag agc acg gcg      195
Asp Cys Asp Ser Leu Arg Asp Leu Cys Gln Val Glu Glu Ser Thr Ala
        45                  50                  55

ctg ctg gag ctg gtg cag gat atg cag gag agc atc aac atg gag cgc      243
Leu Leu Glu Leu Val Gln Asp Met Gln Glu Ser Ile Asn Met Glu Arg
    60                  65                  70

gtg gtc ttc aag gtc ctg cgg cgc ctc tgc acc ctc ctg cag gcc gac      291
Val Val Phe Lys Val Leu Arg Arg Leu Cys Thr Leu Leu Gln Ala Asp
75                  80                  85                  90

cgc tgc agc ctc ttc atg tac cgc cag cgc aac ggc gtg gcc gag ctg      339
Arg Cys Ser Leu Phe Met Tyr Arg Gln Arg Asn Gly Val Ala Glu Leu
                95                  100                 105

gcc acc agg ctt ttc agc gtg cag ccg gac agc gtc ctg gag gac tgc      387
Ala Thr Arg Leu Phe Ser Val Gln Pro Asp Ser Val Leu Glu Asp Cys
            110                 115                 120

ctg gtg ccc ccc gac tcc gag atc gtc ttc cca ctg gac atc ggg gtc      435
Leu Val Pro Pro Asp Ser Glu Ile Val Phe Pro Leu Asp Ile Gly Val
        125                 130                 135

gtg ggc cac gtg gct cag acc aaa aag atg gtg aac gtc gag gac gtg      483
Val Gly His Val Ala Gln Thr Lys Lys Met Val Asn Val Glu Asp Val
    140                 145                 150

gcc gag tgc cct cac ttc agc tca ttt gct gac gag ctc act gac tac      531
Ala Glu Cys Pro His Phe Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Asp Tyr
155                 160                 165                 170

aag aca aag aat atg ctg gcc aca ccc atc atg aat ggc aaa gac gtc      579
Lys Thr Lys Asn Met Leu Ala Thr Pro Ile Met Asn Gly Lys Asp Val
                175                 180                 185
```

```
gtg gcg gtg atc atg gca gtg aac aag ctc aac ggc cca ttc ttc acc      627
Val Ala Val Ile Met Ala Val Asn Lys Leu Asn Gly Pro Phe Phe Thr
            190                 195                 200

agc gaa gac gaa gat gtg ttc ttg aag tac ctg aat ttt gcc acg ttg      675
Ser Glu Asp Glu Asp Val Phe Leu Lys Tyr Leu Asn Phe Ala Thr Leu
        205                 210                 215

tac ctg aag atc tat cac ctg agc tac ctc cac aac tgc gag acg cgc      723
Tyr Leu Lys Ile Tyr His Leu Ser Tyr Leu His Asn Cys Glu Thr Arg
    220                 225                 230

cgc ggc cag gtg ctg ctg tgg tcg gcc aac aag gtg ttt gag gag ctg      771
Arg Gly Gln Val Leu Leu Trp Ser Ala Asn Lys Val Phe Glu Glu Leu
235                 240                 245                 250

acg gac atc gag agg cag ttc cac aag gcc ttc tac acg gtg cgg gcc      819
Thr Asp Ile Glu Arg Gln Phe His Lys Ala Phe Tyr Thr Val Arg Ala
                255                 260                 265

tac ctc aac tgc gag cgg tac tcc gtg ggc ctc ctg gac atg acc aag      867
Tyr Leu Asn Cys Glu Arg Tyr Ser Val Gly Leu Leu Asp Met Thr Lys
            270                 275                 280

gag aag gaa ttt ttt gac gtg tgg tct gtg ctg atg gga gag tcc cag      915
Glu Lys Glu Phe Phe Asp Val Trp Ser Val Leu Met Gly Glu Ser Gln
        285                 290                 295

ccg tac tcg ggc cca cgc acg cct gat ggc cgg gaa att gtc ttc tac      963
Pro Tyr Ser Gly Pro Arg Thr Pro Asp Gly Arg Glu Ile Val Phe Tyr
    300                 305                 310

aaa gtg atc gac tac atc ctc cac ggc aag gag gag atc aag gtc att     1011
Lys Val Ile Asp Tyr Ile Leu His Gly Lys Glu Glu Ile Lys Val Ile
315                 320                 325                 330

ccc aca ccc tca gcc gat cac tgg gcc ctg gcc agc ggc ctt cca agc     1059
Pro Thr Pro Ser Ala Asp His Trp Ala Leu Ala Ser Gly Leu Pro Ser
                335                 340                 345

tac gtg gca gaa agc ggc ttt att tgt aac atc atg aat gct tcc gct     1107
Tyr Val Ala Glu Ser Gly Phe Ile Cys Asn Ile Met Asn Ala Ser Ala
            350                 355                 360

gac gaa atg ttc aaa ttt cag gaa ggg gcc ctg gac gac tcc ggg tgg     1155
Asp Glu Met Phe Lys Phe Gln Glu Gly Ala Leu Asp Asp Ser Gly Trp
        365                 370                 375

ctc atc aag aat gtg ctg tcc atg ccc atc gtc aac aag aag gag gag     1203
Leu Ile Lys Asn Val Leu Ser Met Pro Ile Val Asn Lys Lys Glu Glu
    380                 385                 390

att gtg gga gtc gcc aca ttt tac aac agg aaa gac ggg aag ccc ttt     1251
Ile Val Gly Val Ala Thr Phe Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Lys Pro Phe
395                 400                 405                 410

gac gaa cag gac gag gtt ctc atg gag tcc ctg aca cag ttc ctg ggc     1299
Asp Glu Gln Asp Glu Val Leu Met Glu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Gly
                415                 420                 425

tgg tca gtg atg aac acc gac acc tac gac aag atg aac aag ctg gag     1347
Trp Ser Val Met Asn Thr Asp Thr Tyr Asp Lys Met Asn Lys Leu Glu
            430                 435                 440
```

```
aac cgc aag gac atc gca cag gac atg gtc ctt tac cac gtg aag tgc     1395
Asn Arg Lys Asp Ile Ala Gln Asp Met Val Leu Tyr His Val Lys Cys
        445                 450                 455

gac agg gac gag atc cag ctc atc ctg cca acc aga gcg cgc ctg ggg     1443
Asp Arg Asp Glu Ile Gln Leu Ile Leu Pro Thr Arg Ala Arg Leu Gly
    460                 465                 470

aag gag cct gct gac tgc gat gag gac gag ctg ggc gaa atc ctg aag     1491
Lys Glu Pro Ala Asp Cys Asp Glu Asp Glu Leu Gly Glu Ile Leu Lys
475                 480                 485                 490

gag gag ctg cca ggg ccc acc aca ttt gac atc tac gaa ttc cac ttc     1539
Glu Glu Leu Pro Gly Pro Thr Thr Phe Asp Ile Tyr Glu Phe His Phe
                495                 500                 505

tct gac ctg gag tgc acc gaa ctg gac ctg gtc aaa tgt ggc atc cag     1587
Ser Asp Leu Glu Cys Thr Glu Leu Asp Leu Val Lys Cys Gly Ile Gln
            510                 515                 520

atg tac tac gag ctg ggc gtg gtc cga aag ttc cag atc ccc cag gag     1635
Met Tyr Tyr Glu Leu Gly Val Val Arg Lys Phe Gln Ile Pro Gln Glu
        525                 530                 535

gtc ctg gtg cgg ttc ctg ttc tcc atc agc aaa ggg tac cgg aga atc     1683
Val Leu Val Arg Phe Leu Phe Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Ile
    540                 545                 550

acc tac cac aac tgg cgc cac ggc ttc aac gtg gcc cag acg atg ttc     1731
Thr Tyr His Asn Trp Arg His Gly Phe Asn Val Ala Gln Thr Met Phe
555                 560                 565                 570

acg ctg ctc atg acc ggc aaa ctg aag agc tac tac acg gac ctg gag     1779
Thr Leu Leu Met Thr Gly Lys Leu Lys Ser Tyr Tyr Thr Asp Leu Glu
                575                 580                 585

gcc ttc gcc atg gtg aca gcc ggc ctg tgc cat gac atc gac cac cgc     1827
Ala Phe Ala Met Val Thr Ala Gly Leu Cys His Asp Ile Asp His Arg
            590                 595                 600

ggc acc aac aac ctg tac cag atg aag tcc cag aac ccc ttg gct aag     1875
Gly Thr Asn Asn Leu Tyr Gln Met Lys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Lys
        605                 610                 615

ctc cac ggc tcc tcg att ttg gag cgg cac cac ctg gag ttt ggg aag     1923
Leu His Gly Ser Ser Ile Leu Glu Arg His His Leu Glu Phe Gly Lys
    620                 625                 630

ttc ctg ctc tcg gag gag acc ctg aac atc tac cag aac ctg aac cgg     1971
Phe Leu Leu Ser Glu Glu Thr Leu Asn Ile Tyr Gln Asn Leu Asn Arg
635                 640                 645                 650

cgg cag cac gag cac gtg atc cac ctg atg gac atc gcc atc atc gcc     2019
Arg Gln His Glu His Val Ile His Leu Met Asp Ile Ala Ile Ile Ala
                655                 660                 665

acg gac ctg gcc ctg tac ttc aag aag aga gcg atg ttt cag aag atc     2067
Thr Asp Leu Ala Leu Tyr Phe Lys Lys Arg Ala Met Phe Gln Lys Ile
            670                 675                 680

gtg gat gag tcc aag aac tac cag gac aag aag agc tgg gtg gag tac     2115
Val Asp Glu Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Lys Lys Ser Trp Val Glu Tyr
```

```
        685                 690                 695

ctg tcc ctg gag acg acc cgg aag gag atc gtc atg gcc atg atg atg     2163
Leu Ser Leu Glu Thr Thr Arg Lys Glu Ile Val Met Ala Met Met Met
    700                 705                 710

aca gcc tgc gac ctg tct gcc atc acc aag ccc tgg gaa gtc cag agc     2211
Thr Ala Cys Asp Leu Ser Ala Ile Thr Lys Pro Trp Glu Val Gln Ser
715                 720                 725                 730

aag gtc gca ctt ctc gtg gct gct gag ttc tgg gag caa ggt gac ttg     2259
Lys Val Ala Leu Leu Val Ala Ala Glu Phe Trp Glu Gln Gly Asp Leu
                735                 740                 745

gaa agg aca gtc ttg gat cag cag ccc att cct atg atg gac cgg aac     2307
Glu Arg Thr Val Leu Asp Gln Gln Pro Ile Pro Met Met Asp Arg Asn
            750                 755                 760

aag gcg gcc gag ctc ccc aag ctg caa gtg ggc ttc atc gac ttc gtg     2355
Lys Ala Ala Glu Leu Pro Lys Leu Gln Val Gly Phe Ile Asp Phe Val
        765                 770                 775

tgc aca ttc gtg tac aag gag ttc tct cgt ttc cac gaa gag atc ctg     2403
Cys Thr Phe Val Tyr Lys Glu Phe Ser Arg Phe His Glu Glu Ile Leu
    780                 785                 790

ccc atg ttc gac cga ctg cag aac aat agg aaa gag tgg aag gcg ctg     2451
Pro Met Phe Asp Arg Leu Gln Asn Asn Arg Lys Glu Trp Lys Ala Leu
795                 800                 805                 810

gct gat gag tat gag gcc aaa gtg aag gct ctg gag gag aag gag gag     2499
Ala Asp Glu Tyr Glu Ala Lys Val Lys Ala Leu Glu Glu Lys Glu Glu
                815                 820                 825

gag gag agg gtg gca gcc aag aaa gta ggc aca gaa att tgc aat ggc     2547
Glu Glu Arg Val Ala Ala Lys Lys Val Gly Thr Glu Ile Cys Asn Gly
            830                 835                 840

ggc cca gca ccc aag tct tca acc tgc tgt atc ctg tga gcactggtcc      2596
Gly Pro Ala Pro Lys Ser Ser Thr Cys Cys Ile Leu
        845                 850

cgtggggacc ctatggctcc ctcaatcttc acccactagg atttgggttc tgcctgtggc   2656

tatttgctac aagaggttag gaagcccaag aaaatgactg aagatcattc tggatatttt   2716

aattttttttt ttttttttttt ttttgagatg gagtcttgct ctgtcaccca ggctggagtg  2776

ccgtggcacg atctcagctc actgcaacct ccacctccca ggttcaagcg attctcgtgc   2836

ctcagcctcc tgagtagctg ggactacagg cgcccaccac cacacatgct aatttttgta   2896

ttttcagtac agatggggtt tcaccatatt gggcaggctg gtctcgaact cctgacctca   2956

ggtgatcacc gcctcagctt cctgaagtgc tgggattaca ggcatgagcc accacgccca   3016

gcctgttttt ataaactgaa gccaactgtg aataaactgt agcctacatt actcatccat   3076

ttttggatag ttaccactgg gagacctttg aaaagggtcc atgaactctg aaatcactga   3136

gaacatttgc agccacacat gtacatatgt gtacacaggt agacagatgg acacaggccg   3196

tttctcatcc agtttaggaa aacacacatg ctcag                              3231
```

<210> 4

<211> 854

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met Ser Leu Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ser Phe Leu Asp Gln Asn Pro
1 5 10 15

Asp Phe Ala Arg Gln Tyr Phe Gly Lys Lys Leu Ser Pro Glu Asn Val
20 25 30

Gly Arg Gly Cys Glu Asp Gly Cys Pro Pro Asp Cys Asp Ser Leu Arg
35 40 45

Asp Leu Cys Gln Val Glu Glu Ser Thr Ala Leu Leu Glu Leu Val Gln
50 55 60

Asp Met Gln Glu Ser Ile Asn Met Glu Arg Val Val Phe Lys Val Leu
65 70 75 80

Arg Arg Leu Cys Thr Leu Leu Gln Ala Asp Arg Cys Ser Leu Phe Met
85 90 95

Tyr Arg Gln Arg Asn Gly Val Ala Glu Leu Ala Thr Arg Leu Phe Ser
100 105 110

Val Gln Pro Asp Ser Val Leu Glu Asp Cys Leu Val Pro Pro Asp Ser
115 120 125

Glu Ile Val Phe Pro Leu Asp Ile Gly Val Val Gly His Val Ala Gln
130 135 140

Thr Lys Lys Met Val Asn Val Glu Asp Val Ala Glu Cys Pro His Phe
145 150 155 160

Ser Ser Phe Ala Asp Glu Leu Thr Asp Tyr Lys Thr Lys Asn Met Leu
165 170 175

Ala Thr Pro Ile Met Asn Gly Lys Asp Val Val Ala Val Ile Met Ala
180 185 190

Val Asn Lys Leu Asn Gly Pro Phe Phe Thr Ser Glu Asp Glu Asp Val

195 200 205

Phe Leu Lys Tyr Leu Asn Phe Ala Thr Leu Tyr Leu Lys Ile Tyr His
210 215 220

Leu Ser Tyr Leu His Asn Cys Glu Thr Arg Arg Gly Gln Val Leu Leu
225 230 235 240

Trp Ser Ala Asn Lys Val Phe Glu Glu Leu Thr Asp Ile Glu Arg Gln
245 250 255

Phe His Lys Ala Phe Tyr Thr Val Arg Ala Tyr Leu Asn Cys Glu Arg
260 265 270

Tyr Ser Val Gly Leu Leu Asp Met Thr Lys Glu Lys Glu Phe Phe Asp
275 280 285

Val Trp Ser Val Leu Met Gly Glu Ser Gln Pro Tyr Ser Gly Pro Arg
290 295 300

Thr Pro Asp Gly Arg Glu Ile Val Phe Tyr Lys Val Ile Asp Tyr Ile
305 310 315 320

Leu His Gly Lys Glu Glu Ile Lys Val Ile Pro Thr Pro Ser Ala Asp
325 330 335

His Trp Ala Leu Ala Ser Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ala Glu Ser Gly
340 345 350

Phe Ile Cys Asn Ile Met Asn Ala Ser Ala Asp Glu Met Phe Lys Phe
355 360 365

Gln Glu Gly Ala Leu Asp Asp Ser Gly Trp Leu Ile Lys Asn Val Leu
370 375 380

Ser Met Pro Ile Val Asn Lys Lys Glu Glu Ile Val Gly Val Ala Thr
385 390 395 400

Phe Tyr Asn Arg Lys Asp Gly Lys Pro Phe Asp Glu Gln Asp Glu Val
405 410 415

Leu Met Glu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Gly Trp Ser Val Met Asn Thr
420 425 430

Asp Thr Tyr Asp Lys Met Asn Lys Leu Glu Asn Arg Lys Asp Ile Ala
435 440 445

Gln Asp Met Val Leu Tyr His Val Lys Cys Asp Arg Asp Glu Ile Gln
450 455 460

Leu Ile Leu Pro Thr Arg Ala Arg Leu Gly Lys Glu Pro Ala Asp Cys
465 470 475 480

Asp Glu Asp Glu Leu Gly Glu Ile Leu Lys Glu Glu Leu Pro Gly Pro
485 490 495

Thr Thr Phe Asp Ile Tyr Glu Phe His Phe Ser Asp Leu Glu Cys Thr
500 505 510

Glu Leu Asp Leu Val Lys Cys Gly Ile Gln Met Tyr Tyr Glu Leu Gly
515 520 525

Val Val Arg Lys Phe Gln Ile Pro Gln Glu Val Leu Val Arg Phe Leu
530 535 540

Phe Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Ile Thr Tyr His Asn Trp Arg
545 550 555 560

His Gly Phe Asn Val Ala Gln Thr Met Phe Thr Leu Leu Met Thr Gly
565 570 575

Lys Leu Lys Ser Tyr Tyr Thr Asp Leu Glu Ala Phe Ala Met Val Thr
580 585 590

Ala Gly Leu Cys His Asp Ile Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Leu Tyr
595 600 605

Gln Met Lys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Lys Leu His Gly Ser Ser Ile
610 615 620

Leu Glu Arg His His Leu Glu Phe Gly Lys Phe Leu Leu Ser Glu Glu
625 630 635 640

Thr Leu Asn Ile Tyr Gln Asn Leu Asn Arg Arg Gln His Glu His Val
645 650 655

Ile His Leu Met Asp Ile Ala Ile Ile Ala Thr Asp Leu Ala Leu Tyr
660 665 670

Phe Lys Lys Arg Ala Met Phe Gln Lys Ile Val Asp Glu Ser Lys Asn
675 680 685

Tyr Gln Asp Lys Lys Ser Trp Val Glu Tyr Leu Ser Leu Glu Thr Thr
690 695 700

Arg Lys Glu Ile Val Met Ala Met Met Met Thr Ala Cys Asp Leu Ser
705 710 715 720

Ala Ile Thr Lys Pro Trp Glu Val Gln Ser Lys Val Ala Leu Leu Val
725 730 735

Ala Ala Glu Phe Trp Glu Gln Gly Asp Leu Glu Arg Thr Val Leu Asp
740 745 750

Gln Gln Pro Ile Pro Met Met Asp Arg Asn Lys Ala Ala Glu Leu Pro
755 760 765

Lys Leu Gln Val Gly Phe Ile Asp Phe Val Cys Thr Phe Val Tyr Lys
770 775 780

Glu Phe Ser Arg Phe His Glu Glu Ile Leu Pro Met Phe Asp Arg Leu
785 790 795 800

Gln Asn Asn Arg Lys Glu Trp Lys Ala Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Ala
805 810 815

Lys Val Lys Ala Leu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Arg Val Ala Ala
820 825 830

Lys Lys Val Gly Thr Glu Ile Cys Asn Gly Gly Pro Ala Pro Lys Ser
835 840 845

Ser Thr Cys Cys Ile Leu
850

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5
gcaagctgac cctgaagttc a 21

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<400> 6
gcaagcugac ccugaaguu 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial

<400> 7
aacuucaggg ucagcuugc 19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8
aattctccga acgtgtcacg t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial

<400> 9
uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA/RNA

<213> Artificial

<400> 10
acgugacacg uucggagaat t 21

【図１】

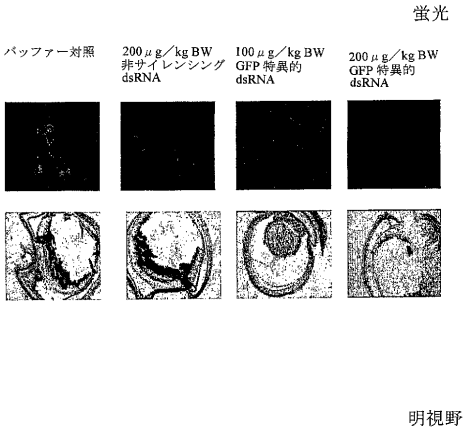

蛍光
バッファー対照
200μg／kg BW 非サイレンシング dsRNA
100μg／kg BW GFP 特異的 dsRNA
200μg／kg BW GFP 特異的 dsRNA
明視野

Figure 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/04003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 A61K48/00 A61K31/713 A61K9/08 C12Q1/68
C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 G01N33/68
A01K67/027

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 C12N A61K C12Q C07K G01N A01K

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 82900 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (US); PARDRIGE WILLIAM M.) 8 November 2001 (2001-11-08)	1,2,9, 11-13, 17,18, 20-22
Y	the whole document	14-16
Y	WO 00 63364 A (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION; PACHUK CATHERINE SATISHCHANDRAN C.) 26 October 2000 (2000-10-26) page 21 page 39 -page 42; example 3	14-16
A	WO 01 75164 A (WHITEHEAD INST; MAX PLANCK; MIT; MASSACHUSSETS UNIV; TUSCHL; SHARP ET) 11 October 2001 (2001-10-11) cited in the application the whole document	15,16

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 January 2004	06 FEB 2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Macchia, G

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/04003

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1 and 3-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search, has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [X] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-23, all partially insofar as they refer to subject-matter related to the inventions 1, 6 and 7.

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 /04003

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 2, 9, 11-18, 20-22 all partially

A method for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS) comprising administering to a subject a composition comprising a compound capable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-brain barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS), wherein said composition is designed to be applied outside the blood-brain barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a nucleic acid molecule (ribozyme, antisense).
Methods or uses related thereto.

2. Claims: 1, 2, 9, 11-18, 20-22 all partially, if and where applicable

A method for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS) comprising administering to a subject a composition comprising a compound capable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-brain barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS), wherein said composition is designed to be applied outside the blood-brain barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a nucleic acid molecule (sense nucleic acid molecule).
Methods or uses related thereto.

3. Claims: 1, 2, 9, 11, 20-22 all partially

A method for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS) comprising administering to a subject a composition comprising a compound capable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-brain barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

composition for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS), wherein said composition is designed to be applied outside the blood-brain barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a polypeptide.
Methods or uses related thereto.

4. Claims: 1, 2, 9-11, 20-22 all partially

A method for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS) comprising administering to a subject a composition comprising a compound capable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-brain barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS), wherein said composition is designed to be applied outside the blood-brain barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from an antibody.
Methods or uses related thereto.

5. Claims: 1, 2, 9, 11, 20-22 all partially

A method for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS) comprising administering to a subject a composition comprising a compound capable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-brain barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the central nervous system (CNS), wherein said composition is designed to be applied outside the blood-brain barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a ligand binding molecule of said gene or gene product.
Methods or uses related thereto.

6. Claims: 1-23 all partially

A method for the treatment of a disorder of the eye comprising administering to a subject a composition comprising a compound caable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-retina

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the eye, wherein said composition is designed to be applied outside the blood-retina barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a nucleic acid molecule (ribozyme, antisense).
Methods or uses related thereto.

7. Claims: 1-23 all partially, if and where applicable

A method for the treatment of a disorder of the eye comprising administering to a subject a composition comprising a compound caable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-retina barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the eye, wherein said composition is designed to be applied outside the blood-retina barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a nucleic acid molecule (sense nucleic acid molecule).
Methods or uses related thereto.

8. Claims: 1-11, 19-23 all partially

A method for the treatment of a disorder of the eye comprising administering to a subject a composition comprising a compound caable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-retina barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the eye, wherein said composition is designed to be applied outside the blood-retina barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a polypeptide.
Methods or uses related thereto.

9. Claims: 1-11, 19-23 all partially

A method for the treatment of a disorder of the eye

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

comprising administering to a subject a composition comprising a compound caable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-retina barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the eye, wherein said composition is designed to be applied outside the blood-retina barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from an antibody.
Methods or uses related thereto.

10. Claims: 1-11, 19-23 all partially

A method for the treatment of a disorder of the eye comprising administering to a subject a composition comprising a compound caable of modulating a target gene or gene product in a therapeutically effective amount, wherein said composition is administered outside the blood-retina barrier.
Use of a compound capable of modulating a target gene or gene product for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a disorder of the eye, wherein said composition is designed to be applied outside the blood-retina barrier.
Said method or use wherein said compound is an inhibitor/antagonist of said target gene or gene product, said inhibitor/antagonist being derived from a ligand binding molecule of said gene or gene product.
Methods or uses related thereto.

11. Claims: 24-90 all totally

A method as defined in claim 24.
Methods, products, compositions, uses, kits, chips related thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/04003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 20579 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); PRICE JACK) 12 June 1997 (1997-06-12) the whole document	1,2,9, 11-14, 17,18, 20-22
X	WO 01 98522 A (YISSUM RES DEV CO UNIV JERUSALEM; KATZHENDLER SCHLOSSMAN NAJAJREH GIBS) 27 December 2001 (2001-12-27) the whole document	1,2,9, 11,12, 20-22
X	WO 97 18855 A (LERNER EDUARD NAUMOVICH; LERNER LEONID) 29 May 1997 (1997-05-29) the whole document	1,2,22
A	GAN L. ET AL.: "Specific interference of gene function by double-stranded RNA in neuronal cell lines" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 2, 2001, page 2051 XP002259262 the whole document	14
A	EP 0 308 066 A (HEM RESEARCH, INC. (US); CARTER WILLIAM A.) 22 March 1989 (1989-03-22) page 2, line 40 page 3, line 28-30	14
A	WO 98 22132 A (YISSUM RES DEV CO HEBREW UNIV JERUSALEM; SOREQ FRIEDMAN SEIDMAN KAUFER) 28 May 1998 (1998-05-28) page 15, line 23-26	21
A	DZITOYEVA S. ET AL.: "Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous system" MOLECULAR PSYCHIATRY, vol. 6, no. 6, November 2001 (2001-11), pages 665-670, XP008023738 the whole document	
A	WO 98 56361 A (MEDINOVA MEDICAL CONSULTING GMBH (DE); SABEL BERNHARD A.; SCHROEDER U.) 17 December 1998 (1998-12-17)	
X	WO 01 83729 A (NOVARTIS AG (CH); SCRIPPS RES INST; NEMEROW; VON SEGGERN; FRIEDLANDER) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document page 17	1-3,7-9, 11,12, 18,20, 21,23

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/04003

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 36646 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH LIM (GB) ZERNICKA-GOETZ; WIANNY; EVANS GLOVER) 25 May 2001 (2001-05-25) page 15 -page 18	1-3,8,9, 11-18, 21,23
A	WO 00 44914 A (MEDICAL COLLEGE OF GEORGIA RESEARCH INSTITUTE (US); LI; FARRELL; KIRBY) 3 August 2000 (2000-08-03) page 47 -page 54; claims	
X	US 5 550 289 A (SINTEX USA INC; EPPSTEIN D.A; FELGNER P.L; GADEK T.R; JONES G.H; ROMAN) 27 August 1996 (1996-08-27) column 4, line 12-14 column 8, line 55 column 10, line 34-37	1-3, 7-12,17, 18,20, 21,23
P,X	WO 02 088320 A (UNIVERSITY OF FLORIDA; LEWIN ALFRED S; SHAW LYNN C.; GRANT MARIA B.) 7 November 2002 (2002-11-07) the whole document page 81 -page 82; example 7 page 92 -page 100; claims	1-13, 17-23
A	PINEDA D. ET AL.: "The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent" DEVELOPMENT, vol. 129, March 2002 (2002-03), pages 1423-1434, XP002259263 the whole document	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/04003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0182900	A	08-11-2001	US	6372250 B1	16-04-2002
			AU	5364601 A	12-11-2001
			CA	2403501 A1	08-11-2001
			EP	1282403 A1	12-02-2003
			WO	0182900 A1	08-11-2001
			US	2002054902 A1	09-05-2002
WO 0063364	A	26-10-2000	AU	4472100 A	02-11-2000
			BR	0009884 A	08-01-2002
			CA	2370628 A1	26-10-2000
			CN	1375004 T	16-10-2002
			EP	1171586 A2	16-01-2002
			JP	2002542263 T	10-12-2002
			WO	0063364 A2	26-10-2000
WO 0175164	A	11-10-2001	AU	3574402 A	11-06-2002
			AU	4962201 A	15-10-2001
			CA	2404890 A1	11-10-2001
			CA	2429814 A1	06-06-2002
			CZ	20031839 A3	15-10-2003
			WO	0244321 A2	06-06-2002
			EP	1309726 A2	14-05-2003
			HU	0302557 A2	28-10-2003
			JP	2003529374 T	07-10-2003
			NO	20032464 A	21-07-2003
			WO	0175164 A2	11-10-2001
			US	2003108923 A1	12-06-2003
			US	2002086356 A1	04-07-2002
WO 9720579	A	12-06-1997	WO	9720579 A2	12-06-1997
WO 0198522	A	27-12-2001	AU	6778801 A	02-01-2002
			CA	2413556 A1	27-12-2001
			EP	1292606 A2	19-03-2003
			WO	0198522 A2	27-12-2001
WO 9718855	A	29-05-1997	AU	7693296 A	11-06-1997
			CA	2238055 A1	29-05-1997
			WO	9718855 A1	29-05-1997
			EP	0869829 A1	14-10-1998
			JP	2000500999 T	02-02-2000
			US	2002123678 A1	05-09-2002
			US	2003191426 A1	09-10-2003
EP 0308066	A	22-03-1989	AT	132041 T	15-01-1996
			AU	1001595 A	23-02-1995
			AU	1736792 A	30-07-1992
			AU	2053588 A	20-04-1989
			AU	4849897 A	12-03-1998
			CA	1327002 C	15-02-1994
			CN	1032740 A ,B	10-05-1989
			DE	3854829 D1	08-02-1996
			DE	3854829 T2	14-08-1996
			DK	449888 A	13-02-1989
			EP	0308066 A2	22-03-1989
			FI	883763 A	13-02-1989
			HU	47854 A2	28-04-1989
			IE	72103 B1	12-03-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/04003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0308066	A		JP	1131119 A	24-05-1989
			KR	131879 B1	17-04-1998
			NO	883594 A	13-02-1989
			NZ	225799 A	26-04-1991
			OA	8901 A	31-10-1989
			PT	88266 A ,B	30-06-1989
			SU	1834663 A3	15-08-1993
			US	5683986 A	04-11-1997
			ZA	8805967 A	26-07-1989
WO 9822132	A	28-05-1998	AU	732043 B2	12-04-2001
			AU	5364298 A	10-06-1998
			CA	2272280 A1	28-05-1998
			EP	0957932 A2	24-11-1999
			JP	2002512592 T	23-04-2002
			WO	9822132 A1	28-05-1998
			US	6025183 A	15-02-2000
			US	6110742 A	29-08-2000
			US	6258780 B1	10-07-2001
			AU	727611 B2	14-12-2000
			AU	5385698 A	03-07-1998
			EP	0951536 A1	27-10-1999
			JP	2001510336 T	31-07-2001
			WO	9826062 A2	18-06-1998
			US	6121046 A	19-09-2000
WO 9856361	A	17-12-1998	WO	9856361 A1	17-12-1998
			AU	3176097 A	30-12-1998
			EP	0986373 A1	22-03-2000
			JP	2001502721 T	27-02-2001
			US	2002034474 A1	21-03-2002
WO 0183729	A	08-11-2001	AU	9519301 A	12-11-2001
			CA	2407881 A1	08-11-2001
			WO	0183729 A2	08-11-2001
			EP	1280929 A2	05-02-2003
			JP	2003531609 T	28-10-2003
			US	2002193327 A1	19-12-2002
WO 0136646	A	25-05-2001	AU	1406501 A	30-05-2001
			CA	2391622 A1	25-05-2001
			DE	1230375 T1	09-01-2003
			EP	1230375 A1	14-08-2002
			WO	0136646 A1	25-05-2001
			JP	2003514533 T	22-04-2003
			NO	20022359 A	18-07-2002
			US	2003027783 A1	06-02-2003
			ZA	200203816 A	02-01-2003
WO 0044914	A	03-08-2000	AU	2634800 A	18-08-2000
			CA	2361201 A1	03-08-2000
			EP	1147204 A1	24-10-2001
			WO	0044914 A1	03-08-2000
			US	2002114784 A1	22-08-2002
US 5550289	A	27-08-1996	US	5622712 A	22-04-1997
			US	5366737 A	22-11-1994
			US	5208036 A	04-05-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 03/04003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5550289 A		US 5049386 A	17-09-1991
		US 4946787 A	07-08-1990
		US 4897355 A	30-01-1990
		US 6387395 B1	14-05-2002
		US 5545412 A	13-08-1996
		AT 50983 T	15-03-1990
		AU 594654 B2	15-03-1990
		AU 5185386 A	17-07-1986
		CA 1288774 C	10-09-1991
		DE 3669503 D1	19-04-1990
		EP 0187702 A1	16-07-1986
		JP 1935808 C	26-05-1995
		JP 6062517 B	17-08-1994
		JP 61161246 A	21-07-1986
		JP 2546623 B2	23-10-1996
		JP 7070011 A	14-03-1995
		NZ 214716 A	26-04-1989
		ZA 8600081 A	26-08-1987
WO 02088320 A	07-11-2002	WO 02088320 A2	07-11-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61K 48/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 45/00		４Ｃ０８４
A61P 25/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８５
A61P 27/02	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 25/00		４Ｃ０８６
C07K 14/435	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ 27/02		４Ｈ０４５
C07K 16/18	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ 14/435		
C12P 21/02	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ 16/18		
C12Q 1/02	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ 21/02	C	
C12Q 1/68	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ 1/02		
G01N 33/15	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｑ 1/68	A	
G01N 33/50	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ 33/15	Z	
G01N 33/53	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ 33/50	Z	
G01N 33/566	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ 33/53	D	
C12N 5/10	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ 33/53	M	
		Ｇ０１Ｎ 33/566		
		Ｃ１２Ｎ 15/00	F	
		Ｃ１２Ｎ 5/00	B	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 シュロール、ステファン、フベルト
ドイツ国、９７８２８ マルクセイデンフェルド、アルフレッドーデルプーエスティーアール．９シー
(72)発明者 ゴーリング、フランク
ドイツ国、９７０７６ ヴルツブルグ、ロベルトーキルヒホフーシュトラッセ ３５

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 DA02 EA04 HA12 HA17
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ20 QQ42 QR32 QR55 QS25 QS33 QS34
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA91X AA91Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA17 ZA021 ZA022 ZA331 ZA332 ZA362 ZB212
4C085 AA13 AA14 BB23 DD63 DD88
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA10 ZA02 ZA33
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 EA21 EA50 FA74