

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6625064号
(P6625064)

(45) 発行日 令和1年12月25日 (2019. 12. 25)

(24) 登録日 令和1年12月6日 (2019. 12. 6)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/416	(2006. 01)	A 6 1 K	31/416
A 6 1 K	45/00	(2006. 01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	27/02	(2006. 01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	27/06	(2006. 01)	A 6 1 P	27/06
A 6 1 P	27/12	(2006. 01)	A 6 1 P	27/12

請求項の数 14 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-567824 (P2016-567824)
(86) (22) 出願日	平成27年5月15日 (2015. 5. 15)
(65) 公表番号	特表2017-520527 (P2017-520527A)
(43) 公表日	平成29年7月27日 (2017. 7. 27)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/053609
(87) 国際公開番号	W02015/173786
(87) 国際公開日	平成27年11月19日 (2015. 11. 19)
審査請求日	平成30年5月14日 (2018. 5. 14)
(31) 優先権主張番号	61/993, 915
(32) 優先日	平成26年5月15日 (2014. 5. 15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	62/064, 344
(32) 優先日	平成26年10月15日 (2014. 10. 15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者	514277709
	トランスレイタム メディカス インコーポレイテッド
	カナダ国, オンタリオ州 エム5エー 3
	エス9, トロント, 112 ジョージ ストリート, ユニット 2107
(74) 代理人	100114775
	弁理士 高岡 亮一
(74) 代理人	100121511
	弁理士 小田 直
(74) 代理人	100202751
	弁理士 岩堀 明代
(74) 代理人	100191086
	弁理士 高橋 香元

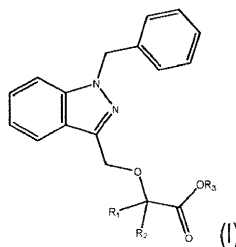
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 眼障害を治療かつ診断するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

眼への投与を介して、対象の糖尿病性眼疾患の治療に用いる医薬組成物であって、式 I 【化 1】



の化合物（式中、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである。）またはその薬学的に許容可能な塩の治療有効量を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

前記化合物がビンダリットである、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記糖尿病性眼疾患が、糖尿病性網膜症または糖尿病性黄斑浮腫（DME）である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記糖尿病性眼疾患が、白内障または緑内障である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記対象は、1 型または 2 型の糖尿病を有する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記対象は、正常レベルを超える血中グルコースレベルを有する、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記対象の眼の細胞における核への NF- κ B の転位を低減する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

高血糖細胞における細胞ストレスを正常にする、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記対象の Ccl2、Crp、Icam1、および Vcam1 のうちの一つ以上の発現を減少させる、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記医薬組成物は、さらに一つ以上の追加的な治療剤を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記一つ以上の追加的な治療剤は、抗 VEGF 剤、ACE 阻害剤、PPAR- γ アゴニスト若しくは部分的なアゴニスト、レニン阻害剤、ステロイド、オートファジーを調節する薬剤、セマピモド、MIF 阻害剤、CCR2 阻害剤、CKR-28、2-チオイミダゾール、CAS 445479-97-0、CCX140、クロドロネート-リポソーム製剤、および塩化ガドリニウムから選択される、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記化合物は眼への投与のために製剤化されている、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記眼への投与は、硝子体内または眼球内の投与である、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記化合物は、制御された放出または徐放のために製剤化されている、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2014 年 5 月 15 日に出願の米国特許仮出願番号第 61/993,915 号、2014 年 10 月 15 日に出願の第 62/064,344 号、2014 年 11 月 6 日に
出願の第 62/076,162 号、および 2015 年 5 月 6 日に出願の第 62/157,773 号の利益を主張するものであり、これら全体は、参照として本明細書中に援用されている。

【0002】

本発明は、部分的に、眼障害の診断、治療、または予防に有益である方法および組成物であって、これらの障害に有効である免疫調節剤を含む、薬剤の発見を含む、方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

視界を低減または除去する可能性のある眼障害は、とりわけ深刻な医療上の問題である。

【0004】

たとえば、加齢黄斑変性（AMD）は、眼の機能障害の主な原因であり、特に50歳以上の患者における不可逆的な失明を含む。全患者は、初期のいわゆる「非滲出型」AMDに端を発する。これは、黄斑として知られている眼の後局部に臨床的に見ることができる沈着物を特徴とする。進行したAMDは、2つの形態—末期「滲出型」または末期「非滲出型」を取り得る。進行した「滲出型」AMDにおける主な薬学的な選択肢は、抗血管新生剤の定期的な眼内注射である。これらの注射は、網膜中心の下でまたは中に病態となる新規血管が増殖した後に行われている。ここでの血管は漏出し、出血し、または組織の損傷および瘢痕を引き起こす。対照的に、末期または初期の非滲出型AMDの治療は存在しない。末期非滲出型AMDは、光受容体およびそのナース細胞である網膜色素上皮（RPE）の死または萎縮症を特徴とする。組織の喪失のパッチは、「地図状萎縮」（GA）として知られている。

10

【0005】

よって、現在、眼障害の有効な治療にあてはまる薬剤が不足している。よって、これらの障害の治療に有用な治療が依然として必要とされている。さらに、これら障害の有効な診断およびこれらの障害の治療に応答する患者の集合の同定が、必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0006】

よって、一態様では、本発明は、眼障害またはその末期の失明する合併症を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含み、前記薬剤が、任意に、免疫調節剤（任意に、MCP-1、MCP-2、およびMCP-3を含む単球走化性タンパク質（MCP）—調節剤から選択される）であり、ビンダリットなどの（本明細書中に定義されている）式Iの化合物（場合によっては本明細書中でTMi-018と呼ばれる）、PPAR γ モジュレータ、遊走阻止因子（MIF）阻害剤、およびケモカイン受容体2（CCR2）阻害剤を含む、方法を提供する。一部の実施形態では、免疫調節剤はマクロファージを標的とする。一部の実施形態では、免疫調節剤は、M1/M2の分極化を調節する。一部の実施形態では、免疫調節剤は、特異的に、対象のM1マクロファージおよびM2マクロファージのうちの1つまたは複数

を調節する。一部の実施形態では、免疫調節剤は、対象のM1マクロファージの活性を調節（たとえば低減）し、かつ/または対象のM2マクロファージの活性を調節（たとえば増大もしくは維持）する。一部の態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量を、その必要がある対象に投与することを含み、上記対象が、CD64、IDO、SOCS1、CXCL10 Marco、Nos2、IL12b、Ptgs2（Cox2）、IL23 α （IL23p19）、Ido1、Adipoq、Ccl20、SoCS3、Stat1、IL-6、およびIL17（サブタイプa）のうちの1つまたは複数の異常な（たとえば非疾患状態と比較して、たとえば増加または減少する）発現または活性を有する、方法に関する。一部の態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含み、上記対象が、Ccl5、CD163、Cx3Cr1、Faslg、Gfap、Csrf2、Icam1、Ifng、IL10、IL12b、IL13、IL17a、IL18、IL1b、IL22、IL4、IL6、Klf4、Mrc1、Myd88、Nlrp3、Nos2、Ppar γ 、Tgfb1、Tlr4、Tnf、Vcam1、MCP-1（Ccl2）、MCP-2（Ccl5）、MCP-3（Ccl7）、Ccr2、SoCS1、SoCS3、Stat1、Stat3、およびStat6のうちの1つまたは複数の異常な（たとえば非疾患状態と比較して、たとえば増加または減少する）発現または活性を有する、方法に関する。一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP調節剤の有効量をその必要がある対象に投与

30

40

50

することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、MCP調節剤は、MCP遺伝子プロモーター／エンハンサー領域の近位領域、遠位領域、または他の制御領域を標的とする。一部の実施形態では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-1および／またはMCP-2および／またはMCP-3調節剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含む、方法に関する。

【0007】

様々な態様では、本方法は、対象の集合を選択するのに使用することができる。たとえば、本方法は、薬剤がビンダリットを含む本明細書中に記載の式Iの化合物であり、かつ眼障害が非滲出型AMDまたは網状偽ドルーゼン(RPD)(ドルーゼン様沈着、網状黄斑疾患とも呼ばれる)である実施形態を含むものであり、抗D因子抗体(たとえばランパ
10
リズマブ(Genentech))、抗 β アミロイド(抗A β)抗体(たとえばGSK933776(GSK))、コルチコステロイド(たとえばフルオシノロンアセトニド)、MC-1101(MacuCLEAR)、CD34+幹細胞療法、抗VEGF抗体(たとえばラニビズマブ)、プリモニジン(アルファガン)、抗補体C5抗体(たとえばLFG316(Novartis))、ドキシサイクリン(ORACEA)、エミクススタト塩酸塩、シロリムス(RAPAMUNE)、およびグラチラマー酢酸塩(COPAXONE)のうちの1つまたは複数で治療されていない、または治療を受けている、かつ／またはこの治療から利益を受けている、かつ／またはこれら1つまたは複数に非応答である、対象に関連する。薬剤がビンダリットを含む本明細書中に記載の式Iの化合物であり、眼
20
障害が非滲出型AMDまたはRPDである実施形態を含む様々な実施形態では、対象は、以下：事前のまたは活動性の脈絡膜血管新生(CNV)のエビデンスを伴う、または伴うことのない、1つまたは複数の眼における、直径約125 μ m超の少なくとも1つのドルーゼン、1つまたは複数の良好に画定された総面積約2~20mm²のGA病変領域、約35文字超の最高矯正視力スコア、または20/200以上に相当するスネレン視力のうちの1つまたは複数
30
を有することにより、分類されていてもよい。様々な実施形態では、対象は、以下：網膜下のドルーゼン様沈着および／または網状偽ドルーゼンおよび／または「びまん性-しずく型疾患(diffuse trickling disease)」、および／またはGAの境界もしくは結合性領域の周辺領域における過蛍光性眼底自発蛍光(FAF)の他の疾患のうちの1つまたは複数
40
を有することにより、分類されてもよい。様々な実施形態では、対象は、正面(en-face)のイメージングで見られるように(たとえば白色眼底検査、青色光、近赤外線、赤外線、またはマルチカラーのイメージングにより観察可能である)、標的の病変を形成する多中心であり得る小さな丸形の斑点、またはインターレース状(inter-lacing)のリボンのうちの1つまたは複数
50
を有することにより、分類されてもよい。患者は、これらの既知の診断、または一部の実施形態では、網膜外層の歪みをもたらす得る網膜下または網膜内の流体を特徴とする障害のうちの1つまたは複数
60
を有し得る。患者は、本明細書中に提供されるいずれかの眼障害に罹患していてもよい。

【0008】

一態様では、本発明は、眼障害の治療に有効な薬剤を作製する方法であって、

(a)

i) 眼に(1)上記動物の眼障害の存在を示すために有効な量の蛍光性化合物と、(2)眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素を含む動物に試験化合物の有効量を投与することと、

ii) 上記蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に、上記眼を曝露することと、

iii) 上記眼の蛍光パターンを、蛍光性化合物および毒素を含むが、試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、

(iv) ステップ(iii)の比較の結果が、上記試験化合物が眼障害の治療に有用であることを示す場合に、上記試験化合物を候補化合物として選択することとにより、薬剤を同定することと、

10

20

30

40

50

(b) 上記同定した薬剤を、眼に投与するために製剤化することを含む、方法を提供する。一部の態様では、眼障害を治療または予防する方法であって、上述の方法を使用する際に作製される眼障害の治療に有効な薬剤のいずれか1つである薬剤の有効量と、薬学的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬組成物を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。眼障害の治療に有効である例示的な薬剤は、(たとえば「本発明の薬剤」として) 本明細書中に列挙されている。

【0009】

様々な態様では、本発明は、眼障害(限定するものではないがAMDおよびRPDを含む)の診断および/または予後および/または進行の代用となるバイオマーカーとしての、遅延性の近赤外線解析(DNIRA)の使用に関連する。様々な態様では、さらに本発明は、臨床試験の設計のための受け入れ(entrance inclusion)、除外基準、またはエンドポイント解析としてのDNIRAの使用に関する

10

【0010】

様々な態様では、本発明は、糖尿病性眼疾患(たとえば糖尿病性網膜症およびDME)、フォクト・小柳・原田病(VKH);サルコイドブドウ膜炎;眼ヒストプラスマ症および/または推定眼ヒストプラスマ症候群;自己免疫性ブドウ膜炎;全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎;後部ぶどう膜炎(Posterior uveitis)(まだ診断されて得ないものを含む);前部ブドウ膜炎(たとえば虹彩炎);ベーチェット病;結節性多発動脈炎;ならびにウェゲナー肉芽腫症のうちの1つまたは複数、を限定するものではないが、ビンダリットなどの式Iの化合物を含む本明細書中に記載の薬剤のいずれかで治療する方法に関する。一部の実施形態では、ビンダリットなどの式Iの化合物をその必要がある患者に投与することにより、糖尿病性網膜症を治療する方法を提供する。

20

【0011】

様々な態様では、本発明は、非滲出型AMDまたはRPDを治療する方法であって、ビンダリットなどの式Iの化合物、およびランパリズマブ(Lampalizumab)などの補体D因子阻害剤の有効量を、その必要がある患者に投与することを含む、方法に関する。

【0012】

本発明の詳細は、以下に付随する説明に記載されている。本明細書中に記載の方法および材料と類似または均等なものは、本発明の実務または試験に使用することができるが、ここでは例示的な方法および材料が記載されている。本発明の他の特徴、対象、および利点は、詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。本明細書および添付の特許請求の範囲では、単数形は、特段他の記載が明確に指示されていない限り、複数形をも含む。特段他の定義がない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同一の意味を有する。

30

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A-D】NaIO₃の注射後のin vivoでのFAFのイメージングが、網状のパターンを呈する損傷の地図状な領域を同定することを示す。ICG血管造影は、一過性の脈絡網膜の透過性を同定する。

40

【図1A】視神経乳頭周辺の初期FAFの変化の時間経過を示す。過蛍光の線または境界が、NaIO₃注射から2~3日後に形成された。この境界は、視神経乳頭を完全に囲み得る、または囲み得るものではなく、視神経乳頭に近接するものではない。蛍光のレース状または網状のパターンは、3日目および7日目の間に現れ、この線の周辺に形成された。7日目までに、このパターンは明確となった。

【図1B】視神経乳頭および中央周辺網膜(mid-peripheral retina)を含む合成した画像であり、過蛍光の境界が、将来のレース状または網状の過蛍光の領域を画定したことを示す。この例では、NaIO₃投与後3日目に見られた境界が、網

50

膜下部の島を画定した。7日目までには、境界はもはや見ることができず、代わりに広範囲の網状のパターンが出現した。3日目および7日目での2つの異なる島を示す画像は、異なる動物由来であり、どのくらい一貫してこのパターンが観察されたかを示す。これらのような小さな島は、眼の約7%で観察された。

【図1C】FAFのパターンが、フルオレセインで見られた網膜および脈絡膜の脈管構造のパターン（それぞれ、内部および中央の網膜の左および中央の画像）、または脈絡膜のICG血管造影（右の画像）と明確に異なることを示す。

【図1D】パターンの進行の約2日前に起こった経上皮の透過性の一過性の増大を示し、これは、ICGの血管造影（色素注入から約6分間後、790nm）の間の顕著なフラッシュにより明らかである。このICGフラッシュは、毒素注射の1日後では検出されておらず、一時的に現れ、3日目または4日目に定例的に試験した次の時点にまでにはほとんど見られない。

【図2A-D】大きな360°のリングにおけるNaIO₃注射後のFAFの変化の成熟度を示す。

【図2A】乳頭周囲および周辺の網膜の境界の両方により画定された、後極の大部分および同定された360°のリングの損傷を含む大きな合成したFAF画像を示す。NaIO₃から7日後に撮影したFAFの画像は、長円、円形、貝殻状、ロゼット、または動物の足跡のパターンを形成する曲線の過蛍光の別々かつ近接した複数の領域を同定した。これらは、概して、7日目および14日目の間で現れた。詳細は、上部の拡大図に提供されている。これらの複合的なFAFパターンは、初期の過蛍光の境界内で起こり、経時的に合

【図2B】14日目までに、大部分の動物が360°のリング全体にわたる網状の過蛍光の密接に近接したパターンを示すことを示す。詳細は、中央のボックスに提供されている。

【図2C】NaIO₃曝露から28日目までに、パターンはより顆粒の外観をとることを示す。パターンがあまり明らかではない小さな領域は、より暗く、灰色の領域として見えている。

【図2D】比較のために、FAFの「びまん性-しずく型（diffuse trickling）」の臨床画像を示す。本発明は、特に、周辺の過蛍光に関連する、網状、小葉状、または貝殻状の長円の灰色の低蛍光を含む多くの特徴をまとめている。

【図3A-C】網膜外部の曲線の網状のパターンが、NaIO₃注射から数週間以内に発症することを示す。

【図3A】このパターンが自己蛍光細胞の分布と対応することを示す。低電力（1×、左の縦列；5×、右の縦列）の白色光の、NaIO₃注射前（ベースライン）、および注射から4日後および7日後に撮影した、摘出した網膜全載の画像が示されている。わずかな曲線パターンが、ベースラインと比較して3〜4日後に認められ、7日目に明確となっている。

【図3B】NaIO₃から14日目までに、この網状のパターンが顕著になり、網膜外部の全体の変形と対応することを示す。これは、減張切開の部位で見られる断面図においてノッチまたはひだとして現れる（ボックスで拡大）。

【図3C】細胞染色を伴わない、488nmチャンネルにおいて落射蛍光顕微鏡が、網状の溝の中にある自己蛍光細胞の存在を示したことを示す。このことは、幅広い光の発光（左の縦列）ならびに狭い励起および発光（右の縦列）を使用することにより両方で明らかであり、FAFイメージングの間に使用される波長に対応する。網膜のひだは、7日目までの小さな蛍光のドットの存在と関連していた。さらに、拡大写真は、核のための空隙を伴う、小さな蛍光細胞の分布を明確に示した。全身性フルオレセイン-デキストラン注射（血管造影のため）後の陽性対照の組織は、組織の処理または染色を行うことなく摘出した網膜または眼杯において488nmの蛍光（HRAIIイメージングにおけるFAFで使用した波長と類似）を検出する能力を確認した。ベースラインでの陰性対照は、自己蛍光細胞の不存在を示す。

10

20

30

40

50

【図4A-C】組織学的に決定した組織の知見がどのように NaIO_3 誘導型のRPE喪失後の*in vivo*でのイメージングを説明することができるかを示す解釈上の例示を示す。

【図4A】初期のAMD患者からの臨床的な画像を示し、かつ網状偽ドルーゼン、およびいわゆるNIRチャネルにおける「標的」病変（上部）を示す。すぐ下は、強調のために黒色にし、中断する明るいシグナルを強調するために明るい背景を伴う、低蛍光のスポット（概してドルーゼン様沈着物として定義されている）を強調する2つの概略的なオーバーレイである。下部の2つの画像は、RPDの複数の小さな標的病変を強調しており（円の中）、最下部の概略図は、潜在的な量状の存在、および組織の同心円のひだにより形成される標的病変を示す。

10

【図4B】3次元の全載ONLの組織と、2次元の正面の臨床上のFAF画像との間の直接的な関係性を示す概略的なレンダリングを示す。 NaIO_3 に曝露してから14日目までに、網膜外部は、中央のONLの複数のひだを示す（相対的に低倍率[もともとの40×]およびデジタルにより拡大）。デジタルの拡大は、組織のひだの同心円のリングを示す。黒色および白色で示されたこの同一の領域は、これが、どのように中心の空隙を伴う円形または長円の領域であるようにFAFで現れるかを示す。反転した黒色および白色のレンダリング（「陰性の」画像）は、このONLの歪みの配置が、中心が明るい標的を有するように現れることを示す。

【図4C】 NaIO_3 注射から14日後のラットの網膜のOCTイメージングが、網膜外部を介して明るい「スパイク」を示すことを示す。これらは、臨床的に説明されている。網膜外部を介した類似の組織学的セクションは、ONLが、細胞の狭いカラムを形成する拡大した網膜下腔において根底にある炎症細胞とともに折りたたまれることを示す。*in vivo*での画像との比較のために、これらは、黒色および白色にされている。反転した黒色および白色（OCT画像を一致させるための偽陰性画像）では、ONLは消失し、網膜下の密度は明るく見ることが観察される。

20

【図5A-H】小斑点のNIR蛍光が、795/810nmのcSLOイメージングにより検出されるが、従来のICG注射なしでは検出することができないものであり、すなわちこの蛍光は、所定の励起/発光フィルターでのみ検出することができるが、色素注射後の移行期とは一致せず、または移行期ではない（すなわちDNIRA法を使用している）。図5A~Fは、以下を使用して得た野生型のSDラットの典型的な正常な共焦点走査型レーザー検眼鏡（cSLO）および血管造影の画像を示す：

30

【図5A】赤色を含まない光

【図5B】赤外線反射（830nm）

【図5C】488/500nmの自己蛍光（FAF）

【図5D】795/810nmのNIR蛍光

【図5E-F】それぞれ、フルオレセインデキストラン、およびICG色素を使用した正常な網膜および脈絡膜の脈管構造を示す。これらおよび類似の画像は、すべての実験の正常な対照となる。このようなイメージングは、網膜とRPE層の中、および網膜とRPE層との間に焦点深度を適切に合わせるように使用されている。

【図5G】 $t=0$ での5mg/kgのICG色素の単回注射を投与した代表的な動物におけるDNIRAの時間経過を示す。色素注射前には検出可能なシグナルは観察されていない（均一な暗色の画像、上の列）。血管造影の間（第2の列）、網膜の血管は可視化され、背景が検出可能ではなく、ここでcSLOの増分（感受性）が、移行期の間に飽和を防止するように減少していることが示されている。血管造影から数日後に、（列3~5）で、ベースラインと比較して小斑点または点状の背景の蛍光が増加している。遅延性のNIR蛍光は、上にある血管により阻害されており、視神経乳頭では存在していないが、FAFとは異なり（図5H）、神経頭周辺に明るい弓またはリングを形成する。このシグナルは強力なままであり、使用する濃度（5mg/kg）で注射してから最大28日後まで眼底全体に分布している。底部の列のわずかに暗いセグメントは、脈絡膜の渦静脈の存在を反映しているようである。

40

50

【図5H】DNIRAの時間経過とは対照的に、488/500nmの自己蛍光シグナルが、フルオレセインの血管造影（下の列）から3日後、8日後、および28日後に見る場合に、注射前の輝度（上部の列）まで戻ることを示す。最下列のわずかに暗いセグメントは、脈絡膜の渦静脈の存在を反映しているようである。

【図6A-D】DNIRAを使用して、NIR蛍光シグナルの輝度がICGの用量と関連することを示す。

【図6A】ICG色素が投与されなかった場合に、対照のcSLOの画像が、795/810nmの蛍光シグナルの非存在を例証することを示す。ICGを投与されていなかった対照の動物は、評価する21日間にわたり無視できるシグナルを伴う背景の蛍光の同一のレベルを維持した。

10

【図6B】同一の増分を使用して、遅延型のNIRの蛍光は、0.35mg/kgの低用量で投与する場合に、ICG注射から48時間後に容易に検出可能であったことを示す。しかしながら、時間とともに、DNIRAは、注射から48時間後〜21日後まで徐々に消えてくことを示す。

【図6C】同一の増分を使用して、5mg/kgのICG血管造影は、低用量で行うよりも明るい（高い輝度の）遅延型NIR蛍光を48時間でもたらしめたことを示す（図6B）。この蛍光は、最大21日目まで大きく変化しないままであった。

【図6D】対照的に、830nmのNIRの反射率のチャンネルが類似の変化を示さないことを示す。

【図7A-B】ヨウ素酸ナトリウムが脈絡膜の脈管構造に対する明確な見解をもたらす遅延性NIR蛍光のパッチ状の喪失を引き起こすことを示す。

20

【図7A】ICGおよびNaIO₃の注射から3日後に行われたDNIRAを示す。後極の明確に画定されたパッチまたは領域における小斑点の蛍光の喪失が見られた。これらの領域は、明確に画定された境界を伴い、暗くまたは低蛍光のように見える。

【図7B】これらの領域の中で、cSLOの増分（感受性が）が増加した場合、脈絡膜の血管が容易に明らかとなることを示す。ボックス（拡大されている）は、視神経から放射状にある網膜の脈管構造とは異なっている方向に移動する顕著な脈絡膜の血管の一部を同定する（矢印）。小斑点のDNIRAの蛍光は、画像の右上の脈絡膜に対する見解をわかりにくくしている。

【図8A-C】網状のFAFパターンが、in vivoおよび摘出した網膜において成熟し、視神経に隣接している領域に影響しないことを示す。

30

【図8A】NaIO₃注射から3ヶ月後までに有意な網膜外部の喪失にもかかわらず、ONLが、視神経乳頭（ONH）のすぐ近くに隣接する領域に保存されたことを示す。高倍率で（底部）、光受容体の核が保存されており、網膜外部がひだにないことを確認した。動物へのNaIO₃注射から7日後からの代表的な眼のFAFイメージングにより、網状のパターンが見られないことを確認した。明確な点線（内部の円）は、ONHの位置を表し、粗い点線（外部の円）は、正常な非網状FAFのおおよそその度合いを示す。

【図8B】NaIO₃投与後の網膜外部の明確な変形を示したH&E染色を示す。NaIO₃投与前（BL）に、ONLは、ONHから網膜周辺部まで延びた暗い線状のバンドとして現れる。7日目までに、網膜外部は、ひだにあるが、ONLは肉眼で正常のままであった。このことは、右のカラムの拡大図で見られる。しかしながら、NaIO₃から14日後までに、ONLは、特定したRPEの基底膜であるブルッフ膜（BM）に対して直接ある網膜内部を伴う、明らかな喪失領域を示した。このことは、拡大図で見られる（黒色の矢印）。

40

【図8C】核染色TO-PRO-3（遠赤色蛍光のみを用いたカルボシアニンのモノマーの核酸染色、Invitrogen）でイメージングしたONLを介した共焦点顕微鏡を示す。ベースラインではこの層は平坦であり、特徴を区別することはない。NaIO₃投与後の時間を増加させると、ONLは、次第に異常が進むこととなった。線状の溝、曲線の形状、同心円のリング、および単離した小さな長円もしくは円を、3日目、6日目、および14日目に同定した。

50

【図9A-C】疾患の初期および末期のRPEの非存在下で、Iba1⁺細胞が網状FAFパターンに寄与することを示す。

【図9A】FAFで見られる網状のパターンと、疾患進行の初期および末期のIHCとの間の比較を表す、低倍率（上部列）および高倍率（下の列）のin vivoおよびex vivoでのイメージングを示す。in vivoで同定されたFAFのパターンは、抗Iba抗体を使用した蛍光免疫組織学的検査により、再度撮像されている。7日目のHRAIイメージングの直後に摘出した網膜全裁と比較すると、同一の網状パターンが、ミクログリアおよびマクロファージのマーカーであるIba-1に対する抗体を使用して観察された（上部）。TO-PRO-3を使用した核染色は、曲線、長円、または小葉のパターンを形成するように、2次元で現れる外部顆粒層（光受容体層）の密接に封入された細胞を示した。2つをまとめることにより、Iba-1⁺染色が、核染色の間に組み合わさって見いだされていることを確認した。末期の網状のパターンの拡大から、折りたたまれた光受容体の核の間の溝にIba-1⁺細胞が残ったままであることが確認された（下部）。

10

【図9B】FAFシグナルが、RPEの非存在下であっても検出できることを示す。左：RPE65（緑色）で染色した後部眼杯は、この中心および中央の網膜の単層の喪失を示す（周辺のRPEのリングは残る）。残りの画像は、2つの異なるRPE標識（MITF：小眼球転写因子）、および特徴的な二重の核染色を利用し、かつ眼底自発蛍光の複雑なパターンを有するとみられた領域で、中央および中心の眼杯のRPE層の喪失を確認する。対照的に、正常なまたはほぼ正常なRPEは、後部の眼杯に残っている。

20

【図9C】RPE細胞を示す二核の非存在により証明される、網膜全載の中心部のRPE細胞の消失を示す核染色を示す。RPEは、周辺の網膜組織にまだ可視化されていた。これはRPE細胞が中心および周辺の網膜組織の両方に存在していたベースラインの対照とは対照的である。

【図10A-C】Iba-1⁺およびCD68⁺食細胞の対応するインターレース状の分布を伴う複雑な3次元の変形を表す、網膜外部を介した連続共焦点顕微鏡を示す。

【図10A】内部の網状層（IPL）から網膜下腔まで延びる4つの層に光学的に区切られた網膜外部の形態学的な変化を示す。ONLは、内部層および外部層に分割されている。赤色=Iba-1、緑色=CD68、青色=核。食細胞数の増加は、ベースラインと比較して、NaIO₃投与から4日後に網膜層で見られた。この時点で、Iba-1細胞は、主に網膜内層で見いだされる。これは、両細胞マーカーに関して抗体の陰性対照では存在していなかった。

30

【図10B】NaIO₃投与から14日後までに、円形および長円のパターンが、ONLで明らかであり、OPL（血管の存在により同定）と同じようかなり内部にあることを示した。このパターンは、内部ONLで曲線であり、密接に折りたたまれた核の層がより密集している外部ONLでは多く、曲線の空隙の領域が小さい。外部ONLでは、ひだの間に有意な架橋が存在していた。これらの核の空隙は、Iba-1⁺およびCD68⁺細胞を含んだ。

【図10C】最外層のONLにおける拡大した画像を示し、または拡大した網膜下腔（通常仮想の空間である）は、光受容体の核の間に交絡したIba-1⁺およびCD68⁺細胞の網状パターンを示す。

40

【図11A-B】食細胞が網状パターンを形成する変形した光受容体層内にあることを確認した、摘出した網膜全裁組織の3次元の再構成を示す。

【図11A】網膜外部を介した共焦点Zシリーズを使用して、ONLおよびIba1⁺細胞の3次元の再構成を作製したことを示す。光受容体核層の核染色（赤）がひだにあることを示した。Iba-1⁺染色（緑）と組み合わせると、炎症細胞が、網膜の変形により画定されているひだの間または中にあることが明らかとなった。Iba-1陽性細胞単独の再構成は、網状のパターンを示した。

【図11B】NaIO₃投与から28日後の網膜外部の全画像のスタックのセグメントのZシリーズの再構成が、ひだの複雑さを示し、これらのピークではより狭く（内部）、こ

50

これらの基部（中央、外側）ではより広くよりインターレース状であることを示す。断面のイメージングとの比較のため、およびこれらの結果の3Dの性質を良好に表すために、斜視図もまた示されている（中央のパネル）。正面の画像（左）のアスタリスクの位置は、斜視図の画像のアスタリスクの位置と対応している。デジタルの拡大図（右）は、曲線状であり、網膜外部に近接しているが、内部のONLにおける3つの小さな長円の中で崩壊している、光受容体層（赤色）の間の溝を示した。Iba1⁺細胞（緑色）は、光受容体層の中、すなわち外部に著しく局在していた。網膜外部の対照の再構成は、Iba-1陽性細胞もONLの変形も示さなかった（下部の列）。ビットプレーンソフトウェア（Imaris）を使用してこれらの画像を作製した。

【図12A-D】進行性のNaIO₃誘導型の網膜外部の変形が*in vivo*でのOCTイメージングにより同定され、かつ臨床結果と比較したことを示す（略語：NFL=神経線維層；GCL=ガングリオン細胞層；IPL=内部網状層；INL=内部顆粒層；OPL：外部網状層；ONL=外部顆粒層；IS+OS内部セグメント&外部セグメント層；RPE=網膜色素上皮；BM=ブルッフ膜）。

【図12A】*in vivo*でのOCTを示し、かつ網膜下部で発生したが、網膜上部では発生しない初期の変化が、NaIO₃投与から3日後に最初に観察されたことを示す。ベースラインの画像は、OCTで視認可能な網膜層を示した。3日目の網膜の正面の画像は、2つの光学的なセクションの位置を表し、ここで上部および下部が示されている。上部は、ベースラインと比較して変化しないままであった。対照的に下部は、RPE層の喪失に加えて、光受容体の内部および外部のセグメントの小さな凹凸を示した。

【図12B】NaIO₃投与から14日後までに、網膜外部が、暗い外部顆粒層の外部（下部）にある明るいシグナルの複数の曲線のひだ、ベースダウンの三角形、場合によってはスパイクの形成を含む顕著な変化を示した。

【図12C】げっ歯類の網膜の14日目の画像に、良好に形成されたベースダウンの三角形が示されていることを示す。

【図12D】げっ歯類のモデルで見られるものと類似のベースダウンの三角形を示す網膜偽ドルーゼンを有する患者のOCT画像を示す。

【図13A-B】網膜下の変化が、*in vivo*でのY軸およびZ軸の複合的な3D構造に寄与することを示す。

【図13A】網膜下の変化がY軸の複合的な3D構造に寄与することを確認する隣接した連続したOCT画像を示す。小さな網膜下のドームまたは錐体の形状は多くあり、中心に示されるように、さかさまの「Y」または「ウィッシュボーン」に類似する形状をも形成する。連続的な画像の容積測定の再構成と比較して、この画像は、正面から見る場合に円形となる構造を通る光学的なセクションと一致する。円形構造を通る連続的なOCTセクションの位置を示す画像は、隣接する光学的な断面図の画像に対応する。これら断面図の2つの主要な網膜下のシグナル（矢印）は、円の上部および下部の先端とともに近接し、さらには中心で離れているように観察される。内部のスパイクの距離が提供されている。円のすぐ左側の構造の評価は、より小さなループ様の構造に対する網膜下の構造の類似する寄与を示す。

【図13B】内部、中央、および外部のONLを介した連続的なZセクションのセグメントのスタックの容積測定の再構成が、変形した網膜外部下でシグナルの異なる正面の外観を確認することを示す。OCTは同一の組織平面を介して分割する。（上部の列）3つの平面内で形成された容積測定で再構成された画像は、上部の列に示される平行の緑色の線により境界わけされている。このよう内部、中央、および外部のONLを介したセグメントの再構成は、3つの別々のパターンを示す。（C、下部の列）内部ONLにおける点状のスポットの通常の列。（C、左下）中央のONLにおけるより曲線状のパターン。（C中央）大部分の拡大した網膜下腔内の最外部のONLは、これらの間の顕著な架橋で複数の複合的な曲線、ループ、複合構造を示す。これらの画像は、3Dで再構成された共焦点顕微鏡の結果と相関する（C、右下）。

【図14A-B】循環する単球および固有のマクロファージを欠失するガドリニウムが、

NaIO₃ 誘導型網膜外部の損傷のFAFパターンを変化させることを示す。

【図14A】非治療（下部パネル）と比較して、GADで治療した病変が、どのように、3日目に良好に画定された境界をほとんど有さず、かつ～日目に損傷の典型的な島の中にFAFの良好に画定されたパターンがはるかに少なくすることを示す。

【図14B】どのようにマクロファージの欠失がより小さな損傷領域をもたらすかを示す。左：FAFの画像は、NaIO₃ および同時のマクロファージのGADでの欠失から7日後に網状のパターンの小さな三日月を示す。右：摘出した網膜全体と比較して、損傷領域は概して観察されていたものよりも明らかに小さい。

【図15A-C】理論による限定を望むものではないが、組織学的に決定された組織の知見が、どのようにNaIO₃ 誘導型のRPE喪失後のin vivoでのイメージングを構成できるかの解釈上の図を示す。

10

【図15A】NIRチャンネルで網状偽ドルーゼンおよびいわゆる「標的」病変を示す初期のAMD患者由来の臨床画像を示す（一番上）。すぐ下は、強調のため黒で低蛍光スポット（これらは概してドルーゼン様沈着物として定義されている）を示し、介在する明るいシグナルを強調する明るい背景を伴う2つの概略的なオーバーレイである。下2つの画像は、複数の小さなRPDの標的病変（円の中）を強調し、最も下の画像は、組織の同心円のひだにより形成された潜在的な量状および標的病変を概略的に示す。

【図15B】3次元の全載ONL組織と、2次元の正面の臨床FAF画像との間の直接的な関係を示唆する概略的なレンダリングを示す。NaIO₃ 投与から14日後までに、網膜外部は、中央ONLの複合的なひだを示す（相対的に低倍率（本来の40×）およびデジタルで拡大）。デジタルの倍率は、組織のひだの同心円のリングを示す。黒色および白色で示されたこの同一の領域は、これが、どのように中心の空隙を含む円形または長円の領域のようにFAF上で現れ得るかを示した。反転した白色および黒色のレンダリング（すなわち「陰性」画像）は、ONLの崩壊の配置が、中心の明るい標的を有するように見えることを示した。

20

【図15C】NaIO₃ 投与から14日後のラットの網膜のOCTイメージングが、網膜外部を介して明るい「スパイク」を示すことを示す。これらは臨床的に説明されている。網膜外部を介して同様の組織学的なセクションは、ONLが、細胞の狭いカラムを形成する拡大した網膜下腔における根底の炎症細胞とともに折りたたまれることを示す。in vivoでの画像との比較のために、これらは、黒色および白色で表されている。反転した黒色および白色（すなわち、OCT画像と一致させるための偽陰性画像）では、ONLが、網膜下の密度が明るく見える間に消失することが観察される。

30

【図16A-F】眼底自然発光（FAF）を使用して経時的に評価する場合、硝子体内ビンダリットが、過蛍光FAFの複合的なパターンの発達を低減することを示す。

【図16A】生理食塩水を投与し、FAFを使用して評価した進行性の変化を発達させた陰性対照である。

【図16B】高用量（20 μg/眼）のビンダリットでFAFが正常のままであることを示す。

【図16C】異常性のFAFが、比較器の小分子の存在下で発達することを示す。

【図16D】DNIRAイメージング（下の列）と併用したFAF（上の列）により、RPE層の保存を確認することを示す。対照動物（左）は、複合的なFAFパターンおよび暗いDNIRAシグナル（RPEなし）を発達させる。高用量のTmi-018（20 μg/眼）では、FAFは正常であり、DNIRAシグナルが保存される。中程度の用量（10 μg/眼）では、異常なFAFおよびRPEの喪失の小さなパッチが存在する。

40

【図16E】硝子体内のビンダリットが、パッチの大きさを用量依存的に減少させることを示す。様々な用量：20 μg/ml、10 μg/ml、1 μg/ml、および対照（ビヒクルのみおよび毒素のみ）を使用する。

【図16F】硝子体内に投与した1 mg/ml（2 μg）のビンダリットの存在下で、高用量のNaIO₃ 毒素で起こる損傷の小さなパッチのDNIRA（左）およびFAF（右）の典型的な画像を示す。

50

【図17A-B】ビンダリットが、網膜の機能（電気生理学）を用量依存的に保護し、最小有効用量を示すことを示す。

【図17A】網膜電図解析が、網膜の機能の用量依存的な保護を示すことを示す。用量は、ビンダリット：40 μ g、2 μ g、および0.2 μ gの量である。これを下回るとビンダリットの効果が失われる最小有効用量（MED）は、0.1 mg/ml、または200 ng/眼と確認された。

【図17B】網膜電図のトレースを示す。明るいフラッシュ波の振幅は、生理食塩水の対照の存在下で、高用量では保存され、低用量では消失する。

【図18A-C】ビンダリットが、組織の損傷、RPEの喪失、および網膜外部の破壊を保護することを示す。

【図18A】ビンダリットが、用量依存的に組織の損傷を保護することを示し、これは488/512 nmでの自己蛍光落射蛍光顕微鏡を使用して評価される。小さな立法状のRPE細胞が、非常に高用量（10 mg/kg）および高用量（50 mg/kg）の両方のビンダリットアームで見られる（左および中央）。細胞のデブリおよび拡大した過蛍光のRPE細胞は、生理食塩水の対照で見られる（右）。

【図18B】硝子体内ビンダリットがRPE細胞の喪失を保護することを示す。硝子体内の生理食塩水（ビヒクル）の存在下で、RPE細胞が消失しており、蛍光組織化学的検査により確認されている（左）。硝子体内ビンダリットの存在下で、RPE細胞が保存されている。緑色=RPE65；赤色=Ib a l；青色=核

【図18C】H&E組織学的検査から、ビンダリットの存在下でのRPE層および網膜外部の保存を確認されることを示す（左の2つの画像）。これらの層は、生理食塩水（ビヒクル）の存在下で損傷または喪失している。

【図19A-H】ビンダリットが、単球走化性タンパク質（MCP-1）の発現を低減し、M1マクロファージの応答を低減し、M2の観点での均衡が崩れることを示す。

【図19A】蛍光免疫組織化学的検査を示す。本明細書中に記載のAMD/RPDのモデルでは、RPEに対する毒素誘導型の損傷が、一連の生来の免疫系の分極化の変化をもたらす。免疫組織化学的検査は、ベースラインで、M2応答のマーカー（たとえばCD163およびその他）が支配的であることを確認する。損傷の誘導の後、疾患のセネッセンスをに移行する発達および成熟の後に、ベースラインに戻るM1の遺伝子発現の大きな増加が存在する。赤=iNOS（M1）、緑=CD163（M2）、青=核、もともとの倍率：100×

【図19B】定量的なPCRは、M1の遺伝子発現（mRNA）が減少し、M2発現がほとんど変化しないことを確認したことを示す。mRNA転写物の変化倍数は、ベースライン（前損傷）のレベルと比較して計算されている。x軸上の数1～5は、以下：1=誘導、2=初期の発達、3=末期の発達、4=成熟、および5=セネッセンスといった、時間経過に伴う変化を表す。M1に特異的なマーカーは、この図面で評価されている。

【図19C】定量PCRが、M1の遺伝子発現（mRNA）が減少し、M2の発現がほとんど変化しないことを確認することを示す。mRNA転写物の変化倍数は、ベースライン（前損傷）レベルと比較して計算されている。x軸上の数1～5は、以下：1=誘導、2=初期の発達、3=末期の発達、4=成熟、および5=セネッセンスといった、時間経過に伴う変化を表す。M2に特異的なマーカーは、この図面で評価されている。

【図19D】硝子体内ビンダリット投与後の、網膜下腔におけるMCP-1タンパク質発現の用量依存的な低減を定性的に示す落射蛍光IHCを示す。MCP-1（赤色）およびCD163（緑色）；青色の核。もともとの倍率は10×である。上部の左のパネルは生理食塩水（陰性対照）であり；上部の右のパネルは低用量のビンダリット（1 mg/kg）であり；下側の左のパネルは高用量のビンダリット（10 mg/kg）であり；下側の右のパネルは正常である（毒素なし）。

【図19E】落射蛍光IHCが、硝子体内ビンダリット後の網膜下腔におけるTNF- α およびCD68タンパク質の発現の用量依存的な低減を定性的に示すことを示す。TNF- α およびCD68（緑色）；核は青色である。もともとの倍率は10×である。上部の

10

20

30

40

50

左のパネルは生理食塩水（陰性対照）であり；上部の右のパネルは低用量のビンダリット（ 1 mg/k g ）であり；下側の左のパネルは高用量のビンダリット（ 10 mg/k g ）であり；下側の右のパネルは正常（毒素なし）である。

【図19F】硝子体内のビンダリットがM1に関連するmRNAの転写を低減することを示す。ベースラインと比較して、RPE損傷の誘導および初期の発達は、M1サイトカインの発現に非常に関連しており、このことは、末期の発達および成熟の間では次第に失われていく。対照的に、M2のmRNAは疾患の後期に上昇し、M1のレベルは減少する。

「1」の変化は、ベースラインから変化していないことを表し、生物学的に有意な変化は、場合により、変化倍数が2または3を超える場合に存在するといわれてもよい。同様の観察が、M1およびM2に関連する転写因子に関してなされている。M1転写物は疾患の間、優性であり、M2の変化はほとんどない。左のパネル（サイトカインmRNA）では、各時点で、M1試料は左のバーであり、M2の試料は右のバーである。右のパネル（転写因子のmRNA）では、各時点でM1試料は右のバーであり、M2の試料は左のバーである。

10

【図19G】M1対M2遺伝子発現の変化の概略図である。毒素誘導型損傷の後、遺伝子発現はM1に向けて変化し、ビンダリット（TMi-018）の存在下で遺伝子発現は、中立に戻る（すなわちM2に向かう）。RPE65遺伝子の転写物は、観察された細胞の喪失と一致する疾患の間に有意に減少する。比較すると、ビンダリットはこの喪失を低減する。

【図19H】ビンダリット（TMi-018）が、タンパク質レベルで、毒素誘導型のRPE損傷の非存在下でのM2応答を有意に低減しないことを示す。蛍光免疫組織化学的検査は、高用量の硝子体内のビンダリットにもかかわらず、鍵となる標的のMCP-1のタンパク質のレベルが、生理食塩水で処置した眼と薬剤で処置した眼との間でほとんど変化しないことを示す。これらのデータは、ビンダリットが、MCP-1発現のベースラインまたは「正常な」レベルを特異的に調節し、かつ「炎症に関連する」転写を特異的に低減するように作用し得ることを示す。このような特異的な活性は、MCP遺伝子複合体の5'アップストリームのプロモーターおよびエンハンサーの活性を特異的に使用するビンダリットの作用と一致する。

20

【図20A-C】ビンダリットが、（パッチの予防とは反対の）パッチの拡大を低減することを示す。GA形成を防止することに加え、ビンダリットが、これらRPEおよび網膜外部の喪失のパッチの増殖を低減することにより、既存のGAを治療することを示す。このような治療の目的は、患者が中心視野で観察する「失明スポット」の大きさを減少させることである。

30

【図20A】既存のパッチの陰性対照（生理食塩水）での治療を示し、このパッチは拡大する。

【図20B】既存のパッチのビンダリットでの治療を示し、このパッチは拡大しない。

【図20C】パッチの拡大に関するデータをまとめる（この文脈での「成功」はパッチの拡大である）。ヒットは、毒素での試験である。このデータは、実験モデルが、毒素および生理食塩水ではパッチの拡大を引き起こし得るが、このような拡大はビンダリット（「TMi」）で防止されることを示す。「IVT」は硝子体内である。

40

【図21】パネルAおよびBにおいて、hTERT、不死化（テロメラーゼ欠損）のヒトRPE細胞株が、RPE分化のマーカーを発現することが確認されていることを示す。パネルCでは、TMi-018が、NFkBの発現、核へのNFkBの転位を低減し、hTERTにおけるMCP-1を低減することが示されている。パネルDは、Tmi-018が、in vivoでの毒素の試験に対するRPEの生存を直接増加させることを示す。

【図22】パネルAで、補体カスケードの成分のmRNA種が、毒素誘導型RPE損傷の後に変化し、パネルBで、ビンダリットが、補体のmRNA発現を変化させることを示す。各セットの組織学検査では、以下の遺伝子进行评估する（左から右）：C1qb、C1qt、nf5、C2、C3、C4b、C5、C6、C7、C8a、C9、Cfb、Cfd、Cfh、およびCfi。2未満の変化倍数は有意ではないと考えられる。タンパク質のレベ

50

ルは解析しなかった。

【図23】「非滲出型」AMD患者のICG血管造影を示す。左のパネルは、非滲出型AMD患者の初期（移行期）ICG血管造影を示し、脈絡膜の正常で大きな血管（網膜外部（深い）多くの血管床）を同定することを示す。中央のパネルは、同一の患者の中期のICG血管造影であり、根底にある蛍光をわずかに阻害する小さな中心領域を同定することを示す。これらは、カラー写真で見られる異常な色素沈着の領域に対応する（データ不図示）。右のパネルは末期の血管造影を示し、血管から組織へICGが漏出する際の脈絡膜組織のぼやけて広がったフラッシュを表す。中心視野の上に重なる阻害以外（ほとんど検出されない）には、ほとんど異常は観察されない。

【図24】図23とは対照的に、さらなる注射を行わないICG色素の全身注射から2日後に採取した同一の非滲出型AMD患者のDNIRAを示す。左のパネルでは、図23の患者のベースラインのDNIRAの画像は、ICG注射前ではあるが、所定のICG励起／発光フィルターでわずかなシグナルを示す。右のパネルは、同一の患者からの2日目のDNIRA画像を示し、中心黄斑の顕著な低蛍光の領域を同定する。画像は、所定のex/emフィルターを用いて得られるが、色素をさらに注射せずに得る。（数日早いベースラインのため）。さらに、ヒョウ柄様のまたはレース状のパターンが、最近のいずれかのイメージング技術により同定されていない周辺黄斑で観察される。

【図25】FAFおよび近赤外線（IR）と比較したDNIRA画像を示す。左のパネルでは、非滲出型AMDの患者の眼底の近赤外線イメージングが、わずかに過蛍光および低蛍光の領域を示す。明るい領域は、仮定の結晶性沈着物（臨床試験により観察される）の存在を反映する。中央のパネルは、同一の患者の眼底自発蛍光のイメージングを示し、かつ上にある血管により阻害され黄斑全体の正常なすりガラス状の外観を示し、視神経が存在しておらず（画像のかなり右側）、中心に向けて徐々に減少することを示す。右のパネルは、同一の患者のDNIRA画像を示し、かつFAFおよびIR画像と顕著に対照をなしている。当然、明確な低蛍光（暗色）の領域は、中心に認められる。より小さなパッチは、視神経乳頭に近接して、中央の病変の境界に認められる。

【図26】複合的なDNIRA画像が、中央および周辺の黄斑の新規の変化を同定することを示す。同一の患者の複合的な画像は、他のイメージング方法では見られず、従来記載されていない過蛍光および低蛍光が交互のDNIRAの網状またはヒョウ柄様のパターンを示す（上部パネル）。

【図27】経時的な同一の患者の反復するイメージングを示し、DNIRAパターンも変化することを示し、これによりDNIRAが疾患の進行の新規のマーカーであることが示される。左のパネルは、0時間での非滲出型AMD患者のDNIRA画像を示し、低蛍光（および過蛍光）の領域を示す。右のパネルは、6か月後の同一の患者の反復したDNIRAイメージングを示し、低蛍光DNIRAシグナルの領域が拡大したことを示す。

【図28】非滲出型AMD患者のDNIRA画像が、過蛍光の別々の明るい点状のスポットを同定することを示す。過蛍光DNIRAの別々のドットは、AMD患者の黄斑全体に散乱して同定されている。一部は視神経乳頭に近位であり、その他は、地図状萎縮領域のすぐ近くにあり、両方が境界およびいわゆる接合領域にある。右のパネルは、左のパネルの一部の拡大図である。

【図29】ヒトのRPD患者のDNIRAイメージングを示す。上の列の画像は近赤外線のイメージングを示し、RPDを特徴づける上部の「リボンおよびドット」を伴う中央に超反射の図面を示す。中央の列の画像はFAFを示し、右の眼により多く低FAFの領域を伴う正常な中心窩の低蛍光を示す（左の画像、中央の画像）。上部のRPDは、リボンおよびドットの構成を伴う交互に起きる過／低FAFとして認められる。下の列の画像は、DNIRAのイメージングを示し、他のいずれかの方法（ここで示される他の方法を含む）では見られない低FAFの複数の領域を示す。これらの領域は、黄斑にわたり分布している。ヒョウ柄様またはレース状のパターンは、黄斑周辺で再度みられる。

【図30】ヒトのRPD患者における低蛍光および過蛍光シグナルの勾配を示す。別のRPD患者のDNIRAイメージングが示されている。下部の矢印は、中央の黄斑のすぐ上

10

20

30

40

50

に別々の低蛍光（黒色）DNIRAシグナルの領域を示す。この上に、DNIRAを使用して見られた過蛍光ドットの集積の増加が存在する。

【図31】ウサギの眼における過蛍光FAFシグナルと過蛍光DNIRAシグナルとの間の対応性を示す。左の画像は、毒素注射後のウサギの眼底のFAFである。小さな過蛍光のドットは、青色で観察される。DNIRAを使用することにより、これらおよび多くのより明るいドットが現れる（中央の画像）。青色でのex vivoでの自己蛍光の蛍光顕微鏡は、FAFで見られる過蛍光のドットに対応する網膜下腔に核形成細胞を同定する。NIR顕微鏡は利用可能ではない。免疫組織化学的検査は、これら細胞のマクロファージとしての同定を確認する（ラットではあらかじめ認められている、右のパネル）。

【図32】経時的に位置を変化させる過蛍光DNIRAドット、すなわち仮定のマクロファージを示す。上の列の画像は、ラットにおける全身性毒素注射の後のDNIRAイメージングを示し、視神経乳頭を囲む点状の過蛍光ドットを示す。経時的に、これらのドットは外側に向かうように移動するように見える。下の列は、マクロファージのマーカーに陽性である免疫組織化学染色により個々に標識したドットの同様の明らかな移動を伴う、ラビットの眼におけるDNIRAのイメージングを示す。両方の列では、最も左側の画像はベースラインのDNIRAである（すなわち所定のICGフィルターを用いた前ICG注射）。

【図33】ラット（上）、ウサギ（中央）、およびヒト（下）の画像における視神経乳頭に近接して明るく標識した小さなDNIRA陽性のドットが観察されることを示す。ラット、ウサギ、およびヒトの視神経乳頭の比較は、点状の過蛍光のドットの集積を示す。倍率の変化は、眼の大きさの差を反映しており、同一の臨床的なcSLOシステムを使用して撮影された。これらのデータは、最初に、理論による限定を望むものではないが、マクロファージが、ヒトを含む複数の種にわたる生存する眼で評価できることを示唆している。さらにこれらは、理論による限定を望むものではないが、DNIRAによりみられる過蛍光ドットを有する患者が、望ましくないマクロファージ活性に対する治療から利益を得ることができることを示唆するものである。

【図34】ビンダリットが、糖尿病性網膜症に関与すると知られている炎症性介在物質を低減することを示す。mRNAの変化倍数を、以下の条件：1. 硝子体内生理食塩水（ビヒクル）、2. 高用量のビンダリット、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （毒素なし）、3. 毒素+低用量 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット、4. 毒素+高用量 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、ベースライン（正常）の条件と比較した。

【図35】ビンダリットが炎症性インターロイキンIL-1 β およびIL-6を有意にダウンレギュレートし、色素上皮由来因子（PEDF）に及ぼす小さな陰性の調製効果を有することを示す。mRNAの変化倍数を、以下の条件：1. 硝子体内生理食塩水（ビヒクル）、2. 高用量のビンダリット、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （毒素なし）、3. 毒素+低用量 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット、4. 毒素+高用量 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、ベースライン（正常）の条件と比較した。

【図36】ビンダリットが、この文脈では、他のインターロイキンIL-1 α およびIL-3、または腫瘍壊死因子 α （TNF α ）およびccl5（MCP-3）に及ぼす有意な効果を有さないことを示す。mRNAの変化倍数を、以下の条件：1. 硝子体内生理食塩水（ビヒクル）、2. 高用量のビンダリット、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （毒素なし）、3. 毒素+低用量 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット、4. 毒素+高用量 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、ベースライン（正常）の条件と比較した。

【図37】ビンダリットが、血管内皮増殖因子A（VEGF-A）のmRNAに及ぼす有意な効果を有さなかったことを示す。mRNAの変化倍数を、以下の条件：1. 硝子体内生理食塩水（ビヒクル）、2. 高用量のビンダリット、 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ （毒素なし）、3. 毒素+低用量 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット、4. 毒素+高用量 $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、ベースライン（正常）の条件と比較した。VEGF-Aは評価しなかった（データ不図示）。

【図38】不死化したヒトのRPE細胞株において、ビンダリットが核へのNF κ Bの転

10

20

30

40

50

位を低減することを示す。

【図39】ビンダリットが、高グルコースでインキュベートしたhTERT細胞における細胞ストレスを正常にすることを示す。細胞のみ：培地のみ（17.5mMのD-グルコースを含む）；中度～高度のD-グルコース：30mMのD-グルコース（培地中17.5mMのD-グルコース+12.5mMのD-グルコースの補充）；高度のD-グルコース：50mMのD-グルコース（培地中17.5mMのD-グルコース+32.5mMのD-グルコースの補充）；L-グルコース対照：50mMのグルコース（D+L）（培地中17.5mMのD-グルコース+32.5mMのL-グルコースの補充）；中度～高度のD-グルコース w Tmi-018：150mMのTmi-018を含む30mMのD-グルコース；高度のD-グルコース w Tmi-018：150mMのTmi-018を含む50mMのD-グルコース；およびTmi-018のみ：150mMのTmi-018

10

【図40】FAFで評価されているように本明細書中に参照されているRPE毒素モデルの変化の段階を示す。具体的には、NaIO₃注射後のラットの眼のFAF画像の時間経過および段階の典型的な画像が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、部分的に、ビンダリットが、たとえば網膜色素上皮（RPE）を保護することを含む、非滲出型AMDおよびRPDなどの眼障害に有効な薬剤となる、免疫調節作用、特にM1/M2マクロファージの分極化に関する免疫調節作用を有するという驚くべき知見に関する。

20

【0015】

よって、一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量を、その必要がある対象に投与することを含み、このような薬剤が免疫調節剤である、方法を提供する。一部の実施形態では、免疫調節剤は、マクロファージを標的とする。一部の実施形態では、免疫調節剤は、M1/M2の分極化を調節する。一部の実施形態では、免疫調節剤は、対象のM1マクロファージの活性および／もしくはM1遺伝子もしくはタンパク質の発現を調節（たとえば低減）し、かつ／または対象のM2マクロファージの活性、および／もしくはM2遺伝子もしくはタンパク質の発現を調節（たとえば増大もしくは維持）する。一部の態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量を、その必要がある対象に投与することを含み、上記対象が、CD64、IDO、SOCS1、CXCL10 Marco、Nos2、Il12b、Ptgs2 (Cox2)、Il23α (Il23p19)、Ido1、Adipoq、Ccl20、IL17 (サブタイプ a) Ccl5、CD163、Cx3Cr1、Faslg、Gfap、Cs f2、Icam1、Ifng、Il10、Il12b、Il13、Il17、Il18、Il1b、Il22、Il4、Il6、Klf4、Mrc1、Myd88、Nlrp3、Pparγ、Tgfb1、Tlr4、Tnf、Vcam1、Ccl2、Ccl5、Ccl7、Ccr2、Socs1、Socs3、Stat1、Stat3、およびStat6のうちの1つまたは複数の異常な（増加または減少した）発現または活性を有する、方法に関する。

30

40

【0016】

一部の実施形態では、対象は、MRC1、TGM2、CD23、CCL22 Relm a (Fizz1、Retnla)、Socs2、Irf4、Chia (Amcase)、Chi3l1 (Gp39、Ykl40)、Chi3l2 (Ykl39)、Chi3l3 (Ym1)、Cxc1l3、Ccl12、Ccl24、およびKlf4のうちの1つまたは複数の調節した（たとえば減少または増加した）発現または活性を有する。

【0017】

一部の実施形態では、Tmi-018（および、ひいては本発明の有益なマーカー）により軽減した遺伝子の応答は、Adipoq、ApoE、Timp3、Gfap、Nlrp3、Ccl11 (Eotaxin1)、Cx3Cr1、Socs3、Stat1、Cc

50

120、I117a、RPE65、Cfb、Clqb、Serping1、C3、C4b、IL-6、Myd88およびC6のうちの1つまたは複数である。

【0018】

一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP調節剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、MCP調節剤は、MCP遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域の遠位および／または近位の制御領域を特異的に標的とする。一部の実施形態では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-1および／またはMCP-2および／またはMCP-3調節剤の有効量を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0019】

一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、(i) 眼に(1) 上記動物の眼障害の存在を示すために有効な量の蛍光性化合物、および(s) 眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素を含む動物に試験化合物の有効量を投与することと、(ii) 上記蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に、上記眼を曝露することと、(iii) 上記眼の蛍光パターンを、蛍光性化合物および毒素を含むが、試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、(iv) ステップ(iii)の結果が、上記試験化合物が眼障害の治療に有益であることを示す場合、上記試験化合物を候補化合物として選択することといった方法により、同定される。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、免疫調節剤であり、これは任意にマクロファージを標的とする。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、対象のM1マクロファージの活性および／もしくはM1遺伝子、もしくはタンパク質の発現を調節（たとえば低減）し、かつ／または対象のM2マクロファージの活性および／もしくはM2遺伝子もしくはタンパク質の発現を調節（たとえば増大）する。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、MCP調節剤であり、任意に、MCP遺伝子の遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域（任意にMCPの近位のプロモーター領域を含む）を標的とする。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、インダゾールのコアを含む小分子である。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、本明細書中に示される式Iの化合物であり、限定するものではないが、この化合物はビンダリットである。

【0020】

一部の実施形態では、眼障害は、非滲出型AMD、RPD、白点症候群（たとえば匍行性網脈絡膜症、匍行性網膜症、急性後部多発性小板状色素上皮症（APMPPE）、多発一過性白点症候群（MEWDS）、急性帯状潜在性網膜外層症（AZOOR）、点状脈絡膜内層症（PIC）、びまん性網膜下線維症（DSF））、LORDs（すなわちQ1qTNF5機能不全）、および中心性漿液性網膜症（CSR）のうちの1つまたは複数である。一部の実施形態では、眼障害は、レシチンレチノールアシルトランスフェラーゼ（Lecithin Retinol Acyltransferase）（LRAT）機能不全であり、これは、任意に、lrat関連レーバー先天黒内障、および網膜のジストロフィー、初期の発症、および重篤に関連する。一部の実施形態では、眼障害は、白点状眼底であり、これは、以下の遺伝子の位置：3q22.1（白点状網膜炎、RHO）；6p21.1（白点状網膜炎、PRPH2）；12q13.2（白点状眼底、RDH5）；15q26.1（白点状網膜炎、RLBP1）；および15q26.1（白点状眼底、RLBP1）のうちの1つまたは複数に関連し得る。

【0021】

一部の実施形態では、対象は、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；突発性ブドウ膜炎、自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症のうちの1つまたは複数である。

【0022】

一部の実施形態では、対象は、抗D因子抗体（たとえばランパリズマブ（Genentech））、抗βアミロイド（抗Aβ）抗体（たとえばGSK933776（GSK））、コルチコステロイド（たとえばフルオシノロンアセトニド）、MC-1101（MacuCLEAR）、CD34+幹細胞療法、抗VEGF抗体（たとえばラニビズマブ）、ブリモニジン（アルファガン）、抗補体C5抗体（たとえばLFG316（Novartis））、ドキシサイクリン（ORACEA）、エミクススタト塩酸塩、シロリムス（RAPAMUNE）、およびグラチラマー酢酸塩（COPAXONE）のうちの1つまたは複数での治療を受けておらず、かつ／またはこれらの1つまたは複数から利益を得ておらず、かつ／またはこれらの1つまたは複数に非応答性である。一部の実施形態では、対象は、直径約125μm超の少なくとも1つのドルーゼンの存在により確認されたAMDのエビデンスを有する。一部の実施形態では、対象は、以前のまたは同時に発生する活動性の脈絡膜新生血管（CNV）のエビデンスを有し得る、または有し得ない。一部の実施形態では、対象は、1つまたは複数の眼に総面積約2～約20mm²の1つまたは複数の良好に画定されたGA病変、および／または0.5～10個のディスク状の領域（たとえば0.5～7、または約0.5または約1、または約2、または約3、または約4、または約5、または約6、または約7、または約8、または約9、または約10個のディスク領域）を有する。一部の実施形態では、対象は、約35文字超の最高矯正視力スコアを有し、または約20/200以上に相当するスネレン視力を有する。一部の実施形態では、対象は、多数の小さなドルーゼンまたは数個の中程度の大きさのドルーゼンにより証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。一部の実施形態では、対象は、多数の中程度の大きさのドルーゼン、または1つもしくは複数の大きなドルーゼンにより証明された初期の非滲出型の黄斑変性を有する。一部の実施形態では、対象は、数個の大きなドルーゼンおよび／または黄斑の細胞の広範囲の崩壊により証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。一部の実施形態では、対象は、大きなドルーゼンおよび色素の変化により証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。

10

20

【0023】

一部の実施形態では、本方法は、追加的な治療剤を投与することをさらに含む。追加的な治療剤は、様々な実施形態では、抗D因子抗体（たとえばランパリズマブ（Genentech））、抗βアミロイド（抗Aβ）抗体（たとえばGSK933776（GSK））、コルチコステロイド（たとえばフルオシノロンアセトニド）、MC-1101（MacuCLEAR）、CD34+幹細胞療法、抗VEGF抗体（たとえばラニビズマブ）、ブリモニジン（アルファガン）、抗補体C5抗体（たとえばLFG316（Novartis））、ドキシサイクリン（ORACEA）、エミクススタト塩酸塩、シロリムス（RAPAMUNE）、およびグラチラマー酢酸塩（COPAXONE）であり得る。また追加的な治療剤は、様々な実施形態で、抗血管内皮増殖因子（VEGF）剤、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、ペルオキシソーム増殖剤-活性化受容体（PPAR）-ガンマアゴニスト、レニン阻害剤、ステロイド、およびオートファジーを調節する薬剤であり得る。一部の実施形態では、追加的な治療剤は、補体のカスケードの調節物質（たとえば補体C3、C5、補体D因子、または補体B因子の調節物質）である。

30

40

【0024】

一部の実施形態では、追加的な治療剤は、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（NRTI）であり、非限定的な例として、ジドブジン、ジダノシン、ザルシタビン、スタブジン、ラミブジン、アバカビル、エムトリシタビン、およびエンテカビルがある。一部の実施形態では、追加的な治療剤は、アシクロビルである。

【0025】

一態様では、本発明は、眼障害の治療に有効な薬剤を作成する方法であって、（a）（i）眼に（1）上記動物の眼障害の存在を示すために有効な量の蛍光性化合物と、（2）眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素とを含む動物に、試験化合物の有効量を投与することと、（ii）上記蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を

50

有する光に上記眼を曝露させることと、(i i i) 上記眼の蛍光パターンを、上記蛍光性化合物および毒素を含むが、上記試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、(i v) ステップ (i i i) の比較の結果が眼障害の治療に有用であることを示す場合、上記試験化合物を候補化合物として選択することとにより、上記薬剤を同定することと、(b) 上記眼へ投与するための上記同定した薬剤を製剤化することを含む、方法を提供する。一部の態様では、眼障害を治療または予防する方法であって、上述の方法で使用する際に作製される、眼障害の治療に有効な薬剤のいずれか1つの薬剤の有効量と、薬学的に許容可能な担体または賦形剤とを含む医薬組成物を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0026】

10

一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は免疫調節剤であり、任意にマクロファージを標的とする。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、対象のM1マクロファージの活性および／もしくはM1遺伝子およびタンパク質の発現を調節（たとえば低減）し、かつ／または対象のM2マクロファージの活性および／もしくはM2遺伝子およびタンパク質の発現を調節（たとえば増大）する。

【0027】

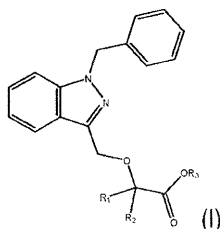
一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、MCP調節剤であり、任意に、MCP遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域の遠位および／または近位の制御領域を標的とする。

【0028】

20

一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、インダゾールのコアを有する小分子である。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、式I

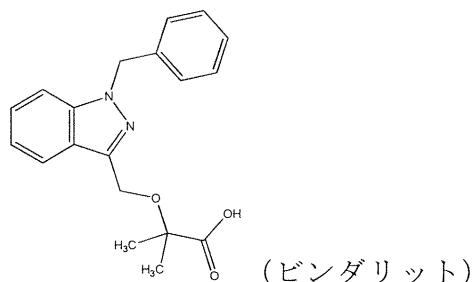
【化1】



30

の化合物、またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物、またはその薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態では、眼障害の治療に有効な薬剤は、構造

【化2】



40

の化合物またはその薬学的に許容可能な塩である。

【0029】

様々な態様では、本方法は、対象の集合を選択するために使用することができる。たとえば本方法は、薬剤がビンダリットを含む式Iの化合物であり、眼障害が、非滲出型AMDまたはRPDであり、対象が、抗D因子抗体（たとえばランパリズマブ (Genentech)）、抗 β アミロイド（抗 $A\beta$ ）抗体（たとえばGSK933776 (GSK)）

50

、コルチコステロイド（たとえばフルオシノロンアセトニド）、MC-1101（MacuCLEAR）、CD34+幹細胞療法、抗VEGF抗体（たとえばラニビズマブ）、プリモニジン（アルファガン）、抗補体C5抗体（たとえばLFG316（Novartis））、ドキシサイクリン（ORACEA）、エミクススタト塩酸塩、シロリムス（RAPAMUNE）、およびグラチラマー酢酸塩（COPAXONE）のうちの1つまたは複数での治療を受けておらず、かつ／またはこれらのうち1つまたは複数に非応答性である実施形態を含む。薬剤がビンダリットであり、眼障害が非滲出型AMDまたはRPDである実施形態を含む、様々な実施形態では、以下：直径約125 μm 超の少なくとも1つのドルーゼン、以前のまたは活動性の脈絡膜新生血管（CNV）のエビデンスがないこと、1つまたは複数の眼に総面積約2～20 mm^2 の1つまたは複数の良好に画定されたGA病変、約35文字超の最高矯正視力スコア、20/200以上に相当するスネレン視力、および約7.0未満の黄斑の光凝固試験のディスク状の領域、ならびに約1未満から最大10超のディスク領域（たとえば約1、または約2、または約3、または約4、または約5、または約6、または約7、または約8、または約8、または約9、または約10個のディスク状の領域）のうちの1つまたは複数を有することにより、対象が分類されている。様々な実施形態では、対象は、少なくとも1つの大きなドルーゼン、またはRPD、および1つまたは複数の眼に、総面積約2 mm^2 ～約20 mm^2 のDNIRAにより同定された低蛍光（影状または黒色の）領域、または1つまたは複数の眼における低蛍光のDNIRAシグナルの1未満のディスク状の領域または最大10個超のディスク状の領域（たとえば約1、または約2、または約3、または約4、または約5、または約6、または約7、または約8、または約8、または約9、または約10個のディスク状領域）のうちの1つまたは複数を有するとして、分類されている。

【0030】

一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、本明細書中に記載の式Iの化合物の有効量を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、本化合物はビンダリットである。一部の実施形態では、眼障害は、非滲出型AMD、RPD、白点症候群（たとえば匍行性網脈絡膜症、匍行性網膜症、急性後部多発性小板状色素上皮症（APMPPE）、多発一過性白点症候群（MEWDS）、急性帯状潜在性網膜外層症（AZOOR）、点状脈絡膜内層症（PIC）、びまん性網膜下線維症（DSF））、LORDs、および中心性漿液性網膜症（CSR）のうちの1つまたは複数である。一部の実施形態では、眼障害は、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症のうちの1つまたは複数である。一実施形態では、式Iの化合物はビンダリットである。一部の実施形態では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、ビンダリットまたはその薬学的に許容可能な塩の有効量を、その必要がある対象に投与することを含み、眼障害が、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症から選択される、方法を提供する。

【0031】

さらなる態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩の有効量を、その必要がある対象に投与することを含

10

20

30

40

50

み、眼障害が、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症から選択される、方法を提供する。

【0032】

一部の実施形態では、患者は1型または2型の糖尿病を有する。様々な実施形態では、患者は、正常値（食事前に約70～130ミリグラム／デシリットル、すなわちmg/dl、および食事から1～2時間後に180mg/dl未満）を超える血中グルコースレベルを有する。

10

【0033】

他の実施形態では、本発明は、白内障または緑内障の治療または予防であって、式Iの化合物、メトトレキサートまたはその薬学的に許容可能な塩を、その必要がある対象に投与することを含み、式中、 R_1 、 R_2 、および R_3 が、上記に定義される通りである、治療または予防に関する。一実施形態では、式Iの化合物はビンダリットである。

【0034】

一部の実施形態では、本方法は、追加的な治療剤を投与することをさらに含む。様々な実施形態では、追加的な治療剤は、1つまたは複数の血管内皮増殖因子（VEGF）である。

20

【0035】

一態様では、本発明は、ある薬剤が、糖尿病性眼疾患（非限定的な例として、糖尿病性網膜症およびDME）を含む眼障害の治療に有効であるかどうかを同定する方法であって、（a）眼に動物の（i）糖尿病性眼疾患（非限定的な例として、糖尿病性網膜症およびDME）を含む眼障害の存在を示すために有効な量の蛍光性化合物と、（ii）眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素とを含む動物に、試験化合物の有効量を投与することと、（b）上記蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に上記眼を曝露させることと、（c）上記眼の蛍光パターンを、上記蛍光性化合物および上記毒素を含むが、試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、（d）

30

【0036】

一部の実施形態では、眼障害は、糖尿病性眼疾患（非限定的な例として、糖尿病性網膜症およびDME）、AMD、RPD疾患、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症のうちの1つまたは複数である。

40

【0037】

一部の実施形態では、動物は、非限定的な例として、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、または非ヒトの哺乳類などの、本明細書中に記載されるいずれかである。

【0038】

他の実施形態では、蛍光性化合物は、約600nm～約900nmの波長の光を吸収し、かつ／または約750nm～約950nmの波長の光を発光する。特定の実施形態では

50

、蛍光性化合物は I C G である。さらなる他の実施形態では、蛍光は R P E 細胞で起こる。

【0039】

一部の実施形態では、毒素はヨウ素酸ナトリウムである。他の実施形態では、萎縮症は、R P E 細胞のネクロシスを含む。他の実施形態では、ネクロシスはパッチとして呈する。

【0040】

さらなる他の実施形態では、比較は、試験化合物を投与してから少なくとも約 24 時間後、または少なくとも 7 日後、または少なくとも 30 日後、または少なくとも 60 日後、または少なくとも 90 日後に行われる。

10

【0041】

様々な実施形態では、光への眼の曝露は、c S L O、F A F、D N I R A、I R、または O C T を行うことを含む、様々な実施形態では、光への眼の曝露は、白色光、青色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む。

【0042】

様々な実施形態では、眼障害の存在は、R P E の損傷もしくは喪失または網膜外部の喪失のパッチ内の F A F のパターンにより示されている。様々な実施形態では、眼障害の存在は、R P E の損傷もしくは喪失、または網膜外部の喪失のパッチの中、またはその隣、その近接部、またはそこから離れて存在しており、または存在しない、F A F のパターンにより示されている。一部の実施形態では、パターンは、曲線、リボン様、網状、長円、円形、貝殻状、暈状、標的様病変のうちの 1 つまたは複数である。様々な実施形態では、眼障害の存在は、R P E の損傷もしくは喪失または網膜外部の喪失のパッチの境界の F A F のパターンにより表される。一部の実施形態では、パターンは、曲線、リボン様、網状、長円、円形、貝殻状、暈状、および標的様病変のうちの 1 つまたは複数である。様々な実施形態では、眼障害の存在は、R P E の損傷もしくは喪失（いわゆる接合領域）のパッチから離れて、または R P E の損傷もしくは喪失または網膜外部の喪失のパッチの非存在下で起こる F A F のパターンにより表される。一部の実施形態では、パターンは、曲線、リボン様、網状、長円、円形、貝殻状、暈状、および標的様病変のうちの 1 つまたは複数である。

20

【0043】

様々な他の実施形態では、眼障害の存在は、断面のパターンまたは横断したパターンにより表される。一部の実施形態では、パターンは O C T で観察される。一部の実施形態では、パターンは、R P E および／または網膜外部の喪失、または網膜下腔で見いだされる隆起、三角形、ピーク、もしくはスパイクである。一部の実施形態では、たとえば L O R D の場合、例示的な症状／診断のパラメータとして、（たとえば拡張した眼底により観察される）後極の中央周辺における網膜色素上皮（R P E）萎縮症および広範囲の萎縮症の貝殻状の領域；杆体錐体ジストロフィー（たとえば E R G により観察される）；内部／外部のセグメントの接合ラインの非存在下での光受容体の広範囲の喪失、ならびに同時の外部核層の菲薄化（たとえば S D - O C T により観察される）、脈絡毛細管の喪失を伴い内部脈絡膜に影響を与えることを含む、びまん性脈絡膜の菲薄化が挙げられる。

30

40

【0044】

さらなる他の実施形態では、本方法は、試験化合物を投与する前に眼を観察するステップをさらに含む。一部の実施形態では、この観察は、1 つまたは複数の投与前の眼の特徴を確立する。

【0045】

さらなる別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、試験化合物を投与する前に、蛍光性化合物を投与する。さらなる別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、（i）追加的な量の蛍光性化合物を動物に投与すること、または（i i）第 2 の蛍光性化合物を動物に投与することを含むものではない。他の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、試験化合物を投与する前に毒素を投与すること、および／または蛍光性化合物を投与

50

する前に毒素を投与することを含む。

【0046】

さらなる別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、(i) 追加的な量の毒素を動物に投与すること、または(ii) 第2の毒素を動物に投与することを含む。さらなる別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、(i) 追加的な量の毒素を動物に投与すること、(ii) 第2の毒素を動物に投与すること、または(iii) 毒素の作用機構に影響すると考えられる化合物を投与することを含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、眼組織の萎縮症のパッチまたは組織喪失のパッチの形成、増殖、または拡大の比率の減少を観察することを含む。

【0047】

一部の実施形態では、候補化合物は、眼障害を治療、予防、または眼障害の発病の比率を低下させるのに有用である。他の実施形態では、複数の候補化合物が同定されている。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、眼障害の治療における複数の候補化合物の有用性を比較することと、この比較に基づき優れた化合物を選択することをさらに含む。

【0048】

一部の実施形態では、本発明は、非滲出型AMDの予防または治療であって、対象の眼における過蛍光FAFの領域の存在、および／または対象の眼における異常に蛍光性であるFAFの1つもしくは複数の領域の存在、および／または対象の眼における青色スペクトラムの眼底イメージング、白色光の眼底のイメージング、赤色を含まない眼底のイメージング、およびOCTのうちの1つまたは複数の変化、および／または、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（一過性の増加を含む）、および／または、網膜外部の変形、および／または、非疾患状態と比較した、対象の脈絡膜と網膜の間の上皮関門を隔てた網膜中央の脈管構造の変形、および／または、非疾患状態と比較した、対象のRPEを通した食作用免疫細胞の存在により、同定可能であり得る、予防または治療に関する。

【0049】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは、初期のAMD、または末期の萎縮性非滲出型AMDである。

【0050】

他の実施形態では、対象はヒトである。さらなる他の実施形態では、投与は、経口投与、血管内投与、または眼内投与、または眼球周囲投与、または眼表面への投与により、効果を発揮する。

【0051】

別の態様では、本発明は、RPD疾患を治療する方法であって、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物（本明細書中に記載）またはその薬学的に許容可能な塩の有効量を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。一実施形態では、式Iの化合物はビンダリットである。

【0052】

さらなる別の態様では、本発明は、RPD疾患を治療する方法であって、メトトレキサートまたはその薬学的に許容可能な塩の有効量をその必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0053】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の偽ドルーゼンの量を減少させる、かつ／または対象の眼の中心窩領域、周中心窩領域、近傍中心窩領域、および中心窩外領域のいずれか1つの偽ドルーゼンの量を減少させることを含む。他の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、末期の疾患への進行の速度を減少させることを含み、ここでの末期の疾患は、脈絡膜心血管または地図状萎縮のいずれか1つである。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、地図状萎縮の拡大速度を減少させることを含む。

10

20

30

40

50

【0054】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、追加的な治療剤を投与することを含む。様々な実施形態では、追加的な治療剤は、抗血管内皮増殖因子（VEGF）剤、補体のカスケードの調節物質、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体（PPAR）ーガンマアゴニスト、レニン阻害剤、コルチコステロイド、およびオートファジーを調節する薬剤のうちの1つまたは複数である。

【0055】

さらなる他の実施形態では、RPD疾患は、対象の眼における網膜のイメージングの明確なパターンの1つまたは複数の領域の存在により同定可能であり、ここでの網膜のイメージングは、白色光、赤色を含まない光、青色光、FAF、近赤外線（NIR）、赤外線（IR）の血管造影およびDNIRA、ならびに／または対象の眼の異常に蛍光するFAFの1つもしくは複数の領域の存在、ならびに／または、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（一過性の増加を含む）、ならびに／または、非疾患状態と比較した対象のRPEを通した食作用免疫細胞の存在のうちの1つまたは複数である。

10

【0056】

他の実施形態では、対象はヒトである。さらなる他の実施形態では、投与は、経口投与、血管内投与、または眼内投与、または眼球周囲への投与、または眼の表面への投与により、効果を発揮する。

【0057】

20

他の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の眼障害の治療または予防に有用な薬物の製造における、式Iの化合物、メトトレキサート、またはその薬学的に許容可能な化合物の、単独または追加的な治療剤と併用しての使用を提供する。

【0058】

さらなる別の態様では、本発明は、眼障害を有し、かつある薬剤での治療に、応答しない可能性が高い対象を同定する方法であって、対象の眼が、非疾患状態と比較して、眼の脈絡膜と網膜との間の上皮性関門を通した透過性の増加を有する、または以前より有していたかどうかを決定することを含み、上記透過性の増加が、上記対象が薬剤との治療により応答しない可能性が高いことを示し、上記薬剤が、メトトレキサートもしくはその薬学的に許容可能な塩、またはおおよび式Iの化合物（本明細書中に記載）もしくはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩から選択される、方法を提供する。

30

【0059】

一実施形態では、式Iの化合物はビンダリットである。一部の実施形態では、眼障害は、糖尿病性眼疾患、非滲出型AMD、およびRPD疾患のうちの1つまたは複数である。

【0060】

他の実施形態では、糖尿病性眼疾患は、糖尿病性網膜症またはDMEである。

【0061】

さらなる別の実施形態では、本発明は、薬剤での治療に応答しない可能性が高い眼障害の対象を同定する方法であって、対象の眼が、非疾患状態と比較して、RPEを通して食作用免疫細胞（任意に網膜、RPE、脈絡膜、または血流の中に由来）の存在を有するかどうかを決定することを含み、食作用免疫細胞の存在が、対象が、上記薬剤での治療に応答しない可能性が高いことを示し、上記薬剤が、メトトレキサートもしくはその薬学的に許容可能な塩、または／おおよび式Iの化合物（本明細書中に記載）もしくはその薬学的に許容可能な塩であって、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物もしくはその薬学的に許容可能な塩から選択される、方法を提供する。

40

【0062】

一実施形態では、式Iの化合物はビンダリットである。一部の実施形態では、眼障害は

50

、非滲出型AMDおよびRPD疾患のうちの1つまたは複数である。他の実施形態では、食作用免疫細胞の存在は、DNIRAにより測定される。

【0063】

別の態様では、本発明は、対象の眼障害が、対象の免疫細胞の機能を阻害または修飾する薬剤での治療に応答するかどうかを決定する方法であって、前記対象の眼における免疫細胞の存在を検出、不存在を検出、または細胞の量を測定することを含み、上記対象の眼が、約600nm～約900nmの波長を有する光に応答して蛍光する、方法を提供する。一部の実施形態では、光は、約400nm～約900nmの波長を有する。

【0064】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、蛍光性化合物の有効量を対象に投与することをさらに含み、ここでは、蛍光性化合物の投与から少なくとも1日後に、検出または測定が行われる。一部の実施形態では、蛍光性化合物の有効量を対象に投与してから少なくとも1日後に、検出または測定が行われる。

【0065】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の眼におけるFAFを検出または測定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の眼における免疫細胞の存在、不存在、または量と、FAFのパターンを相関させるステップをさらに含む。

【0066】

他の実施形態では、眼障害は、糖尿病性眼疾患、AMD、中心性漿液性網膜症（CSR）またはRPD疾患である。一部の実施形態では、対象はヒトである。

【0067】

他の実施形態では、糖尿病性眼疾患は、糖尿病性網膜症またはDMEである。

【0068】

様々な実施形態では、対象の眼は、約750nm～約950nmの波長を有する光を蛍光する。一部の実施形態では、蛍光性化合物はICGである。

【0069】

一部の実施形態では、蛍光性化合物の投与から約1日後、または約7日後、または約30日後に、検出または測定を行う。

【0070】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、（a）追加的な量の蛍光性化合物、または（b）第2の蛍光性化合物を投与することをさらに含むものではない。

【0071】

他の実施形態では、検出または測定は、cSLO、FAF、DNIRA、またはOCTを行うことを含む。

【0072】

一部の実施形態では、免疫細胞は、対象の免疫系の細胞および／またはマクロファージおよび／またはミクログリア細胞である。

【0073】

定義

以下の定義は、本明細書中に開示される本発明に関連して使用されるものである。特段他の定義がない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解される意味と同一の意味を有する。

【0074】

試験化合物および／または候補化合物に関連して使用される場合、「有効量」は、たとえば糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォクト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブド

10

20

30

40

50

ウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症、AMDおよび／またはRPDなどの、眼障害の測定可能な治療、予防、または発病の比率の低下を提供するために有効な量である。

【0075】

蛍光性化合物と関連して使用される場合の「有効量」は、光学的な検出を可能にする量である。

【0076】

眼障害の治療に有効な薬剤、式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩に関連して使用される場合、「有効量」は、たとえば、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症、AMDおよび／またはRPDなどの眼障害を治療または予防するために有効な量である。

【0077】

別の治療剤に関連して使用される場合、「有効量」は、たとえば糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症、AMDおよび／またはRPDなどの眼障害を、単独または式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩と併用した、治療または予防（たとえば測定可能な治療、予防、または発病の比率の低下を提供する）に有効な量である。「～と併用して」は、同一の組成物内での投与および別々の組成物を介した投与を含む；後者の例では、薬剤、式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩が、予防効果または治療効果を発揮する時間の間は、他の治療剤は、病態を治療または予防するのに有効であり、逆もまた同様である。

【0078】

毒素、たとえばヨウ素酸ナトリウムと関連して使用する場合の「有効量」は、本明細書中に記載される測定可能な眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量である。

【0079】

ある薬剤が、測定可能な眼障害の治療、予防、または発病比率の低下を提供する場合、当該薬剤は、「眼障害の治療に有用である」。

【0080】

用語「眼障害」は、様々な眼疾患のうちの1つを指し、眼および眼球付属器の疾患を含む。用語「眼障害」として、本明細書中に記載される障害（たとえば、非限定的な例として、たとえば糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症、滲出型AMD、非滲出型AMD、RPD、白点症候群（たとえば匍行性網脈絡膜症、匍行性網膜症、急性後部多発性小片状色素上皮症（APMPPE）、多発一過性白点症候群（MEWDS）、急性帯状潜在性網膜外層症（AZOOR）、点状脈絡膜内層症（PIC）、びまん性網膜下線維症（DSF））、LORDs、および中心性漿液

性網膜症（CSR）などの眼障害）が挙げられる。

【0081】

用語「血管新生」は、異常な組織または異常な位置における新規の血管の形成を指す。

【0082】

用語「VEGF」は、限定するものではないが、透過性を増大させることを含む、血管新生または血管新生の工程を誘導する血管内皮増殖因子を指す。本明細書中で使用されるように、用語「VEGF」は、たとえば、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、およびVEGF₁₈₉を含むVEGF-A/VPF遺伝子の代替的なスプライシングにより生じる様々なサブタイプのVEGF（血管透過性因子（VPF）およびVEGF-Aとしても知られている）を含む。さらに、本明細書中で使用されるように、用語「VEGF」は、PIGF（胎盤増殖因子）、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、およびVEGF-EなどのVEGF関連血管新生因子を含み、これらは、血管新生または血管新生の工程を誘導するように、同族のVEGF受容体（すなわちVEGFR）を介して作用する。用語「VEGF」は、VEGFR-1（Flt-1）、VEGFR-2（KDR/Flk-1）、またはVEGFR-3（FLT-4）などのVEGF受容体に結合する増殖因子のクラスのいずれかのメンバーである。用語「VEGF」は、「VEGFポリヌクレオチド」または遺伝子もしくは核酸をコードする「VEGF」を指すように使用することができる。

10

【0083】

用語「抗VEGF剤」は、VEGFの活性または産生を、部分的または完全に低減または阻害する薬剤を指す。抗VEGF剤は、VEGF₁₆₅などの特定のVEGFの活性または産生を、直接的または間接的に低減または阻害することができる。さらに、「抗VEGF剤」は、VEGF関連受容体シグナルを低減または阻害させるように、VEGFリガンドまたはその同族の受容体のいずれかに作用する薬剤を含む。「抗VEGF剤」の非限定的な例として、VEGFの核酸を標的とするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；抗VEGFアプタマー、VEGF自体またはその受容体に対する抗VEGF抗体、またはVEGFをその同族の受容体に結合させないようにする可溶性のVEGF受容体のデコイ；同族のVEGF受容体（VEGFR）の核酸を標的とするアンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi；同族のVEGFR受容体に結合する抗VEGFアプタマーまたは抗VEGFR抗体；ならびにVEGFRチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。

20

30

【0084】

用語「抗RAS剤」または「抗レニンアンジオテンシン系剤」は、レニンアンジオテンシン系（RAS）の分子の活性または産生を、完全または部分的に低減または阻害する薬剤を指す。「抗RAS」または「抗レニンアンジオテンシン系」分子の非限定的な例は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬、およびレニン阻害剤のうちの1つまたは複数である。

【0085】

用語「ステロイド」は、以下の例示的な化合物の系統群：コルチコステロイド、ミネラルコステロイド（mineralicosteroid）、および性ステロイド（たとえばアンドロゲン性もしくはエストロゲン性、または抗アンドロゲン性（androgenic）および抗エストロゲン性の分子を含む）に属するまたは関連する化合物を指す。これらのうち、例として、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、フルオシノロン、アルドステロン、スピロラクトン、ダナゾール（またOPTINAとして知られている）およびその他、がある。

40

【0086】

用語「ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体γ剤」または「PPAR-γ剤」、または「PPARG剤」、または「PPARガンマ剤」は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体に直接的または間接的に作用する薬剤を指す。またこの薬剤は、PPAR-α、「PPARA」の活性に影響し得る。

【0087】

50

用語「オートファジーを調節する薬剤」は、細胞の生存、細胞死、生存、オートファジー、増殖、再生などの調節物質を指す。

【0088】

用語「単球走化性タンパク質」または「MCP」は、損傷および感染症の部位へ単球を動員する役割を果たす小分子誘導可能遺伝子（small inducible gene：SIG）のファミリーまたはメンバーを指す。また、これらの用語は、C-Cモチーフモカイン分子を指し、この活性は、たとえばマクロファージの動員および／または増殖および／または活性化を含む。

【0089】

特段他の記載がない限り、本明細書中で使用される用語「アルキル」は、アルカンからの水素原子の除去に由来する直鎖または分枝鎖の飽和基を指す。典型的な直鎖アルキル基として、限定するものではないが、－メチル、－エチル、－nプロピル、－nブチル、－nペンチル、およびn－ヘキシルが挙げられる。典型的な分枝鎖のアルキル基として、限定するものではないが、イソプロピル、－sec－ブチル、－イソブチル、－tert－ブチル、－イソペンチル、－ネオペンチル、1－メチルブチル、2－メチルブチル、3－メチルブチル、1，1－ジメチルプロピル、および1，2－ジメチルプロピルが挙げられる。

【0090】

本明細書中で使用されるように、「a」、「an」、または「the」は、1つまたは1超を意味する。さらに、言及される数字の記載と関連して使用される場合の用語「約」は、言及された数字の記載±言及した数字の最大10%を意味する。たとえば、用語「約50」は、45～55の範囲を含む。

【0091】

本明細書中に記載されるように、すべての組成のパーセンテージは、特段他の記載がない限り、総組成物の重量パーセントである。本明細書中で使用されるように、用語「含む（include）」およびその変形は、列挙される項目の記載が、この技術の物質、複合物、デバイス、および方法に同様に有益であり得る他の項目を除外しないように、非限定的に意図されている。同様に、用語「できる（can）」および「し得る（may）」およびその変形は、実施形態が、特定の要素または特徴を含むことができるもしくは含み得る記載が、これら要素または特徴を含まない本技術の他の実施形態を除外するものではないように、非限定的であるように意図されている。

【0092】

含む（including、containing）は、または有する（having）などの用語の同義語としてのオープンエンドの用語「含む（comprising）」は、本発明を説明かつ請求するために本明細書中で使用されているが、本発明またはその実施形態は、「～からなる」または「～から本質的になる」などの代替的な用語を使用して代替的に使用され得る。

【0093】

DNIRA

様々な実施形態では、本発明は、当該分野で知られている様々な技術を使用した光学的なイメージングを含む。たとえばこのような技術として、限定するものではないが、cSLO、FAF、血管造影、OCTが挙げられ、これらの三次元構築を含む。本発明の様々な実施形態では、光に眼を曝露することは、cSLO、FAF、DNIRA、血管造影、またはOCTを行うことを含む。様々な実施形態では、イメージングは、DNIRAである。様々な実施形態では、上記技術のいずれかの組み合わせを使用することができる。

【0094】

以前より、本発明者は、臨床試験から予測されるように（データ不図示）、ヨウ素酸ナトリウムの全身送達後に、低蛍光FAFのパッチが、RPE喪失領域（非臨床状況、すなわち非ヒトの眼）において、in vivoでは観察されていないことを示した。しかしながら、遅延性の近赤外線解析（DNIRA）と呼ばれる技術である、近赤外線（NI

10

20

30

40

50

R) 色素のインドシアニンググリーン (ICG)、などの蛍光色素でRPEをあらかじめ標識することにより、RPEは、cSLOイメージングを使用して可視化される。いったん標識されると、RPE喪失の領域は、臨床的に観察したパッチと類似の定量可能な過蛍光のパッチとして現れることとなる。様々な実施形態では、 NaIO_3 、FAF、およびDNIRAは、単なる例として、RPE喪失、マクロファージ、マクロファージの分極化、およびM1応答の調節の間の関係性を示すために共に使用されてもよい。

【0095】

DNIRAでは、非毒性の用量で投与される場合、ICGなどの近赤外線 (NIR) の色素を含む蛍光検出に適した化合物は、RPEを標識することができ、よって標識から数日から数週間以内に、ICGの励起／発光フィルターを使用して見る場合に可視化させることができる。重要なことに、この標識から数日から数週間の可視化は、色素を再度投与することなく可能であり得る。よって、一部の態様では、DNIRA技術の中心的な構成は、そのタイミングにある。これは、色素の血管内部での位置および即時的な色素の血管外漏出を判定するための、注射の直後、一過性の段階、または注射から数分から数時間以内で見られるICGまたは他の血管造影の色素の現在の使用とは、明らかに異なる。

【0096】

一部の実施形態では、DNIRAは、研究動物で使用される。一実施形態では、DNIRAは、蛍光検出に適した化合物の投与を含んでもよく、非限定的な例として、毒素、またはRPE喪失のパッチ状の地図状領域を引き起こす他の薬剤（たとえば NaIO_3 ）を用いた投与の約1日またはそれ以上前、次いで任意に、追加的な量の NaIO_3 またはパッチ状のRPE喪失の領域の拡大を引き起こす別の薬剤を用いた投与の約1日またはそれ以上、（または約1週間、または約1か月、または約3か月）での、ICGの投与（および任意の血管造影）がある。たとえば、地図状萎縮の拡大を引き起こす他の課題（たとえば最初、または2回目、または3回目、または4回目の投与時）は、細胞の生存、細胞死、生存、オートファジー、増殖、再生などの調節物質であり得る。

【0097】

様々な実施形態では、DNIRA技術は、ヒトの患者に使用する。たとえば、ヒトの患者におけるDNIRAは、毒素の使用を含み得ない。ヒトの患者におけるDNIRAは、所定の励起／発光フィルターを伴うが、血管造影を伴わずに蛍光色素を使用した、眼における正常な変化または疾患に関連する変化の評価を含んでもよい。

【0098】

地図状萎縮の拡大は、米国食品医薬局 (FDA) により承認された臨床試験設計の主な結果であり、よって本発明は、動物モデルにおける地図状萎縮、特に地図状萎縮の拡大の観察を可能にすることにより、前臨床疾患モデルと臨床試験の設計との間の相関を可能にする。本発明の前に、動物の眼において地図状萎縮、または地図状萎縮の拡大を明確に同定することができないことから、前臨床試験と臨床初見との間の直接的な相関が妨げされていた。さらに、一部の実施形態では、本発明は、ヒトの患者において、地図状萎縮の拡大を含む地図状萎縮の臨床評価を可能にする。

【0099】

一部の実施形態では、蛍光検出に適した化合物は、蛍光の様々な波長を用いたイメージングに適している。一部の実施形態では、これらの波長は、可視光から赤外線、たとえば、390nm～1mmの範囲にあり、たとえば、青色光、白色光、近赤外線を含む。一部の実施形態では、色素は近赤外色素である。一部の実施形態では、色素はICGである。

【0100】

一部の実施形態では、DNIRAは、投与してから約1日後、または約2日後、または約3日後、または約4日後、または約5日後、または約6日後、または約7日後、または約10日後、または約14日後、または約21日後に、行われる（および／または遅延性の近赤外線蛍光 (DNIRF) が観察される）。一部の実施形態では、DNIRAは、投与から少なくとも1日後、または投与から少なくとも2日後、もしくは少なくとも3日後、もしくは少なくとも4日後、もしくは少なくとも5日後、もしくは少なくとも6日後、

もしくは少なくとも7日後、もしくは少なくとも10日後、もしくは少なくとも14日後、もしくは少なくとも21日後に行われる。他の実施形態では、DNIRAは、投与から少なくとも約24時間後、または少なくとも約7日後、または少なくとも約30日後、または少なくとも約60日後、または少なくとも約90日後に行われる。他の実施形態では、DNIRAは、投与から少なくとも約2か月後、または約3か月後、または約4か月後、または約5か月後、または最大約6か月後に行われる。一部の実施形態では、DNIRAは、移行期（すなわち、色素が眼血管を介して眼組織に流れる際の色素の第1の移動）またはその後の数分間の間に行われる。

【0101】

一部の実施形態では、可視化は、cSLOを使用してもたらされる。一部の実施形態では、可視化は、白色光および適切なフィルターを使用してもたらされる。一部の実施形態では、ICG励起／発光フィルターは、795nm（励起）／810nm（発光）フィルターである。

【0102】

RPEは、眼の固有の光受容体、桿状体、および錐状体用の「神経細胞」の機能に作用させる重要な上皮の単層である。たとえばAMDおよびRPDなどの失明疾患は、理論による拘束を望むものではないが必然的に、RPEの異常と部分的に関連する。

【0103】

DNIRAにより、動物の眼において、*in vivo*でRPEの層を明確に同定することが可能である。さらに、ヒトの眼においてRPEを検出するために使用される主な技術、FAFは、おそらくはリポフスチンなどのフルオロフォアの相対的な不足により、げっ歯類の眼（非限定的な例）では無効、または有効とするには不十分である。ヒトの眼におけるFAFイメージングは、刺激／発光フィルターの存在下での青色スペクトラムの非コヒーレント光、または青色のコヒーレント光を使用して行い、かつ存在しないRPE（例えば低蛍光シグナル）または異常なRPE（例えば過蛍光シグナル）の領域を同定することができる。DNIRAの非存在下で、動物の眼においてRPEを明確に同定できないことにより、前臨床試験と臨床初見との間の直接的な相関が排除されていた。

【0104】

よって、本発明の様々な態様では、眼障害の前臨床試験のための、たとえばDNIRAなどの、RPE層を可視化させる方法を提供する。

【0105】

さらに、本明細書中に記載されるように、DNIRAまたはその変形は、動物の眼で蛍光性免疫細胞の可視化を可能にする。一部の実施形態では、DNIRAは、任意に毒素の投与を含まなくてもよい。一部の実施形態では、DNIRAはヒトの患者で行われ、毒素は使用しない。

【0106】

さらに、本明細書中に記載されるように、DNIRAまたはその変形は、ヒトの対象の眼で蛍光性免疫細胞の可視化を可能にする。ヒトの対象を用いる一部の実施形態では、DNIRAは、毒素の投与を含まなくてもよい。

【0107】

一部の実施形態では、DNIRAは、眼障害の治療に有効な薬剤の同定に使用される。

【0108】

一部の実施形態では、DNIRAは、眼障害（限定するものではないが、AMDおよびRPDを含む）を有する、または有し得る患者を評価するための方法として、使用される。一部の実施形態では、DNIRAは、眼障害（限定するものではないが、AMDおよびRPDを含む）の診断、および／または予後、および／または進行のための代わりとなるバイオマーカーである。たとえば、DNIRAを使用して、眼疾患状態（限定するものではないがAMDおよびRPD）を示す、他のイメージング手法では見られていない過蛍光および低蛍光が交互のDNIRAのレース状、網状、またはヒョウ柄状のパターンを含むパターンを同定することができる。また、DNIRAは、過蛍光および低蛍光のDNIR

10

20

30

40

50

Aの領域を同定かつ定量化するために使用してもよい。

【0109】

様々な実施形態では、DNIRAは、眼の低蛍光の特性を同定するために使用する。たとえば、これらの領域はイメージングされると黒色で現れ、よって、簡単に定量化することが可能である（黒色／白色よりはグレースケールである、ICGイメージングとは対照的であり、または過蛍光シグナルとは対照的である）。低蛍光DNIRAの検出は、一部の実施形態では、損傷または死滅したRPEを予測するものである。たとえば、低蛍光DNIRAは、RPEの不存在、異常性／非健常なRPE（ICG色素を取り込むことができない）、ブルッフ膜と接触していないRPE（およびもはや、脈絡膜の脈管構造からICG色素を取り込む位置にないRPE）、ならびにRPEとBMとの間に位置することができ、またはRPE内部にあり得る脂質の存在のうちの1つまたは複数を示してもよい。

10

【0110】

様々な実施形態では、DNIRAは、眼の過蛍光の特性を同定するために使用する。たとえば、これらの領域は、イメージングする際に光るように現れ、よって容易に定量化することが可能である。過蛍光DNIRAの検出は、一部の実施形態では、M1および／またはM2マクロファージを含むマクロファージを予測するものである。

【0111】

様々な実施形態では、DNIRAは、眼疾患状態（限定するものではないがAMDおよびRPD）の診断のためのバイオマーカーとして使用され、さらには、限定するものではないが本明細書中に記載されるものを含む1つまたは複数の薬剤を用いた評価および／または治療を促進する。

20

【0112】

様々な実施形態では、DNIRAは、眼疾患状態（限定するものではないがAMDおよびRPD）の予後のためのバイオマーカーとして使用され、限定するものではないが、本明細書中に記載されるものを含む1つまたは複数の薬剤を用いた評価および／または治療をさらに促進する。

【0113】

様々な実施形態では、DNIRAは、試験の動員に適した患者の同定を改善するため、および疾患の進行を評価するために使用する。様々な実施形態では、DNIRAは、疾患の進行をモニタリングするために使用する。

30

【0114】

様々な実施形態では、DNIRAは、本明細書中に記載の薬剤のいずれかに対するコンパニオン診断として、使用する。様々な実施形態では、DNIRAは、本明細書中に記載の薬剤のいずれかに応答する患者を評価する（本明細書中に記載の薬剤の有効性を評価すること、および／または本明細書中に記載の薬剤のいずれかに応答する可能性を含む）ために、使用する。様々な態様では、さらに本発明は、臨床試験設計のための、受け入れ（entrance inclusion）、除外基準、またはエンドポイント解析としてのDNIRAの使用に関する。

【0115】

眼障害

40

眼障害は、様々な眼障害のうちの1つを指し、かつ眼および眼球付属器の疾患を含むものである。一部の実施形態では、眼障害は、たとえば、糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォークト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェゲナー肉芽腫症、滲出型AMD、非滲出型AMD、RPD、白点症候群（たとえば匍行性網脈絡膜症、匍行性網膜症、急性後部多発性小板状色素上皮症（APMPPE）、多発一過性白点症候群（MEWDS）、急性帯状潜在

50

性網膜外層症（A Z O O R）、点状脈絡膜内層症（P I C）、びまん性網膜下線維症（D S F）、L O R D s、および中心性漿液性網膜症（C S R）である。

【0116】

様々な実施形態では、眼障害は、D N I R Aまたは当該分野で知られている技術を使用して、評価される、かつ／または同定可能である。例示的な技術として、c S L O、F A F、O C T（断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む）、S D－O C T（断面像、三次元像、および正面像を含む）、血管造影、または他の蛍光波長を含むイメージング手法が挙げられる。一部の実施形態では、これらの波長は、青色～赤外線、たとえば390nm～1mmの範囲であり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、赤外線を含む。

10

【0117】

様々な実施形態では、眼障害は、R P Eの損傷もしくは喪失または網膜外部の喪失のパッチの中のF A Fのパターンにより、評価される、かつ／または同定可能である。一部の実施形態では、このようなパターンは、曲線状、リボン様、網状、長円、円形、貝殻状、暈状、および標的様病変のうちの1つまたは複数である。

【0118】

様々な実施形態では、眼障害は、R P Eの損傷もしくは喪失または網膜外部の喪失のパッチの境界内のF A Fのパターンにより評価される、かつ／または同定可能である。一部の実施形態では、このようなパターンは、曲線状、リボン様、網状、長円、円形、貝殻状、暈状、および標的様病変のうちの1つまたは複数である。

20

【0119】

様々な他の実施形態では、眼障害は、断面のパターンまたは横断したパターンにより、評価される、かつ／または同定可能である。一部の実施形態では、このようなパターンはO C Tを用いて観察される。一部の実施形態では、パターンは、R P Eおよび／もしくは網膜外部の喪失、または網膜下腔で見いだされる隆起、三角形、ピーク、もしくはスパイクである。

【0120】

他の実施形態では、眼障害は、対象の眼における過蛍光F A Fの領域の存在、ならびに／または対象の眼における異常に蛍光するF A Fの1つもしくは複数の領域の存在、ならびに／または対象の眼における、青色スペクトルの眼底のイメージング、白色光の眼底のイメージング、赤色を含まない光の眼底のイメージング、およびO C Tのうちの1つまたは複数の変化、ならびに／または非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（たとえば一過性の増加）、ならびに／または網膜外部の変形、ならびに／または、非疾患状態と比較した、対象の脈絡膜と網膜の間の上皮関門を隔てた網膜中央の脈管構造の変形、ならびに／または非疾患状態と比較した、対象のR P Eを通した食作用免疫細胞の存在により、評価される、かつ／または同定可能である。例示的な変化として、2つの異なる時点および／または実験条件もしくは臨床条件の、異なる対象および／または動物の同一のイメージングパターンの差異が挙げられる。たとえば、変化は、同一の対象および／もしくは動物の2つの評価の間のイメージングデータの変化、ならびに／または第1の対象および／もしくは動物と第2の対象および／もしくは動物との間のイメージングデータの変化を含む。

30

40

【0121】

さらなる他の実施形態では、眼障害は、対象の眼における網膜のイメージング（ここでの網膜のイメージングは、白色光、赤色を含まない光、青色光、F A F、近赤外線（N I R）、赤外線（I R）、血管造影、およびD N I R Aのうちの1つまたは複数である）の明確なパターンの1つまたは複数の領域の存在、ならびに／または対象の眼の異常に蛍光するF A Fの1つもしくは複数の領域の存在、ならびに／または、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（たとえば一過性の増加）、ならびに／または、非疾患状態と比較した、対象のR P Eを通した食作用免疫細胞の存在により、評価される、かつ／または同定可能である。

50

【0122】

一部の実施形態では、眼障害は、糖尿病性眼疾患であり、非限定的な例として、糖尿病性網膜症およびDMEがある。一部の実施形態では、糖尿病性眼疾患は、1型糖尿病または2型糖尿病の患者で見いだされる。様々な実施形態では、治療すべき糖尿病性眼疾患の患者は、正常値（食事前に約70～130ミリグラム／デシリットル、すなわちmg／dl、および食事から1～2時間後に180mg／dl未満）を超える血中グルコースレベルを有する。

【0123】

一部の実施形態では、糖尿病性眼疾患は、以下の段階：軽度の非増殖性網膜症（毛細血管瘤が発症し得る）；中度の非増殖性網膜症（網膜に栄養を与える一部の血管が阻害され得る）；および重度の非増殖性網膜症（多くの血管が阻害され得、いくつかの網膜領域への血液供給が欠乏する）；ならびに増殖性網膜症（栄養に関する網膜により送られるシグナルが、新規血管の増殖の引き金となる）のうちの1つまたは複数の糖尿病性網膜症である。

【0124】

一部の実施形態では、眼障害（たとえば糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォクト・小柳障害（たとえば糖尿病性眼疾患（たとえば糖尿病性網膜症およびDME）、フォクト・小柳・原田病（VKH）；サルコイドブドウ膜炎；眼ヒストプラスマ症および／または推定眼ヒストプラスマ症候群；自己免疫性ブドウ膜炎；全身性疾患、たとえばループス、クローン病、関節リウマチ、および他の既知の免疫起源の疾患に関連したブドウ膜炎；後部ぶどう膜炎（Posterior uveitis）（まだ診断され得ないものを含む）；前部ブドウ膜炎（たとえば虹彩炎）；ベーチェット病；結節性多発動脈炎；ならびにウェグナー肉芽腫症）の治療または予防のための、本発明の方法は、レーザー外科手術（たとえば散乱レーザー治療、焦点レーザー治療、光凝固）を行うこと、および／または硝子体切除術（たとえば血管を、患者の眼の中心から除去する）を行うこと、および／またはステロイドの投与、および／またはラニビズマブ（Ranibizumab）（LUCENTIS）、ベバシズマブ（Bevizumab）（AVASTIN）またはアフリベルセプト（EYLEA）などの抗VEGF抗体剤を投与することをさらに含む。

【0125】

一部の実施形態では、糖尿病性眼疾患は、白内障または緑内障（たとえば新生血管緑内障）である。

【0126】

様々な実施形態では、眼障害はAMDである。AMDは、先進国の世界において主な失明の原因である。初期のAMDは、疾患の特徴であるドルーゼンの集積を特徴とし、地図状萎縮（GA）および脈絡膜新生血管（CNVM）は、それぞれ、末期の非滲出型（いわゆる「非滲出型（dry）」または萎縮性）および滲出型（いわゆる「滲出型」または血管新生）疾患の失明性の合併症である。抗VEGF療法は、滲出型AMDのFFの治療を改革したが、すべてのAMDの事例の12～15%のみを表すものである。ビタミンの補給により、治療が存在しない非滲出型AMDの進行の速度を遅らせることができる。

【0127】

様々な実施形態では、眼障害は、初期の非滲出型（non exudative またはdry）のAMDである。初期の非滲出型のAMDは、ドルーゼンの集積および色素変化またはRPEの脱離などの関連する特性を特徴とする。末期または進行した非滲出型AMDは、RPEおよび覆っている光受容体のパッチ状の萎縮症を特徴とすることができる。これらのパッチは、いわゆる「window defect」と呼ばれるように臨床的に可視化されており、「地図状萎縮」の領域として知られている。

【0128】

様々な実施形態では、眼障害は滲出型AMDである。滲出型AMDは、出血かつ体液を漏出し得る網膜またはRPEの下の新規血管の増殖を特徴とし、多くの場合、中心視野の

10

20

30

40

50

急速かつ多くの場合は重篤な喪失をもたらす。この中心視野の喪失は、読む、運転する、顔を認識する能力を損なうことにより、患者の日常に有害な影響を与える。場合によって、黄斑変性は、非滲出型から滲出型へ進行する。

【0129】

一実施形態では、本方法は、同時に行われる、同一の患者の滲出型AMDおよび非滲出型AMDの治療に関する。

【0130】

一実施形態では、眼障害は、脈絡膜新生血管（CNVM）に関連する。

【0131】

一部の実施形態では、AMDは、眼底の内因性の、天然にまたは病理学的に存在するフルオロフォアの空間マッピング（二次元、正面など）のための、FAF、*in vivo*でのイメージング方法を使用して、検出または評価する。一部の実施形態では、理論による拘束を望むものではないが、FAFイメージングは、*in vivo*でRPEの可視化を可能にし、脈絡網膜性障害および網膜色素上皮症の発病における代謝上の変化をより良く理解することを支援することができる。FAFは、当該分野でよく知られている（たとえば、Bellman et al., Br J Ophthalmol 2003 87: 1381-1386を参照されたい。この内容は本明細書中参照として援用されている）。

【0132】

一部の実施形態では、AMDおよび／またはRPEの損傷または喪失は、白色光、青色光、近赤外線、赤外線を含む光の他の波長によっても可視化することができ、それを通して脈絡膜を見ることができる「window defect」として可視化することができる。一部の実施形態では、AMDおよび／またはRPEの損傷または喪失は、cSLO、FAF、OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、SD-OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、または他の手法によっても可視化されてもよく、これらは、他の蛍光波長（たとえば波長は青色～赤外線、例えば390nm～1mmの範囲にあり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。

【0133】

一部の実施形態では、末期の非滲出型AMDにおいて、地図状萎縮の領域は、低蛍光の領域または暗いFAFとして明確に可視化されている。ある実施形態では、これらは、RPEが失われた領域を示す。

【0134】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは、対象の眼における過蛍光のFAFの領域の存在により、同定可能である。一部の実施形態では、過蛍光のFAFの領域の存在により同定可能である非滲出型AMDは、進行中の初期または末期の非滲出型AMDである。一部の実施形態では、過蛍光FAFは、リポフスチンもしくはリポフスチン様物質の正常な密度の可視化の増加により引き起こされ得る蛍光の増加、または組織のリポフスチン含有量の増加を指す。リポフスチンは、脂質を含むまたは含むことのない、タンパク質の混合物を含み、これら成分は、適切な波長の青色蛍光下で蛍光する。リポフスチン様蛍光はまた、このスペクトルでも起こり得、かつ、リポフスチンおよびその構成以外の分子により、起こり得る。

【0135】

リポフスチン様蛍光は、RPE細胞、およびRPE細胞以外の細胞、たとえば免疫系細胞（食作用免疫細胞）などで起こり得る。

【0136】

他の実施形態では、AMDは、対象の眼におけるFAFの異常なパターンの存在により、同定可能である。一部の実施形態では、異常な蛍光FAFは、対象の眼で観察される正常な蛍光性FAFパターンからの偏差を指す。正常なFAFでは、cSLOまたは改変した眼底カメラを使用すると、視神経乳頭は、RPEの不存在（よってリポフスチンがない

10

20

30

40

50

）により暗く（黒色）、血管もまたは、根底にあるRPE単層からの蛍光を遮断しているため、暗い。中心の黄斑領域では、FAFシグナルは、黄体の色素による青色光の吸収によって低減される。これらの正常な青色光FAFの特徴は、異常な蛍光の存在を評価する際に考慮され得る。

【0137】

一部の実施形態では、AMDおよび他の失明疾患に関連する過蛍光FAFは、複合的であり得る二次元の空間パターンを示し得る。一部の研究では、過蛍光FAFのこれらのパターンは、初期から末期（新生血管または萎縮性）疾患の、疾患進行速度と相関する。これらのパターンは、当該分野で理解されている（たとえばSchmitz-Valckenberg et al. Survey of Ophthalmology. 2009 Jan-Feb; 54(1):96-117; Bindewald et al. British Journal of Ophthalmology. 2005 Jul; 89(7):874-8; Holz et al. Am. J Ophthalmology. 2007 Mar; 143(3):463-72を参照。この内容全体は本明細書中参照として援用されている）。

10

【0138】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは初期のAMDであり、または末期の萎縮性非滲出型AMDである。

【0139】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは末期であり、前より存在する地図状萎縮の境界であり、かつ隣接する領域（いわゆる接合領域）における、過蛍光または異常に蛍光するFAFの領域の存在を特徴とする。

20

【0140】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは、末期であり、前より存在する地図状萎縮の不非存在下での、過蛍光または異常に蛍光するFAFの領域の存在を特徴とする。これらの実施形態では、理論による拘束を望むものではないが、この特徴は、RPEの喪失をさらに予測し得る。

【0141】

一部の実施形態では、初期および末期の両方における非滲出型AMDは、免疫細胞（たとえば食作用免疫細胞）の存在を特徴とする。免疫細胞の存在は、除核後または死後の眼の試料から、推定することができる。本明細書中に記載されるように、一部の実施形態では、免疫細胞の存在は、DNIRAを使用して評価する。

30

【0142】

一部の実施形態では、「びまん性-しずく型(diffuse trickling)」などのイメージング(FAF)パターンに関連する障害は、本明細書中に記載の方法を使用して、評価、治療、または予防することができる。びまん性-しずく型(diffuse trickling)パターンは、当該分野で知られている（たとえばSchmitz-Valckenberg et al. Survey of Ophthalmology. 2009 Jan-Feb; 54(1):96-117; Bindewald et al. British Journal of Ophthalmology. 2005 Jul; 89(7):874-8; Holz et al. Am. J Ophthalmology. 2007 Mar; 143(3):463-72を参照されたい。この内容全体は、本明細書中参照として援用されている）。

40

【0143】

一部の実施形態では、非滲出型AMDは、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（たとえば一過性の増加）により、同定可能である。これは、血管（内皮）の透過性と異なる。たとえばこれは血管造影を使用してみることが可能である。

【0144】

一部の実施形態では、DNIRAは、本明細書中に記載の眼障害のいずれかを同定かつ

50

／または診断するために使用する。一部の実施形態では、R P Eの毒性、R P Eの喪失、および非滲出型A M Dは、たとえばヨウ素酸ナトリウム（ NaIO_3 ）を用いて、または疾患の存在下で、D N I R Aを使用して同定可能である。地図状萎縮に類似する領域は、たとえば、 NaIO_3 で処理した眼の、組織解析により（たとえばR P E 65などのR P E細胞マーカーの喪失および／または二核細胞の染色の喪失を観察することにより）、かつ／またはi n v i v oでD N I R Aを使用することにより、検出することができる。一部の実施形態では、R P Eの毒性、R P Eの喪失、および非滲出型A M Dは、過蛍光F A Fシグナルを示すF A Fを使用することにより同定可能であり、近接した組織の喪失の中、またはその境界では複合的であり得る。この複合的な過蛍光F A Fシグナルは、 NaIO_3 の処置から数日～数週間、F A Fパターンへと発達し、複合的となり得、かつ限定するものではないが、リボン様、曲線、インターレース状、分枝状、または網状の過蛍光を含むことができる。このようなパターンは、臨床非滲出型A M Dで見いだされるパターンを模倣する。このようなF A Fはまた低蛍光であってもよい。

10

【0145】

さらに、血管造影単独で、またはD N I R Aの一部として使用することにより、変質したF A Fの領域の発現の直前に行われた血管造影、または同時に行われた血管造影は、脈絡膜と網膜との間の上皮性関門を通した透過性の増加（一過性の増加を含む）を示し得る（たとえば、イメージング前に注射され得る色素の漏出により観察されるなど：このような色素はI C Gを含む）。この障壁は、通常、内部脈絡膜、ブルッフ膜、R P E細胞、および可能な場合は、R P Eおよび外境界膜と結合した外部光受容体の構成を含む。理論による限定を望むものではないが、この特化した上皮性関門の一過性の崩壊は、網膜外部、光受容体層のフォールディング、凹凸もしくは変形、ならびに／または脈絡膜から網膜下腔への炎症細胞の移動／遊走を含む、その後の一連の事象の根拠となり得る。しかしながら、一部の実施形態では、この段階は、一過性であり、解決される場合があり、またはその度合いでは無症状であり得る。

20

【0146】

一部の実施形態では、非滲出型A M Dは、非疾患状態と比較した、対象の網膜色素上皮（R P E）にわたる免疫細胞（たとえば食作用免疫細胞または天然の免疫細胞）の存在（たとえば流入）により、同定可能である。脈絡膜から網膜下腔または網膜内層から網膜外部または網膜下腔までの炎症細胞の移動／遊走が存在する場合、このような細胞は、当業者知られている染色方法により、除核した眼または切除した組織で同定されてもよい、 NaIO_3 モデルでは、I b a 1染色は、免疫系の活性化細胞を検出するために使用されてもよい。さらに、これら細胞の存在は、たとえば、単球／マクロファージの欠失が行われている NaIO_3 調製物との比較により、確認されてもよい。このような欠失は、当該分野で知られており、塩化ガドリニウム（G A D）またはクロドロネートでの処理により、達成されてもよい。一部の実施形態では、免疫細胞の存在（たとえば流入）は、D N I R Aの使用により、i n v i v oで測定かつ／または決定される。本発明の前に、このようなi n v i v oでの可視化は、臨床状況では可能ではなかった。

30

【0147】

さらに、対象の細胞で同定され得る免疫細胞の例としての、マクロファージは、サブセット：臨床的（M1）または代替的に（M2）に活性化したマクロファージ（たとえばL a s k i n, C h e m R e s T o x i c o l. 2009 August 17; 22（8）: 1376-1385, 参照、この内容全体は本明細書中参照として援用されている）により、分類することができる。理論による限定を望むものではないが、M1マクロファージは、I F N γ 、L P S、およびT N F α などの標準的な機構により活性化されるが、M2マクロファージは、I L-4、I L-13、I L-10、およびT G F β などの代替的な機構により活性化されている。理論による限定を望むものではないが、M1マクロファージは、細胞傷害性、炎症誘発性の表現型を示すが、M2マクロファージは、免疫応答および炎症応答の一部の態様を抑制し、創傷治癒および血管新生に参与する。一部の実施形態では、本発明は、M1およびM2マクロファージのうちの1つまたは複

40

50

数の阻害、調節、または分極化を含む。

【0148】

一部の実施形態では、非滲出型のAMDは、対象の眼における青色スペクトルの眼底のイメージング、白色光の眼底のイメージング、赤色を含まない光の眼底のイメージング、およびOCTのうちの1つまたは複数の変化により、同定可能である。一部の実施形態では、非滲出型AMDは、cSLO、FAF、OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、SD-OCT（断面像、三次元像、および正面像）、または他のイメージング機構のうちの1つまたは複数の変化により同定可能であり、これは、他の蛍光波長（たとえば青色～赤外線までの範囲の波長、例えば390nm～1mmであり、例えば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。例示的な変化は、2つの時点および／または実験条件もしくは臨床条件において異なる対象および／または動物の同一のイメージングパターンの差異を含む。たとえば変化は、同一の対象および／もしくは動物の2つの評価間のイメージングデータの差異、ならびに／または第1の対象および／または動物のイメージングデータと第2の対象および／もしくは動物のイメージングデータとの間の差異を含むことができる。

10

【0149】

一部の実施形態では、AMDは、OCTにより同定可能である。一部の実施形態では、断面の画像は、網膜下腔における、浅部の隆起、または錐体もしくはスパイク様のシグナルの存在を示す。3次元または正面像のOCTイメージングは、リボン様、または曲線、長円、円形、暈状、または標的様のシグナルを明らかにする。一部の実施形態では、断面のパターンまたは横断パターンは、RPEおよび／または網膜外部の喪失（萎縮症）、または網膜下腔で見いだされた隆起、三角形、ピーク、もしくはスパイクを含む。様々な実施形態では、これらの特徴はAMDを表す。

20

【0150】

さらに本発明は、限定するものではないが、「網膜ドルーゼン様疾患」、「偽網状ドルーゼン」、および「ドルーゼン様黄斑疾患」、または「網膜下のドルーゼン様沈着物の存在を特徴とする疾患」としても知られている、RPD疾患の治療または予防のための方法を提供する。理論による拘束を望むものではないが、RPDは、AMDのサブタイプであってもよく、またはAMDに関連していてもよい。AMDおよびRPDの両方は、脈絡膜血管疾患または地図状萎縮の失明性の合併症をもたらす可能性がある。

30

【0151】

一部の実施形態では、RPD疾患は、偽ドルーゼン物質が、治療時に、減少、または根絶し、または遅延する集積および／もしくは拡大を伴う、疾患である。一部の実施形態では、本発明は、対象の眼の中心窩領域および／または周中心窩領域および／または近傍中心窩領域の治療後に偽ドルーゼンが減少または根絶される、RPD疾患を治療する方法を提供する。

【0152】

一部の実施形態では、さらに本発明は、初期から末期への疾患の進行速度が低下するRPD疾患の治療または予防の方法を提供する。末期の疾患として、たとえば脈絡膜新生血管または地図状萎縮を挙げることができる。

40

【0153】

一部の実施形態では、さらに本発明は、地図状萎縮の拡大速度が低下するRPD疾患の治療または予防の方法を提供する。

【0154】

一部の実施形態では、RPD疾患は、FAFまたは他の蛍光波長を含む他のイメージング様式により、同定可能である。一部の実施形態では、これらの波長は、青色～赤外線の範囲であり、たとえば390nm～1mmであり、たとえば青色光、白色光、近赤外線、または赤外線を含む。

【0155】

一部の実施形態では、RPD疾患は、過蛍光FAFおよび／または異常蛍光FAF、ま

50

たは他の蛍光波長を含む他のイメージング様式の領域の存在により、同定可能である。一部の実施形態では、これらの波長は、青色～赤外線範囲、たとえば390nm～1mmであり、たとえば青色光、白色光、近赤外線、および赤外線を含む。一部の実施形態では、RPD疾患はDNIRAを使用することにより、同定可能である。

【0156】

一部の実施形態では、RPD疾患は、白色光、青色光、FAF、および近赤外線、および赤外線のうちの少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも3つ、または少なくとも4つを使用して、同定することができる。特定の実施形態では、RPD疾患は青色光により同定可能である。

【0157】

一部の実施形態では、RPD疾患は、OCTにより同定可能である。一部の実施形態では、断面の画像は、網膜下腔における、浅い隆起、または錐体もしくはスパイク様のシグナルの存在を示す。3次元または正面像のOCTのイメージングは、リボン様、または曲線、長円、円形、暈状、または標的様のシグナルを明らかにする。

【0158】

一部の実施形態では、RPDは、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の増加（たとえば一過性の増加）により、同定可能である。これは、血管（内皮）の透過性とは異なる。たとえばRPE毒性のヨウ素酸ナトリウム（NaIO₃）モデルを含むDNIRを使用すると、RPEの損傷または喪失の地図状の領域は、たとえば、組織解析（たとえばRPE65などのRPE細胞マーカーの喪失、ならびに／または二核性の細胞染色の喪失を観察することによる）により、検出できるように、形成することができる、さらに、NaIO₃で処理したRPEのFAFのイメージングは、過蛍光FAFシグナルを示し、これは、近接組織喪失領域内、および／またはその境界で複合的であり得る。この過蛍光FAFシグナルは、NaIO₃処理から数日～数週間、限定するものではないが、リボン様、曲線、魚形、貝殻状、インターレース状、分枝状、または網状の過蛍光を含む複合的なFAFとすることができる、パターンへと発達する。このようなパターンは、臨床的なRPDで見いだされたものを模倣する。

【0159】

さらに、DNIRAでは、変化したFAFの領域の出現の直前または出現と同時に進行した血管造影は、脈絡膜と網膜との間の上皮性関門を通した透過性の増加（一過性の増加を含む）（イメージングの前に注射され得る色素の漏出により観察されるなど；このような色素はICGを含む）を示す。この障壁は、通常、内部脈絡膜、ブルッフ膜、RPE細胞、および可能であるならばRPEおよび外境界膜と結合した外部光受容体の構成を含む。理論により拘束を望むものではないが、この特化した上皮性関門の一過性の崩壊は、光受容体層のフォールディング、凹凸、または変形を含む、その後の一連の事象に対して寛容であってもよい。しかしながら、一部の実施形態では、この段階は、一過性であり得、解決することができ、この度合までは無症状であり得る。

【0160】

一部の実施形態では、RPDは、非疾患状態と比較した、対象の網膜色素上皮（RPE）を通した免疫細胞（たとえば食作用免疫細胞）の存在（たとえば流入）により、同定可能である。一部の実施形態では、免疫細胞の存在（たとえば流入）は、DNIRAで、検出かつ／または測定されている。脈絡膜から網膜下腔または網膜内層から網膜外部または網膜下腔までの、炎症細胞の移動／遊走が存在する場合、このような細胞は、当該分野で知られているように染色により同定されてもよい。たとえばNAIO₃モデルを使用して、Iba1染色は、免疫系の活性化した食作用細胞を検出するために使用してもよい。さらに、これら細胞の存在は、単球／マクロファージの欠失が行われているNaIO₃調製物との比較により、確認されてもよい。このような欠失は、当該分野で知られており、たとえば塩化ガドリニウム（GAD）またはクロドロネートでの処理により、達成されてもよい。さらに、対象の細胞で同定されている食作用免疫細胞の例としてのマクロファージは、臨床的（M1）または代替的（M2）に活性化したマクロファージにより、分類され

10

20

30

40

50

てもよい。(たとえばLaskin, Chem Res Toxicol. 2009 August 17; 22(8): 1376-1385参照、この文献全体は本明細書中参照として援用されている)。理論による拘束を望むものではないが、M1マクロファージは、IFN γ 、LPS、およびTNF α 、などの標準的な機構により活性化されており、M2マクロファージは、IL-4、IL-13、IL-10、およびTGF β などの代替的な機構により、活性化されている。理論による拘束を望むものではないが、M1マクロファージは、細胞傷害性、炎症誘発性の表現型を表し、M2マクロファージは、免疫応答および炎症性応答の一部の態様を抑制し、創傷治癒および血管新生に関与している。たとえば、本発明は、一部の実施形態では、M1およびM2マクロファージのうちの1つまたは複数の阻害、調節、または分極化を含む。

10

【0161】

一部の実施形態では、RPD疾患は、対象の眼における青色スペクトラムの眼底イメージング、白色光の眼底のイメージング、赤色を含まない眼底のイメージング、およびOCTのうちの1つまたは複数の変化により、同定可能である。一部の実施形態では、RPD疾患は、cSLO、FAF、OCT(断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む)、SD-OCT(断面像、三次元像、および正面像を含む)、または他のイメージング様式のうちの1つまたは複数の変化により、同定可能であり、これは、他の蛍光波長(たとえば青色～赤外線、たとえば390nm～1mmであり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む)を含む。例示的な変化は、2つの異なる時点および/または実験条件もしくは臨床条件での、異なる対象および/または動物の同一のイメージングパターンの差異を含む。たとえば変化は、同一の対象および/もしくは動物の2つの評価の間のイメージングデータの差異、ならびに/または、第1の対象および/もしくは動物と第2の対象および/もしくは動物との間のイメージングデータの差異を含むことができる。

20

【0162】

別の実施形態では、眼障害は、c1qTNF5欠損またはそれに対応する遺伝子変異に関連するLORD(遅発性網膜変性)または網膜変性、または別の黄斑変性であって、限定するものではないが、シュタルガルト病、パターンジストロフィー、ならびに網膜色素変性症(RP)、および関連する疾患を含む。一実施形態では、黄斑変性は遺伝性である。

30

【0163】

他の実施形態では、失明疾患は、理論による拘束を望むものではないが、付随する黄斑変性を伴うまたは伴わない網膜炎症を特徴とし得る突発性の障害であって、限定するものではないが、白点症候群(たとえば匍行性網脈絡膜症、匍行性網膜症、急性後部多発性小板状色素上皮症(APMPPE)、多発一過性白点症候群(MEWS)、急性带状潜在性網膜外層症(AZOR)、点状脈絡膜内層症(PIC)、およびびまん性網膜下線維症(DSF))を含む。

【0164】

他の実施形態では、眼障害は、中心性漿液性網膜症(CSR)である。CSRは、周辺組織からの黄斑層の流体の脱離である。CSRは、多くの場合、網膜下またはRPE下腔への流体の漏出および集積を特徴とする。理論による拘束を望むものではないが、流体の漏出および集積は、RPEの小規模の破損により、起こり得る。

40

【0165】

一部の実施形態では、眼障害の1つまたは複数の、過蛍光および/または異常蛍光FAF、または350nm～1,000nmの光の他の波長の領域の存在により、同定可能である。一部の実施形態では、眼障害のうちの1つまたは複数の、DNIRAを使用して同定可能である。

【0166】

一部の実施形態では、眼障害のうちの1つまたは複数の、たとえば、cSLO、FAF、OCT(断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む)、SD-OCT(断面

50

像、三次元像、および正面像を含む）、または他のイメージング様式により、同定可能であり、これは他の蛍光波長（たとえば青色～赤外線、たとえば390nm～1μmであり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。

【0167】

一部の実施形態では、眼障害は、特定の段階または進行中であり得る。一部の実施形態では、眼障害は、初発性、新興性、静止性、進行性、または活動性であり得る。

【0168】

既存の眼障害を治療することに加えて、本発明は、これら障害の発症を予防または発症を遅延させるための予防方法を含む。予防的な使用では、薬剤は、特定の眼障害に罹患しやすい、またはリスクのある対象に投与することができる。このような罹患しやすさは、たとえば、家族性の素因、遺伝的な試験、リスク因子の解析、血液または他のサイトカインまたはバイオマーカーのレベル、および眼の試験により、決定されてもよく、これらは、FAF、青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、赤外線、DNIRAなどのマルチモード解析を含むことができる。またこのような罹患しやすさは、たとえば断面像、三次元像、および正面像を用いたOCTによる検出により、決定されてもよい。

【0169】

一部の実施形態では、眼障害は、以下のセクション：H30脈絡網膜性炎症、脈絡膜のH31の他の障害、他の場所で分類された疾患におけるH32脈絡網膜性障害、H33網膜の脱離および崩壊、H34の網膜血管閉塞、H35の他の網膜障害、およびその他と分類された疾患におけるH36の網膜障害において、疾病及び関連保健問題の国際統計分類またはICD-10（本明細書中参照として援用される）に列挙された1つまたは複数の疾患である。

【0170】

定義された既知の眼障害の治療に加えて、本発明は、白色光、青色光、FAF、赤外線、近赤外線、DNIRAを含む、300～1000nmの範囲の波長の光を使用した、または断面像、三次元像、および正面像を用いたOCTによる、*in vivo*でのイメージングの特定のパターンを含む。*in vivo*でのイメージングの特定のパターンに対する使用では、ある薬剤を、特定の失明疾患を有する、罹患しやすい、またはリスクのある対象に投与することができる。このような診断または罹患しやすさは、たとえば眼の試験、家族性の素因、遺伝的な試験、リスク因子の解析、および血液または他のサイトカインまたは他のバイオマーカーのレベルにより、決定してもよく、これらは、FAF、青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、赤外線、DNIRAなどのマルチモード解析を含むことができる。また、このような罹患しやすさは、たとえば断面像、三次元像、および正面像を用いたOCTによる検出により決定してもよい。

【0171】

本発明の薬剤

様々な態様では、本明細書中に記載されるいずれかの化合物または薬剤は、本発明の薬剤である。

【0172】

様々な態様では、本発明は、候補化合物および／または試験化合物の同定および使用を提供する。候補化合物および／または試験化合物の同定および使用を提供する実施形態では、候補化合物および／または試験化合物は、化学物質、分子、化合物、生物学的な物質（たとえば抗体またはペプチド）、薬剤、プロドラッグ、細胞治療、低分子量合成化合物、または小分子薬剤であってもよい。一部の実施形態では、候補化合物および／または試験化合物は、当該分野で知られている化合物のライブラリーから選択されている。一部の実施形態では、候補化合物は、眼障害の治療、失明疾患の予防、または眼障害の発病比率の低減に有用である。

【0173】

様々な態様では、本発明は、糖尿病性失明疾患、非滲出型AMDおよび／またはRPD

を含む、本明細書中に記載される疾患または障害のいずれかを治療または予防する方法を提供する。一部の実施形態では、式 I の化合物、メトトレキサート、またはその薬学的に許容可能な塩は、同様に追加的な治療剤とともに投与される。様々な実施形態では、追加的な治療剤は、本明細書中に記載の眼障害を治療するのに有効な薬剤との併用療法に使用してもよい。様々な実施形態では、本明細書中に記載の眼障害の治療に有効な薬剤は、1 つまたは複数の追加的な治療剤での治療を受けた患者に、投与される。追加的な治療剤は、たとえば、抗 V E G F 剤、A C E 阻害剤、P P A R ガンマアゴニストまたは部分的なアゴニスト、レニン阻害剤、ステロイド、およびオートファジーを調節する薬剤、ならびにセマピモド (semapimod)、M i F 阻害剤、C C R 2 阻害剤、C K R - 2 8 , 2 - チオイ ミダゾール、C A S 4 4 5 4 7 9 - 9 7 - 0 , C C X 1 4 0 , クロドロン酸、クロドロネートーリポソーム製剤、または塩化ガドリニウムを含む。

10

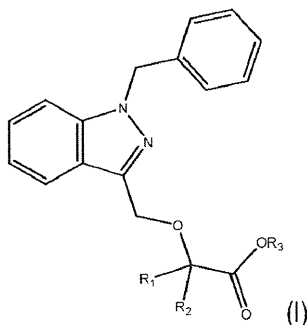
【0174】

様々な態様では、本発明は、薬剤（たとえば「本発明の薬剤」）での治療に応答しない可能性が高い眼障害の対象を同定すること、および／または対象の眼障害が薬剤での治療に応答するかどうかを決定することを提供する。

【0175】

一部の実施形態では、本発明の薬剤は、式 I

【化 3】



20

の化合物またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中、各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式 I の化合物またはその薬学的に許容可能な塩である。

30

【0176】

様々な実施形態では、 R_1 および R_2 は、独立して、水素、メチル、またはエチルである。

【0177】

一部の実施形態では、 R_1 および R_2 が、独立して、メチルまたはエチルである。

【0178】

一部の実施形態では、 R_1 および R_2 がメチルである。

【0179】

一部の実施形態では、 R_3 が水素、メチルまたはエチルである

40

【0180】

一部の実施形態では、 R_3 が水素である。

【0181】

一部の実施形態では、特に、 R_3 が水素であり、式 I の化合物は、薬学的に許容可能な塩の形態である。

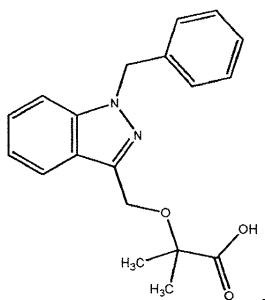
【0182】

一部の実施形態では、 R_1 および R_2 はメチルであり、 R_3 は水素である。このような実施形態では、式 I の化合物は、2 - ((1 - ベンジルインダゾルー 3 - イル) メトキシ) - 2 - メチルプロピオン酸であり、2 - メチルー 2 - [[1 - (フェニルメチル) - 1 H - インダゾルー 3 - イル] メトキシ] プロパン酸としても知られている。このような化

50

化合物は、一般的にビンダリットとして知られており、以下の構造を有する。

【化 4】



10

【0183】

ビンダリットの合成は、本明細書中全体が参照として援用されている米国特許第 4, 999, 367 号に詳細に記載されている。

【0184】

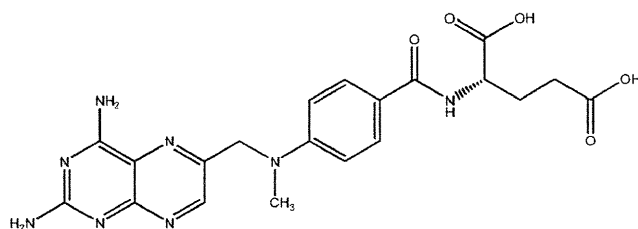
ビンダリットは、理論による拘束を望むものではないが、*in vitro* および *in vivo* で MCP-1 の産生の阻害剤であり、炎症の動物モデルにおけるその有益な効果は、この抗 MCP-1 活性に関連している可能性がある（たとえば Mirollo, et al. Eur Cytokine Netw 2008; 19: 119-122 参照）。またビンダリットは、MCP-2 および MCP-3 の産生を選択的に阻害することが示されている（Mirollo, et al. Eur Cytokine Netw 2008; 19: 119-122 参照）。

20

【0185】

一部の実施形態では、本発明の薬剤は、メトトレキサートまたはその薬学的に許容可能な塩である。メトトレキサートは、以下の構造を有する。

【化 5】



30

【0186】

メトトレキサートはまた、IUPAC 名 (2S)-2-[(4-{[(2,4-ジアミノプテリジン-6-イル)メチル] (メチル)アミノ}ベンゾイル)アミノ]ペンタン二酸; 「MTX」; 「アメトプテリン」によっても知られている。メトトレキサートナトリウムは、米国での処方により入手可能である。メトトレキサートの合成は、米国特許第 4, 080, 325 号に記載されており、この文献全体は本明細書中参照として援用されている。

40

【0187】

さらなる別の実施形態では、本発明の薬剤は、マクロファージの分極化の調節物質である。例示的なマクロファージ分極化の調節物質は、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR- γ) 調節物質を含み、たとえば、アゴニスト、部分的なアゴニスト、およびアンタゴニスト、または組み合わせた PPAR γ / α アゴニストを含む。

【0188】

一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、完全なアゴニストまたは部分的なアゴニストである。一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、チアゾリジンジオン (T

50

ZDまたはグリタゾン)の薬剤分類のメンバーである。非限定的な例として、PPAR γ の調節物質は、ロシグリタゾン(AVANDIA)、ピオグリタゾン(ACTOS)、トログリタゾン(REZULIN)、ネトグリタゾン、リボグリタゾン、シグリタゾン、ロダニンのうちの1つまたは複数であってもよい。一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、イルベサルタンおよびテルミサルタンのうちの1つまたは複数である。一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、非ステロイド状の抗炎症性薬剤(たとえばイブプロフェンなどのNSAID)、およびインドールである。既知の阻害剤として、実験的な薬剤のGW-9662が挙げられる。PPAR γ の調節物質のさらなる例は、WIPOの公報第1999/063983号、第2001/000579号、Nat Rev Immunol. 2011 Oct 25; 11(11): 750-61に記載されており、第2002/068386号の方法を使用して同定した薬剤が記載されており、この参照文献全体は本明細書中参照として援用されている。

10

【0189】

一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、「二重の」、または「均衡した」、または「選別された(pan)」PPAR調節物質である。一部の実施形態では、PPAR γ の調節物質は、2つ以上のPPARのアイソフォームを結合するグリタザール、たとえばムラグリタザール(Pargluya)およびテサグリタザール(Galida)およびアレグリタザールである。

【0190】

別の実施形態では、本発明の薬剤は、Bianchi, et al. (Mar 1995). Molecular Medicine (Cambridge, Mass.) 1(3): 254-266に記載されるようにセマピモド(CNI-1493)であり、この内容全体は本明細書中参照として援用されている。

20

【0191】

さらなる別の実施形態では、本発明の薬剤は遊走阻止因子(MIF)阻害剤である。例示的なMIF阻害剤は、国際特許公開公報第2003/104203号、第2007/070961号、第2009/117706号、および米国特許第7,732,146号および第7,632,505号、および第7,294,753(7294753)号に記載されており、これらの内容全体は本明細書中参照として援用されている。一部の実施形態では、MIF阻害剤は、(S,R)-3-(4-ヒドロキシフェニル)-4,5-ジヒドロ-5-イソキサゾール酢酸メチルエステル(ISO-1)、イソキサゾリン、p425(J. Biol. Chem., 287, 30653-30663)、エポキシアザジラジオン、またはビタミンEである。

30

【0192】

さらなる別の実施形態では、本発明の薬剤は、たとえば米国特許および特許公開公報の第7,799,824号、第8,067,415号、第2007/0197590号、第2006/0069123号、第2006/0058289号、および第2007/0037794号に記載されるケモカイン受容体2(CCR2)阻害剤であり、それらの内容全体は本明細書中に参照として援用されている。一部の実施形態では、CCR2阻害剤は、マラビロク、セニクリビロク(cenicriviroc)、CD192、CCX872、CCX140、2-((イソプロピルアミノカルボニル)アミノ)-N-(2-((シス-2-((4-(メチルチオ)ベンゾイル)アミノ)シクロヘキシル)アミノ)-2-オキソエチル)-5-(トリフルオロメチル)-ベンズアミド、ピクリビロク、SCH351125、TAK779、Teijin、RS-504393、化合物2、化合物14、または化合物19である(Plos ONE 7(3): e32864、この内容は本明細書中参照として援用される)。

40

【0193】

様々な特定の実施形態では、本発明の薬剤は、CKR-2B、2-チオイミダゾール、CCR2アンタゴニスト(CAS 445479-97-0)、およびCCX140のうちの1つまたは複数である。

50

【0194】

さらなる別の実施形態では、本発明の薬剤はクロドロネートである。さらなる別の実施形態では、薬剤は、Barrera et al. Arthritis and Rheumatism, 2000, 43, pp. 1951-1959に記載されるクロドロネートリポソーム製剤であり、この内容全体は本明細書中参照として援用されている。

【0195】

さらなる別の実施形態では、本発明の薬剤は、ガドリニウムのキレートまたは非キレート型であり、たとえば塩化ガドリニウム (GAD) である。

【0196】

様々な実施形態では、本発明の薬剤は抗VEGF剤である。本方法に有用な抗VEGF剤の非限定的な例として、ラニビズマブ、ベバシズマブ、アフリベルセプト、KH902 VEGF受容体-Fc、融合タンパク質、2C3抗体、ORA102、ペガプタニブ、ベバシラニブ (bevasiranib)、SIRNA-027、デクルシン、デクルシノール、ピクロポドフィリン、グググルステロン、PLG101、エイコサノイドLXA4、PTK787、パゾパニブ、アキシチニブ、CDDO-Me、CDDO-Imm、シコニン、 β -、ヒドロキシイソバレリルシコニン、ガングリオシドGM3、DC101抗体、Mab25抗体、Mab73抗体、4A5抗体、4E10抗体、5F12抗体、VA01抗体、BL2抗体、VEGF-関連タンパク質、sFLT01、sFLT02、Peptide B3、TG100801、ソラフェニブ、G6-31抗体、融合抗体、およびVEGFのエピトープに結合する抗体が挙げられる。本方法に有用な抗VEGF剤のさらなる非限定的な例として、ヒトの血管内皮増殖因子-A (VEGF-A)、ヒトの血管内皮増殖因子-B (VEGF-B)、ヒトの血管内皮増殖因子-C (VEGF-C)、ヒトの血管内皮増殖因子-D (VEGF-D) およびヒトの血管内皮増殖因子-E (VEGF-E) のうちの1つまたは複数に特異的に結合する基質、ならびにVEGFのエピトープに結合する抗体が挙げられる。

【0197】

一実施形態では、抗VEGF剤は、抗体のラニビズマブまたはその薬学的に許容可能な塩である。ラニビズマブは、商標LUCENTISの下で市販されている。別の実施形態では、抗VEGF剤は、抗体のベバシズマブまたはその薬学的に許容可能な塩である。ベバシズマブは、商標AVASTINの下で市販されている。別の実施形態では、抗VEGF剤は、アフリベルセプトまたはその薬学的に許容可能な塩である。アフリベルセプトは、商標EYLEAの下で市販されている。一実施形態では、抗VEGF剤は、ペガプタニブまたはその薬学的に許容可能な塩である。ペガプタニブ (Pegaptanib) は、商標MACUGENの下で市販されている。別の実施形態では、抗VEGF剤は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、またはVEGF-EのエピトープなどのVEGFのエピトープに結合する抗体または抗体フラグメントである。一部の実施形態では、VEGFおよびVEGFRの結合性が阻害されるように、VEGFアンタゴニストがVEGFのエピトープに結合する。一実施形態では、エピトープは、エピトープがフォールディングされたVEGF分子の表面に曝露されているように表されたVEGFの3次元構造の構成を含む。一実施形態では、エピトープは、VEGF由来の直線状のアミノ酸配列である。

【0198】

様々な実施形態では、本発明の薬剤は、レニンアンジオテンシン系 (RAS) 阻害剤である。一部の実施形態では、レニンアンジオテンシン系 (RAS) 阻害剤は、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤、アンジオテンシン受容体遮断薬、およびレニン阻害剤のうちの1つまたは複数である。

【0199】

本発明に有用なアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤の非限定的な例として、限定するものではないが、アラセプリル、アラトリオプリル、アルチオプリルカルシウム、

10

20

30

40

50

アンコベニン、ベナゼプリル、ベナゼプリル塩酸塩、ベナゼプリラート、ベナゼプリル (benzazepril)、ベンゾイルカプトプリル、カプトプリル、カプトプリルシステイン、カプトプリルグルタチオン、セラナプリル、セラノプリル (ceranopril)、セロナプリル、シラザプリル、シラザプリラート、コンバスタチン (convertastatin)、デラプリル、デラプリル二酸 (delapril-diacid)、エナラプリル、エナラプリラート、エナルキレン、エナラプリル (enapril)、エビカプトプリル、ホロキシミチン、ホスフェノプリル、ホセノプリル、フォスエノプリル・ナトリウム (fosenopril sodium)、ホシノプリル、ホシノプリルナトリウム、ホシノプリラート、ホシノプリル酸、グリコプリル (glycopril)、ヘモルフィン-4、イダプリル (idapril)、イミダプリル、インドラプリル、インドラプリラート、リベンザプリル、リシノプリル、リシウミンA (lyciumin A)、リシウミンB、ミキサンプリル、モエキシプリル、モエキシプリラート、モベルチプリル、ムラセインA、ムラセインB、ムラセインC、ペントプリル、ペリンドプリル、ペリンドプリラット、ピバロプリル (pivalopril)、ピボプリル (pivopril)、キナプリル、キナプリル塩酸塩、キナプリラート、ラミプリル、ラミプリラート、スピラプリル、スピラプリル塩酸塩、スピラプリラット、スピロプリル (spiropril)、スピラプリル塩酸塩、テモカプリル、テモカプリル塩酸塩、テプロチド、トランドラプリル、トランドラプリラット、ウチバプリル、ザビシプリル、ザビシプリラット、ゾフェノプリル、ゾフェノプリラート、その薬学的に許容可能な塩、およびその混合物が挙げられる。

10

20

【0200】

本発明に有用であるアンジオテンシン受容体遮断薬の非限定的な例として、限定するものではないが、イルベサルタン (米国特許第5, 270, 317号、全体が本明細書中参照として援用されている)、カンデサルタン (米国特許第5, 196, 444号および第5, 705, 517号、全体が本明細書中参照として援用されている)、バルサルタン (米国特許第5, 399, 578号、全体が本明細書中参照として援用されている)、およびロサルタン (米国特許第5, 138, 069号、全体が本明細書中参照として援用されている)) が挙げられる。

【0201】

本発明に有用なレニン阻害剤の非限定的な例として、限定するものではないが、アリスキレン、ジテキレン、エナルキレン、レミキレン、テルラキレン、シプロキレン、およびザンキレン、それらの薬学的に許容可能な塩、ならびにそれらの混合物が挙げられる。

30

【0202】

様々な実施形態では、本発明の薬剤はステロイドである。一部の実施形態では、ステロイドは、以下の例示的な化合物のファミリー：コルチコステロイド、ミネラルコステロイド (mineralicosteroid)、および性ステロイド (たとえば潜在的にアンドロゲン性もしくはエストロゲン性分子、または抗アンドロゲン性 (anti-androgenic) 分子および抗エストロゲン性分子) に属する、または関連する化合物である。これらに含まれる非限定的な例として、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、フルオシノロン、アルドステロン、スピロノラクトン、ダナゾール (またはOPTINAとしても知られている)、ならびにその他がある。

40

【0203】

様々な実施形態では、本発明の薬剤は、オートファジー、マイクロオートファジー、マイトファジー、または他の形態のオートファジーを調節する薬剤である。一部の実施形態では、候補薬剤および/または化合物は、シロリムス、タクロリミス (tacrolimus)、ラパマイシン、エベロリムス、バフィロマイシン、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スパウチン (spautin)-1、メトホルミン、ペリフォシン、レスベラトロール、トリコスタチン、バルプロ酸 (valproic acid)、Z-VAD-FMK、または当該分野で知られているその他、のうちの1つまたは複数である。理論による拘束を望むものではないが、オートファジー、マイクロオートファジー、マイトファ

50

ジー、または他の形態のオートファジーを調節する薬剤は、たとえば限定するものではないが、細胞のオルガネラ、ミトコンドリア、小胞体、脂質、またはその他の細胞内の構成要素の再利用を変更し得る。さらに理論による拘束を望むものではないが、この薬剤は、微小管関連タンパク質1A／1B軽鎖3（LC3）を介して作用してもよく、または作用しなくてもよい。

【0204】

本発明のさらなる薬剤として、たとえば、抗D因子抗体（たとえばランパリズマブ（Genentech））、抗βアミロイド（抗Aβ）抗体（たとえばGSK933776（GSK））、コルチコステロイド（たとえばフルオシノロンアセトニド）、MC-1101（MacuCLEAR）、CD34+ 幹細胞療法、抗VEGF抗体（たとえばラニビズマブ）、ブリモニジン（アルファガン）、抗補体C5抗体（たとえばLFG316（Novartis））、ドキシサイクリン（ORACEA）、エミクススタ塩酸塩、シロリムス（RAPAMUNE）、およびグラチラマー酢酸塩（COPAXONE）のうちの1つまたは複数が挙げられる。一部の実施形態では、ビンダリットは、非滲出型AMDおよび／またはRPDの予防の治療においてこれら薬剤を用いて付属的に、または新たに付属的に使用される。

10

【0205】

非滲出型AMDおよび／またはRPDの方法の文脈を含む、本発明のさらなる薬剤は、Arq. Bras. Oftalmol. vol. 75 no. 1 Jan. / Feb. 2012で見いだされており、この内容全体は本明細書中参照として援用されている。

20

【0206】

蛍光性化合物

一部の実施形態では、蛍光性化合物は、様々な蛍光波長を用いたイメージングに適している。一部の実施形態では、これらの波長は、可視光から赤外線、たとえば390nm～1mmの範囲にあり、たとえば青色光、白色光、および近赤外線を含む。一部の実施形態では、色素は近赤外色素である。一部の実施形態では、色素はICGである。

【0207】

一部の実施形態では、蛍光性化合物は、様々な蛍光波長を用いたイメージングに適している。一部の実施形態では、これらの波長は、可視光から赤外線、たとえば約390nm～約1mmの範囲にあり、たとえば青色光、白色光、および近赤外線を含む。一部の実施形態では、この吸収は、約390nm～約1mmである。一部の実施形態では、発光は約390nm～約1mmである。

30

【0208】

一部の実施形態では、蛍光性化合物は、約600nm～約900nmの波長を吸収し、かつ／または約750nm～約950nmの波長の光を発光する。

【0209】

一部の実施形態では、色素は近赤外色素である。一部の実施形態では、色素はICGである。一部の実施形態では、ICG励起／発光フィルターは、795nm（励起）／810nm（発光）である。

40

【0210】

一部の実施形態では、蛍光性化合物、たとえば色素（ICGを含む）の用量は、蛍光性化合物の有効量である。様々な実施形態では、ICGの用量は、約0.1～約10mg/kg（動物）である。一部の実施形態では、この用量は、約0.1、または約0.3、または約0.5、または約1.0、または約2.0、または約3.0、または約4.0、または約5.0、または約6.0、または約7.0、または約8.0、または約9.0、または約10.0mg/kg（動物）である。

【0211】

様々な実施形態では、蛍光性化合物またはその代謝物は、RPE細胞および／または免疫細胞で起こる蛍光を引き起こす。

50

【0212】

他の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、(i) 追加的な量の蛍光性化合物を動物に投与すること、または(ii) 第2の蛍光性化合物を動物に投与することを含まない。

【0213】

毒素

一部の実施形態では、限定するものではないが、RPEまたは網膜を含む眼組織に影響を与える毒素が提供される。

【0214】

一部の実施形態では、毒素は、アルミニウム、アミノフェノキシアルカン（非限定的な例として、限定するものではないが、ラットに対する1、4、-ビス（4-アミノフェノキシ）-2-フェニルベンゼンを含む）、陽イオン性両染色性薬剤／三環系抗うつ薬（非限定的な例として、限定するものではないが、アミオダロン、クロロアミトリプチリン（chloroamitriptyline）、クロルフェンテルミン、クロミプラミン、イミプラミン、イプリンドール、様々なアミノグリコシド、および他の陽イオン性両染色性化合物が挙げられる）、デスフェリオキサミン、ジー（p-トリフルオロメチルフェニル）イソプロピルアミンハイドロクロライド、フルオライド（たとえばフッ化ナトリウム）、ヨウ素酸塩（非限定的な例として、限定するものではないが、ヨウ素酸ナトリウムまたはヨウ素酸カリウムが挙げられる）、ヨード酢酸、鉛、メタノールおよびギ酸、4, 4'-メチレンジアニリン、N-メチルN-ニトロソウレア、ナフタレン、ナフトール（naphthol）、ニトロアニリン（N-3-ピリジルメチル-N'-p-ニトロフェニルウレア／ニトロアニリン／ピリミニル）、有機リン酸塩（非限定的な例として、限定するものではないが、エチルチオメトン、フェンチオン、およびフェニトロチオンが挙げられる）、シュウ酸塩（非限定的な例として、限定するものではないがシュウ酸ジブチルが挙げられる）、フェノチアジン（非限定的な例として、限定するものではないが、ピペリジルクロロフェノチアジン、チオリダジン、およびクロルプロマジンが挙げられる）、キノリン（非限定的な例として、限定するものではないが、クロロキンおよびヒドロキシクロロキンが挙げられる）、ストレプトゾトシン、タウリン欠乏、ウレタン、金属キレート剤により引き起こされる亜鉛欠乏、ならびにそれらの誘導体および変異体のうちの1つまたは複数である。

【0215】

一部の実施形態では、毒素はヨウ素酸塩である。一部の実施形態では、毒素はヨウ素酸ナトリウムまたはヨウ素酸カリウムである。

【0216】

一部の実施形態では、毒素は眼組織の萎縮症を誘導する。様々な実施形態では、この萎縮症はネクロシスおよび／またはアポトーシスを含む。様々な実施形態では、ネクロシスおよび／またはアポトーシスを含む萎縮症は、RPE細胞の萎縮症である。一部の実施形態では、毒素はオートファジーを低減または修正する。一部の実施形態では、毒素は地図状萎縮および／または地図状萎縮の拡大を誘導する。一部の実施形態では、毒素は、上述の効果のうちの1つまたは複数を誘導する。

【0217】

一部の実施形態では、毒素は、1回、または2回、または3回投与される。一部の実施形態では、毒素は、1回、または2回、または3回、または4回、または5回投与される。一部の実施形態では、第2、または第3、または第4、または第5の投与は、第1の投与から約1日以内、または1週間以内、または1か月以内である。

【0218】

一部の実施形態では、投与された毒素は、本明細書中に記載の薬剤のうちの1つまたは複数であってもよい。様々な実施形態では、第2、または第3、または第4、または第5のパルスは、本明細書中に記載されており、かつ当該分野で知られている、オートファジー、細胞の生存、細胞死、増殖、再生などの調節物質である。

【0219】

別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、(i) 追加的な量の第1の毒素を動物に投与すること、および／または(ii) 第2の毒素を動物に投与することを含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、眼組織の萎縮症のパッチ、または組織喪失パッチの形成、増殖、または拡大の比率の低下を観察することをさらに含む。

【0220】

様々な実施形態では、毒素の用量は、当業者に知られている。たとえば、適切な用量は、約0.1mg/kg～約100mg/kg(対象の体重)の範囲、たとえば約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.3mg/kg、約0.4mg/kg、約0.5mg/kg、約0.6mg/kg、約0.7mg/kg、約0.8mg/kg、約0.9mg/kg、約1mg/kg、約1.1mg/kg、約1.2mg/kg、約1.3mg/kg、約1.4mg/kg、約1.5mg/kg、約1.6mg/kg、約1.7mg/kg、約1.8mg/kg、約1.9mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約7mg/kg、約8mg/kg、約9mg/kg、約10mg/kg、約11mg/kg、約12mg/kg、約13mg/kg、約14mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約55mg/kg、約60mg/kg、約65mg/kg、約70mg/kg、約75mg/kg、約80mg/kg、約85mg/kg、約90mg/kg、約95mg/kg、または約100mg/kg体重であってもよく、すべての値およびその間の範囲を含んでもよい。

【0221】

一実施形態では、毒素はNaIO₃であり、この用量は約50mg/kg体重である。一実施形態では、毒素はNaIO₃であり、この用量は約45mg/kg体重である。一実施形態では、毒素はNaIO₃であり、この用量は約30mg/kg体重である。

【0222】

薬学的に許容可能な塩および賦形剤

本明細書中に記載されるいずれかの薬剤は、無機塩基または有機塩基と反応できる無機酸または有機酸またはカルボキシル基と反応し、薬学的に許容可能な塩を形成することができる、十分に塩基性の官能基を有することができる。薬学的に許容可能な酸付加塩は、薬学的に許容可能な酸から形成されており、当該分野でよく知られている。このような塩は、Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) and The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002に列挙されている薬学的に許容可能な塩を含み、これら文献全体は本明細書中参照として援用されている。

【0223】

薬学的に許容可能な塩として、非限定的な例として、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩(gentisinate)、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカル酸塩(glucarionate)、サッカレート、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸塩、パモ酸塩、フェニル酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、アクリル酸塩、クロロ安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、o-アセトキシ安息香酸塩、ナフタレン-2-ベンゾート、イソ酪酸塩、フェニル酪酸塩、α-ヒドロキシ酪酸塩、ブチン-1,4-ジカルボ

ン酸塩、ヘキシン-1、4-ジカルボン酸塩、カプリン酸塩、カプリル酸塩、桂皮酸塩、グリコール酸塩 (glycolate)、ヘプタン酸塩、馬尿酸塩、リンゴ酸塩、ヒドロキシマレイン酸塩、マロン酸塩、マンデル酸塩、メシル酸塩、ニコチン酸塩、フタル酸塩、テレフタル酸塩 (terephthalate)、プロピオール酸塩、プロピオン酸塩、フェニルプロピオン酸塩、セバシン酸塩、スベリン酸塩、p-プロモベンゼンスルホン酸塩、クロロベンゼンスルホン酸塩、エチルスルホン酸塩、2-ヒドロキシエチルスルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、ナフタレン-1, 5-スルホン酸塩、キシレンスルホナート、および酒石酸塩の塩が挙げられる。

【0224】

また、用語「薬学的に許容可能な塩」は、カルボン酸官能基などの酸性官能基、および塩基を有する本発明の化合物の塩を指す。適切な塩基として、限定するものではないが、ナトリウム、カリウム、およびリチウムなどのアルカリ金属の水酸化物；カルシウムおよびマグネシウムなどのアルカリ土類金属の水酸化物；アルミニウムおよび亜鉛などの他の金属の水酸化物；アンモニア；ならびに非置換型またはヒドロキシ置換型のモノ、ジ、またはトリアルキルアミン、ジシクロヘキシルアミンなどの有機アミン、；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン；モノ-、ビス-、トリス-（2-ヒドロキシエチル）アミン、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス（ヒドロキシメチル）メチルアミンなどのモノ-、ビス-、トリス（2-OH低級アルキルアミン）、またはN，N-ジメチルN-（2-ヒドロキシエチル）アミンまたはトリ-（2-ヒドロキシエチル）アミンなどのN，N-ジ-低級アルキル-N-（ヒドロキシル-低級アルキル）-アミン；N-メチルD-グルカミン；ならびにアルギニン、リジンなどのアミノ酸が挙げられる。

【0225】

一部の実施形態では、本発明の薬剤は、この形態または薬学的に許容可能な塩の形態にある。一部の実施形態では、薬学的に許容可能な塩はナトリウム塩である。一部の実施形態では、特に、式Iの化合物のR₃は水素であり、式Iの化合物は薬学的に許容可能な塩の形態である。一部の実施形態では、式Iの化合物は、ビンダリットの薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態では、メトトレキサートは、この形態または薬学的に許容可能な塩である。一部の実施形態では、メトトレキサートの薬学的に許容可能な塩は、メト

【0226】

さらに、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、薬学的に許容可能な担体またはビヒクルを含む組成物の成分として対象に投与することができる。このような組成物は、任意に、適切な投与形態を提供するために適切な量の薬学的に許容可能な賦形剤を含むことができる。

【0227】

薬学的な賦形剤は、水などの液体、およびピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物、植物油、または合成由来の油を含む油とすることができる。薬学的な賦形剤は、生理食塩水、アカシアガム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイドシリカ、尿素などとすることができる。さらに、補助剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤、および着色剤を使用することができる。一実施形態では、薬学的に許容可能な賦形剤は、対象に投与される際は無菌性である。本明細書中に記載のいずれかの薬剤が静脈内投与される場合、水は有用な賦形剤である。生理食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体の賦形剤、特に注射可能な溶液用の液体賦形剤として使用することができる。また、適切な薬学的な賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、コムギ、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアラート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。本明細書中に記載の薬剤は、必要に応じて、少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を

含むこともできる。

【0228】

製剤、投与、および用量

本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、液剤、懸濁剤、乳剤、眼内注射、硝子体内注射、局所目薬、結膜下注射、テノン嚢下注射、経強膜製剤、錠剤、丸剤、ペレット、カプセル剤、液体を含むカプセル剤、散剤、徐放製剤、坐剤、乳剤、エアゾール剤、噴霧剤、懸濁剤の形態、または使用に適した他のいずれかの形態をとることができる。一実施形態では、組成物は、硝子体内注射（たとえばILUVIENまたは類似の形態を参照）、または移植（たとえばRETISETまたは類似の形態を参照）に適している。一実施形態では、組成物はカプセル剤（たとえば米国特許第5,698,155号参照）の形態である。適切な薬学的な他の賦形剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed., 1995)に記載されており、これは本明細書中参照として援用されている。

10

【0229】

一実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、たとえば硝子体内または眼内投与、局所および／または静脈内投与を含む、眼の投与のために製剤化されている。概して、投与用の組成物は、無菌性、等張性の水性バッファーを含む。必要に応じて、組成物は、可溶化剤をも含む。また薬剤は、当該分野で知られている適切なビヒクルまたは送達デバイスを用いて送達できる。本明細書中で要点を述べた併用療法は、単一の送達ビヒクルまたは送達デバイスで同時に送達できる。投与用の組成物は、任意に、注射部位での疼痛を弱めるために、リグノカインなどの局所麻酔剤を含むことができる。

20

【0230】

一実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、眼内投与に適合した組成物として、定例的な手段に従い製剤化されている。

【0231】

一実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、ヒトへの経口投与に適合した組成物として、定例的な手段に従い製剤化されている。経口送達用の組成物は、たとえば錠剤、甘味入り錠剤、水性または油性懸濁剤、顆粒剤、散剤、乳剤、カプセル剤、シロップ、またはエリキシル剤の形態とすることができる。経口投与した組成物は、1つまたは複数の薬剤、たとえばフルクトース、アスパルテーム、またはサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、ウインターグリーンまたはサクランボの油などの芳香剤；着色剤；および保存剤を含むことにより、薬学的に美味な製剤を提供することができる。さらに、錠剤または丸剤の形態の場合、組成物は、胃腸管での分解および吸収を遅らせることにより、長い期間持続する作用を提供するために、コーティングすることができる。浸透圧的に活性に駆動する本明細書中に記載のいずれかの薬剤を囲む選択的に透過性の膜もまた、経口投与する組成物に適している。これら後者の場合では、カプセル剤を囲む環境からの流体は、駆動する化合物により吸収され、これにより、駆動化合物は膨張して、開口部を介して薬剤または薬剤組成物を移動させる。これらの送達プラットフォームは、即時型の放出製剤のスパイク型プロファイルとは反対に本質的にゼロ次のプロファイルを提供することができる。モノステアリン酸グリセロールまたはステアリン酸グリセロールなどの徐放物質もまた有用とすることができる。経口組成物は、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な賦形剤を含むことができる。一実施形態では、賦形剤は、薬物学的なグレードである。

30

40

【0232】

成分は、たとえば、アンプル、プレフィルドシリンジ、または活性成分の量を示す小包などの密閉された容器内の、あらかじめ混合した溶液、凍結乾燥した粉体、または水を含まない濃縮物として、単位剤形中に、別々またはともに混合して供給されてもよい。本明細書中に記載のいずれかの薬剤が、硝子体内または眼内の送達により投与される場合、薬

50

剤は、たとえばプレフィルドシリンジまたは注射器、または適切なシリンジに廃棄するためのアンプルに、分注することができる。本明細書中に記載のいずれかの薬剤が吸入により投与される場合、たとえば、無菌性医薬グレードの水または生理食塩水を含む吸入ビンに分注することができる。本明細書中に記載のいずれかの薬剤が注射により投与される場合、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルが、成分が投与前に混合できるように提供することができる。

【0233】

本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、制御された放出または徐放の手段により、または当業者によく知られている送達デバイスにより、投与することができる。例として、限定するものではないが、米国特許第3,845,770号；第3,916,899号；第3,536,809号；第3,598,123号；第4,008,719号；第5,674,533号；第5,059,595号；第5,591,767号；第5,120,548号；第5,073,543号；第5,639,476号；第5,354,556号；および第5,733,556号に記載されるものを含み、これらそれぞれは、参照として本明細書中に全体を援用されている。このような剤形は、変動する特性における所望の放出プロファイルを提供するために、たとえば、ヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、ゲル、透過性膜、浸透系、多層コーティング、マイクロ粒子、ナノ粒子、リポソーム、マイクロスフィア、またはそれらの組み合わせを使用して、1つまたは複数の活性成分の制御放出または徐放に有用とすることができる。本明細書中に記載されるものを含む、当業者に知られている適切な制御放出の製剤または徐放製剤は、本明細書中に記載の薬剤の活性成分とともに使用するために、容易に選択することができる。よって本発明は、限定するものではないが、制御放出または徐放に適合している錠剤、カプセル剤、ジェルキャップ、およびカプレットなどの経口投与に適した単回単位剤形を提供する。

【0234】

活性成分の制御放出または徐放は、限定するものではないが、pHの変化、温度の変化、適切な光波長による刺激、酵素の濃度もしくは利用可能性、水の濃度もしくは利用可能性、または他の生理学的な条件もしくは化合物を含む、様々な条件により刺激することができる。

【0235】

組成物は、それぞれ、従来の混合、顆粒化、コーティング、または重合方法により、調製することができ、本組成物は、一実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬剤を、約0.1～約99容量または重量%、別の実施形態では、約1～約70容量または重量%含むことができる。

【0236】

別の実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、別の薬剤と同時に投与する場合に相乗的に作用し、このような薬剤を単剤療法として使用する場合の一般的に使用される用量よりも低い用量で投与されている。

【0237】

たとえば、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の用量、および投与スケジュールは、限定するものではないが、治療される眼障害、対象の一般的な健康状態、および投与する実務者の裁量を含む様々なパラメータに依存することができる。本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、その必要がある対象への追加的な治療剤の投与の前（たとえば5分前、15分前、30分前、45分前、1時間前、2時間前、4時間前、6時間前、12時間前、24時間前、48時間前、72時間前、96時間前、1週間前、2週間前、3週間前、4週間前、5週間前、6週間前、8週間前、または12週間前）、当該投与と同時、または当該投与の後（たとえば5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後、または12週間後）に投与することができる。様々な実施形態では、本明細書中に記載のいずれかの薬

剤は、1分空けて、10分空けて、30分空けて、1時間未満空けて、1時間空けて、1～2時間空けて、2～3時間空けて、3～4時間空けて、4～5時間空けて、5～6時間空けて、6～7時間空けて、7～8時間空けて、8～9時間空けて、9～10時間空けて、10～11時間空けて、11～12時間空けて、24時間以下空けて、または48時間以下空けて、投与する。一実施形態では、式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩を含む本発明の薬剤、および1つまたは複数の追加的な治療剤は、3時間以内に投与する。別の実施形態では、式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩を含む本発明の薬剤、および1つまたは複数の追加的な治療剤は、1分～24時間空けて投与する。

【0238】

10

単回用量を生成するために担体物質と混合した本明細書中に記載のいずれかの薬剤の量は、治療される対象、および特定の投与形式に応じて変動し得る。in vitroまたはin vivoでのアッセイは、最適な投与範囲の同定を支援するために使用することができる。

【0239】

一般的に、有用な用量は、当業者に知られている。たとえば用量は、文献Physicians' Desk Reference, 66th Edition, PDR Network; 2012 Edition (December 27, 2011)を用いて決定されており、この内容全体は、本明細書中参照として援用されている。

【0240】

20

本明細書中に記載のいずれかの薬剤の用量は、病態の重症度、病態は治療または予防されるべきかどうか、ならびに治療される対象の年齢、体重、および健康状態を含むいくつかの要因に依存する場合がある。さらに、特定の対象についての薬理ゲノミクス（治療の薬物動態学的、薬力学的、または有効なプロファイルに及ぼす遺伝子型の作用）の情報は、使用する用量に影響する場合もある。さらに、正確な個々の用量は、投与される薬剤の特定の組み合わせ、投与時間、投与経路、製剤の性質、排出速度、治療される特定の眼障害、障害の重症度、および障害の解剖学的な位置を含む様々な要因に応じて、いくらか調節することができる。用量の一部の変動は、予測することができる。

【0241】

一部の実施形態では、投与は、経口投与、または血管内投与、または眼内投与、または眼球周囲投与、または眼の表面への投与により、効果を発揮する。

30

【0242】

ヒトの眼に投与する場合、たとえば硝子体内に投与する場合、たとえば式I、メトトレキサート、またはその薬学的に許容可能な塩、および／または追加的な治療剤を含む、本発明の薬剤の用量は、通常、投与あたり0.003mg～5.0mg/眼、または投与あたり0.03mg～3.0mg/眼、または投与あたり0.1mg～1.0mg/眼である。一実施形態では、用量は、0.03mg、0.3mg、1.5mg、または3.0mg/眼である。別の実施形態では、用量は0.5mg/眼である。用量は、眼あたり0.01mL～0.2mLの範囲で投与され、または眼あたり0.03mL～0.15mLの範囲で投与され、または眼あたり0.05mL～0.10mLの範囲で投与されることが

40

【0243】

一般的に、哺乳類に経口投与する場合、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の用量は、0.001mg/kg/日～100mg/kg/日、0.01mg/kg/日～50mg/kg/日、または0.1mg/kg/日～10mg/kg/日であってよい。ヒトに経口投与する場合、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の用量は、通常、0.001mg～1000mg/日、1mg～600mg/日、または5mg～30mg/日である。一実施形態では、経口用量は、600mg/日である。一実施形態では、経口用量は、2回の300mg用量/日である。別の実施形態では、経口用量は、7.5mg/週～15mg

50

／週である。

【0244】

非経口注射により本明細書中に記載のいずれかの薬剤の投与では、用量は、通常、0.1 mg～250 mg／日、1 mg～20 mg／日、または3 mg～5 mg／日である。注射は、1日に最大4回行われてもよい。一般的に、経口投与または非経口投与される場合、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の用量は、通常、0.1 mg～1500 mg／日、または0.5 mg～10 mg／日、または0.5 mg～5 mg／日である。最大3000 mg／日の用量を投与することができる。

【0245】

一部の実施形態では、眼に本明細書中に記載のいずれかの薬剤を1つまたは複数投与することが望ましくてもよい。投与は、非限定的な例として、眼内、硝子体内、局所（限定するものではないが点眼薬および軟膏を含む）、結膜下、テノン嚢下、経強膜、脈絡膜上、網膜下、であってもよく、かつイオン導入を介してもよい。

10

【0246】

たとえば、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、鼻腔内投与、硬膜外投与、経口投与、舌下投与、鼻腔内投与、脳内投与、腔内投与、経皮的投与、直腸投与、吸入による投与、局所投与、特に耳、鼻、眼、または皮膚への投与などの他の投与経路もまた、使用することができる。

【0247】

投与経路は、実務者の裁量に任せることができ、健康状態の部位に部分的に依存する。多くの場合、投与は、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の血流内への放出をもたらす。

20

【0248】

本明細書中に記載のいずれかの薬剤は経口投与することができる。またこのような薬剤は、たとえば静脈内吸入、またはボーラス注射により、上皮または皮膚粘膜の裏層（たとえば口腔粘膜、直腸および腸の粘膜など）を介した吸収によるといった、他のいずれかの従来の経路により投与することができ、かつ、別の生物学的に活性の薬剤とともに投与することができる。投与は全身性または局所性とすることができる。様々な送達システムは既知であり、たとえばリポソーム、マイクロ粒子、マクロカプセル、カプセルなどへの封入があり、投与に使用することができる。

【0249】

30

さらなる投与方法として、限定するものではないが、眼内投与、硝子体内投与、局所的な眼投与（限定するものではないが、点眼薬、軟膏、およびインサートを含む）、結膜下投与、テノン嚢下投与、脈絡膜上投与、経強膜投与、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、鼻腔内投与、硬膜外投与、経口投与、舌下投与、鼻腔内投与、脳内投与、腔内投与、経皮投与、直腸投与、吸入による投与または局所投与、特に、耳、鼻、眼、または皮膚への投与が挙げられる。一部の実施形態では、1超の、本明細書中に記載のいずれかの薬剤を眼に投与する。投与は、非限定的な例として、眼内、硝子体内、局所（限定するものではないが、点眼薬および軟膏を含む）、結膜下投与、テノン嚢下投与、経強膜投与、およびイオン導入であってもよい。投与形式は、実務者の裁量にゆだねることができ、健康状態の部位に部分的に依存する。多くの例では、投与により、血流への放出がもたらされる。

40

【0250】

特定の実施形態では、治療の必要のある領域に局所的に投与することが望ましい場合がある。

【0251】

別の実施形態では、ベシクル、特にリポソームにおいて送達を行うことができる（Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York

50

, pp. 353-365 (1989) 参照)。さらなる別の実施形態では、送達
制御放出システムにおいて行うことができる。一実施形態では、遅行放出型の眼内デバイ
スを使用してもよい。一部の実施形態では、このデバイスは、局所的に送達された浸食し
得るまたは非浸食性の液体、ゲル、ポリマーなどからなる。

【0252】

別の実施形態では、ポリマー物質を使用することができる (Medical Appl
ications of Controlled Release, Langer a
nd Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, F
lorida (1974); Controlled Drug Bioavaila
bility, Drug Product Design and Performa
nce, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New
York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J.
Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:
61; see also Levy et al., 1985, Science
228:190; During et al., 1989, Ann. Neuro
l. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neuro
surg. 71:105 参照)。別の実施形態では、制御放出システムは、治療される
標的領域、たとえば網膜の近位に配置することにより、全身性の用量の一部のみが必要と
することができる。(たとえば Goodson, in Medical Applic
ations of Controlled Release, supra, vol
. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。Langer, 1990,
Science 249:1527-1533) による概要で論述された他の制御放出
システムを使用してもよい。

【0253】

本明細書中に記載のいずれかの薬剤の投与は、独立して、1日に1~4回、または1ケ
月あたり1~4回、または1年に1~6回、または2年に1度、3年に1度、4年に1度
、または5年に1度とすることができる。投与は、1日、または1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月
、6ヶ月、1年、2年、3年の間とすることができ、さらには対象が活着している間持続し
てもよい。慢性的な長期間の投与は、多くの場合で表記されている。用量は、単回投与と
して投与してもよく、または複数回の用量に分割してもよい。数か月または数年、または
それ以上長い投与期間が必要とされる場合があるが、一般的に、所望の用量は、長期間、
通常少なくとも数週間または数か月間にわたる長期間の設定された間隔で投与されるべき
である。

【0254】

本明細書中のいずれかの薬剤を利用する投与レジメンは、対象の種類、種族、年齢、体
重、性別、および健康状態、治療される病態の重症度、投与経路、対象の腎機能または肝
機能、個体の薬理ゲノミクスの性質、ならびに使用される本発明の特定の化合物を含む様
々な要因にしたがい、選択することができる。本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、単
回一日用量で投与することができ、または総一日用量は、1日2回、3回、または4回の
分割した用量で投与することができる。さらに、本明細書中に記載のいずれかの薬剤は、
投与レジメンにわたり断続的ではなく、むしろ連続的に投与することができる。

【0255】

治療方法

様々な態様では、本発明は、本明細書中に記載の眼障害を治療または予防する方法を提
供する。これらの態様では、「本発明の薬剤」は、単剤療法および併用療法(たとえば追
加的な治療剤)の両方に有用な化合物を含む。

【0256】

様々な態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療
に有効な薬剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含み、当該薬剤が、ピンダ
リットなどの式 I の化合物を含む、免疫調節剤(非限定的な例として、MCP-1 および

／またはMCP-2および／またはMCP-3調節剤)、PPAR γ モジュレータ、遊走阻止因子(MIF)阻害剤、およびケモカイン受容体2(CCR2)阻害剤である。一部の実施形態では、免疫調節剤はマクロファージを標的とする。一部の実施形態では、免疫調節剤は、M1/M2の分極化を調節する。一部の実施形態では、免疫調節剤は、対象のM1マクロファージ活性を調節(たとえば低減)し、かつ／または対象のM2マクロファージの活性を調節(たとえば増大または維持)する。一部の態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、眼障害の治療に有効な薬剤の有効量を、その必要のある対象に投与することを含み、対象が、CD64、IDO、SOCS1、CXCL10 Marco, Soc s3、Nos2、Il12b、Ptgs2(Cox2)、Il23 α (Il23p19)、およびIdo1のうちの1つまたは複数の発現または活性の増加または減少を有する、方法に関する。

10

【0257】

一部の実施形態では、対象は、MRC1、TGM2、CD23、CCL22 Relm a(Fizz1、Retnla)、Soc s2、Irf4、Chia(Amcas e)、Chi3l1(Gp39、Ykl40)、Chi3l2(Ykl39)、Chi3l3(Ym1)、Cxc l13、Ccl12、Ccl24、およびKlf4のうちの1つまたは複数の発現または活性の増加または減少を有する。

【0258】

一部の実施形態では、対象は、Ccl5、CD163、Cx3Cr1、Faslg、Gfap、Cs f2、Icam1、Ifng、Il10、Il12b、Il13、Il17a、Il18、Il1b、Il22、Il4、Il6、Klf4、Mrc1、Myd88、Nlrp3、Nos2、Ppar γ 、Tgfb1、Tlr4、Tnf、Vcam1、Ccl2、Ccl5、Ccl7、Ccr2、Soc s1、Soc s3、Stat1、Stat3、およびStat6のうちの1つまたは複数の発現または活性の増加または減少を有する。一部の実施形態では、対象は、Myd88、Klf4、Nlrp3、Ccl2、Ccl5、Ccl7、Soc s1、Soc s3、Stat1、Stat3、およびStat6のうちの1つまたは複数の発現または活性の増加または減少を有する。

20

【0259】

一部の実施形態では、ビンダリットは、直接的または間接的に、以下の、Ccl5、CD163、Cx3Cr1、Faslg、Gfap、Cs f2、Icam1、Ifng、Il10、Il12b、Il13、Il17a、Il18、Il1b、Il22、Il4、Il6、Klf4、Mrc1、Myd88、Nlrp3、Nos2、Ppar γ 、Tgfb1、Tlr4、Tnf、Vcam1、Ccl2、Ccl5、Ccl7、Ccr2、Soc s1、Soc s3、Stat1、Stat3、およびStat6のうちのいずれかの特異的な発現を、任意に、マクロファージまたはRPEにおいて直接的にもたらす。一部の実施形態では、ビンダリットはNF κ Bを調節する。

30

【0260】

一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-1調節剤の有効量をその必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、MCP-1調節剤は、MCP遺伝子プロモーター／エンハンサー領域の遠位および／または近位の制御領域を標的とする。一部の実施形態では、MCP-1調節剤は、MCP-1プロモーターの近位制御領域を標的とする。一部の実施形態では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-2および／またはMCP-3調節剤の有効量をその必要のある対象に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、MCP-2および／またはMCP-3調節剤は、任意に、MCP-2および／またはMCP-3遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域の遠位および／または近位制御領域を標的とする。一部の実施形態では、MCP-2および／またはMCP-3調節剤は、任意に、MCP-2および／またはMCP-3プロモーターの近位制御領域を標的とする。一部の実施形態では、MCP-1および／またはMCP-2および／またはMCP-3調節剤は、ビンダリットなどの式Iの化合物である。

40

50

【0261】

一態様では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-1調節剤の有効量をその必要のある対象に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、MCP-1調節剤は、MCP-1プロモーターの近位制御領域を標的とする。一部の実施形態では、本発明は、眼障害を治療または予防する方法であって、MCP-2および／またはMCP-3調節剤の有効量をその必要のある対象に投与することを含み、MCP-2および／またはMCP-3調節剤が、MCP-2および／またはMCP-3プロモーターの近位制御領域を任意に標的とする、方法を提供する。

【0262】

一部の実施形態では、対象は、抗D因子抗体（たとえばランパリズマブ（Genentech））、抗βアミロイド（抗Aβ）抗体（たとえばGSK933776（GSK））、コルチコステロイド（たとえばフルオシノロンアセトニド）、MC-1101（MacuCLEAR）、CD34+ 幹細胞療法、抗VEGF抗体（たとえばラニズマブ）、ブリモニジン（アルファガン）、抗補体C5抗体（たとえばLFG316（Novartis））、ドキシサイクリン（ORACEA）、エミクススタト塩酸塩、シロリムス（RAPAMUNE）、およびグラチラマー酢酸塩（COPAXONE）のうちの1つまたは複数での治療を受けていない、またはこれら1つもしくは複数に非応答性である。一部の実施形態では、対象は、直径約125μm超の少なくとも1つのドルーゼンの存在により確認されたAMDのエビデンスを有する。一部の実施形態では、対象は、以前のまたは活動性の脈絡膜新生血管（CNV）のエビデンスを有さない。一部の実施形態では、対象は、1つまたは複数の眼に総面積約2～約2mm²の、1つまたは複数の良好に画定されたVA病変を有する。一部の実施形態では、対象は、約35文字超の最高矯正視力スコア、または約20/200以上に相当するスネレン視力を有する。一部の実施形態では、対象は、数個の小さなドルーゼンまたは数個の中程度の大きさのドルーゼンにより証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。一部の実施形態では、対象は、多数の中程度の大きさのドルーゼンまたは1つもしくは複数の大きなドルーゼンにより証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。一部の実施形態では、対象は、数個の大きなドルーゼンおよび／または黄斑の細胞の広範囲の崩壊により証明された初期の非滲出型黄斑変性を有する。

【0263】

本明細書中に開示される治療のいずれかの評価は、光学イメージングを含むことができ、非限定的な例としてcSLO、FAF、OCT（断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む）、SD-OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、または他のイメージング方法を含み、これは、他の蛍光波長（たとえば青色～赤外線範囲の波長、たとえば390nm～1mm、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。

【0264】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の偽ドルーゼンの量を減少させることと、および／または対象の眼の中心窩領域、周中心窩領域、近傍中心窩領域、および中心窩外領域のいずれか1つにおける偽ドルーゼンの量を減少させることを含む。他の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、末期の疾患の進行速度を低下させることを含み、ここでの末期疾患は、脈絡膜新生血管または地図状萎縮のいずれか1つである。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、地図状萎縮の拡大速度を低下させることを含む。

【0265】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の治療方法は、非滲出型AMDおよび／またはRPDを治療、予防、または発病の比率を減少させることを含む。

【0266】

化合物の評価方法

一部の態様では、本発明は、候補化合物が眼障害の治療に有用であるかどうかを同定する方法であって、（a）眼に（i）上記動物の眼障害の存在を表すために有効な量の蛍光

性化合物、および（i i）眼組織の萎縮症を誘導させるために有効な量の毒素を含む動物に、試験化合物の有効量を投与することと、（b）上記蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に上記眼を曝露させることと、（c）上記眼の蛍光パターンを、上記蛍光性化合物および毒素を含むが試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、（d）ステップ（c）の結果が、試験化合物が眼障害の治療に有用であることを表す場合、上記試験化合物を候補化合物として選択することを含む、方法を提供する。一部の実施形態では、ステップ（b）は、蛍光性化合物の投与、またはその後の蛍光性化合物の投与と同時に行うかどうかにかかわらず、蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に眼を曝露させることを含む。一態様では、本発明は、眼障害の治療に有効な薬剤を作製する方法であって、（a）眼に（1）上記動物の眼障害の存在を表すために有効な量の蛍光性化合物、および（2）眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素を含む動物に、（i）試験化合物の有効量を投与することと、

（i i）蛍光性化合物を蛍光させるために有効な波長および輝度を有する光に上記眼を曝露させることと、（i i i）上記眼の蛍光パターンを、上記蛍光性化合物および毒素を含むが、試験化合物を含まない動物の眼の蛍光パターンと比較することと、（i v）ステップ（i i i）の比較の結果が、試験化合物の眼障害の治療に有用である場合、上記試験化合物を候補化合物として選択することにより、薬剤を同定することと、（b）眼に投与するために、同定した薬剤を製剤化することを含む、方法を提供する。一部の態様では、眼障害を治療または予防する方法であって、上述の方法を使用して作製した眼障害の治療に有効な薬剤のいずれか1つである薬剤の有効量と、薬学的に許容可能な担体または賦形剤とを含む医薬組成物を、その必要がある対象に投与することを含む、方法を提供する。例示的な、眼障害の治療に有効な薬剤は、本明細書中に列挙されている（たとえば「本発明の薬剤」として）。

【0267】

他の実施形態では、比較は、試験化合物を投与してから少なくとも約24時間後、または少なくとも約7日後、または少なくとも約30日後、または少なくとも60日後、または少なくとも90日後に行われる。他の実施形態では、比較は、少なくとも約2か月目、または少なくとも約3か月目、または約4か月目、または約5か月目、または最大約6か月目に行われる。一部の実施形態では、比較は、試験化合物の有効量の投与前および投与後で、同一の眼を観察することを含む。一部の実施形態では、比較は、異なる条件下で、（試験化合物の有効量の投与を伴うまたは伴うことなく）、異なる動物の眼の観察を含む。

【0268】

さらなる他の実施形態では、本方法は、試験化合物を投与する前に、眼を観察するステップをさらに含む。一部の実施形態では、この観察は、眼の1つまたは複数の前投与の特徴を確立する。

【0269】

一部の実施形態では、比較および／または観察は、2つの異なる条件の間（たとえば試験化合物の有効量の投与を伴う、または伴うことなく）で、光学イメージングを評価することを含み、光学イメージングの非限定的な例として、c S L O、F A F、O C T（断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む）、S D－O C T（断面像、三次元像、および正面像を含む）、または他のイメージング方法が挙げられ、これは他の蛍光波長（たとえば青色光～赤外線範囲の波長、たとえば390nm～1mmであり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。

【0270】

一部の実施形態では、化合物は、眼障害の発病の治療、予防、または発病の比率の低下を提供する場合、眼障害の治療に有用である。

【0271】

さらなる別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、試験化合物を投与する前に蛍光性化合物を投与することを含む。さらに別の実施形態では、本明細書中に記載の方法は

、（i）追加的な量の蛍光性化合物を動物に投与すること、または（ii）第2の蛍光性化合物を動物に投与することを含まない。

【0272】

他の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、試験化合物を投与する前に毒素を投与すること、および／または蛍光性化合物を投与する前に毒素を投与することを含む。

【0273】

他の実施形態では、複数の候補化合物が同定される。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、眼障害の治療において複数の候補化合物の有用性を比較することと、比較に基づきリード化合物を選択することとをさらに含む。一部の実施形態では、リード化合物は、複数の候補化合物のうちで好ましい化合物である。

10

【0274】

一部の実施形態では、比較は、2つの異なる条件（たとえば第2の候補化合物と第1の候補化合物との比較）の間で光学イメージングを評価することを含み、この光学イメージングは、非限定的な例として、CSLO、FAF、OCT（断面像、三次元像、および正面像を用いるものを含む）、SD-OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、または他のイメージング方法が挙げられ、これは他の蛍光波長を含む（たとえば青色光～赤外線範囲の波長、たとえば390nm～1μmであり、たとえば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。2超の候補化合物を、比較することができる。

【0275】

20

診断方法および予測方法

一部の態様では、本発明は、眼障害を有し、かつある薬剤での治療に応答しない可能性が高い対象を同定する方法であって、上記対象の眼が、非疾患状態と比較して、眼の脈絡膜と網膜との間で上皮性関門を通した透過性の増加を有する、または以前に有していたかどうかを決定することを含み、上記透過性の増加が、対象が、上記薬剤での治療に応答しない可能性が高いことを示し、上記薬剤が、メトトレキサートまたはその薬学的に許容可能な塩、またはおよび式Iの化合物（本明細書中に記載）またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩から選択される、方法を提供する。

30

【0276】

別の態様では、本発明は、ある薬剤での治療に応答しない可能性が高い眼障害の対象を同定する方法であって、上記対象の眼が、非疾患状態と比較して、RPE（および／または網膜内層由来）を通した食作用免疫細胞の存在（たとえば流入）を有するかどうかを決定することを含み、食作用免疫細胞の存在が、対象が、上記薬剤での治療に応答しない可能性が高いことを示し、上記薬剤が、メトトレキサートまたはその薬学的に許容可能な塩、または式Iの化合物（本明細書中に記載）またはその薬学的に許容可能な塩であって、式中各 R_1 および R_2 が、独立して、Hまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、かつ R_3 がHまたは $C_1 \sim C_6$ アルキルである、式Iの化合物またはその薬学的に許容可能な塩から選択される、方法を提供する。

40

【0277】

別の態様では、本発明は、対象の眼障害が、対象の免疫細胞の機能を阻害する薬剤での治療に応答するかどうかを決定する方法であって、対象の眼の免疫細胞の存在を検出すること、不存在を検出すること、または量を測定することを含み、上記対象の眼が、約600nm～約900nm、または約400nm～約900nm、または約400～約1600nmの波長を有する光に応答して蛍光する、方法を提供する。

【0278】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、蛍光性化合物の有効量を対象に投与することをさらに含み、ここでの検出または測定は、上記蛍光性化合物の投与から少なくとも1日後に行われる。一部の実施形態では、検出または測定は、蛍光性化合物の有効量

50

を対象に投与してから少なくとも1日後に行われる。

【0279】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の眼障害が、対象の免疫細胞の機能を阻害する薬剤での治療に応答するかどうかを決定するためのDNIRAを含む。

【0280】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の眼のFAFを検出または測定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、対象の眼における免疫細胞の存在、不存在、または量と、FAFパターンを相関させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、FAFデータとDNIRAデータ間を相関させることを含む。一部の実施形態では、相関は、FAF、ならびに約600nm～約900nm、または約400nm～約900nm、または約400nm～約1600nmの波長を有する光に対して対象の眼の蛍光で観察された空間的なパターンである。

10

【0281】

一部の実施形態では、過蛍光FAFの領域またはFAFの異常なパターンは、異常なDNIRAの領域と空間的に一致してもよく、これは、低蛍光または過蛍光であってもよい。異常なFAFまたは過蛍光FAFは、疾患の活性領域と一致し、萎縮症の領域を予測することができ、理論による拘束を望むものではないが、DNIRAがRPEを標識し、過蛍光のFAFまたは異常なFAFと一致する実施形態では、色素（たとえばICG）を摂取する食作用RPE細胞は、異常な量のリポフスチンまたはリポフスチン様物質を有する。さらに理論による拘束を望むものではないが、DNIRAが免疫細胞（たとえば食作用免疫細胞または生来の免疫系の細胞）を標識し、過蛍光FAFまたは異常なFAFと空間的に一致する実施形態では、色素（たとえばICG）を摂取する食作用免疫細胞は異常な量のリポフスチンまたはリポフスチン様物質を有し、かつ／または異常な量のリポフスチンまたはリポフスチン様物質を有する細胞と一致する。よって一部の実施形態では、異常なDNIRAと異常なFAFの同時の局在化は、治療用の細胞標的を同定することができる。このような同時局在化は、一部の実施形態では、疾患の動物モデルおよび患者の両方において、疾患の進行を低減、遅延、予防するために免疫系を標的化する特性を提供する。

20

【0282】

一部の実施形態では、この検出または測定は、蛍光性化合物を投与してから約1日後、または約7日後、または約30日後に行われる。他の実施形態では、比較は、約2か月目、または約3か月目、または約4か月目、または約5か月目、または最大約6か月目に行われる。一部の実施形態では、比較は、試験化合物の有効量の投与前および投与後の、同一の動物の眼の観察を含む。一部の実施形態では、比較は、異なる条件下（たとえば試験化合物の有効量の投与を伴うまたは伴うことなく）での、異なる動物の眼の観察を含む。

30

【0283】

一部の実施形態では、比較は、非限定的な例として、2つ異なる条件（たとえば試験化合物の有効量の投与を伴うまたは伴うことなく）の間での、光学イメージングの評価を含み、この非限定的な例として、cSLO、FAF、OCT（断面像、三次元像、および正面像を含む）、SD-OCT（断面像、三次元像、および正面像）、または他のイメージング機構が挙げられ、これは、他の蛍光波長（たとえば青色～赤外線までの範囲の波長、例えば390nm～1mmであり、例えば青色光、白色光、赤色を含まない光、近赤外線、または赤外線を含む）を含む。

40

【0284】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法は、（a）追加的な量の蛍光性化合物、または（b）第2の蛍光性化合物を投与することを含まない。

【0285】

対象および／または動物

一部の実施形態では、対象および／または動物は哺乳類、たとえばヒト、マウス、ラッ

50

ト、モルモット、イヌ、ネコ、ウマ、ウマ、ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、またはサル、チンパンジー、もしくはヒヒなどの非ヒトの霊長類である。他の実施形態では、対象および／または動物は、たとえばゼブラフィッシュなどの非哺乳類である。一部の実施形態では、対象および／または動物は、蛍光タグ化細胞（たとえばGFPを含む）を含んでもよい。一部の実施形態では、対象および／または動物は、たとえばRPE細胞および／または免疫細胞などの蛍光性細胞を含むトランスジェニック動物である。一部の実施形態では、対象および／または動物はヒトである。一部の実施形態では、ヒトは小児である。他の実施形態では、ヒトは成人である。他の実施形態では、ヒトは老人である。他の実施形態では、ヒトは患者を意味してもよい。

【0286】

10

特定の実施形態では、ヒトは、生後約0か月～約6か月、生後約6～約12か月、生後約6～約18か月、生後約18～約36か月、約1～約5歳、約5～約10歳、約10～約15歳、約15～約20歳、約20～約25歳、約25～約30歳、約30～約35歳、約35～約40歳、約40～約45歳、約45～約50歳、約50～約55歳、約55～約60歳、約60～約65歳、約65～約70歳、約70～約75歳、約75～約80歳、約80～約85歳、約85～約90歳、約90～約95歳、または約95～約100歳の範囲である。

【0287】

他の実施形態では、対象は非ヒトの動物であり、よって本発明は、獣医学的な用途に属する。特定の実施形態では、非ヒトの動物は家庭用ペットである。別の特定の実施形態では、非ヒトの動物は家畜動物である。

20

【0288】

様々な実施形態では、対象および／または動物の眼は、(i) 対象および／または動物の眼障害の存在を表すために有効な量の蛍光性化合物、ならびに(ii) 眼組織の萎縮症を誘導するために有効な量の毒素を含む。一部の実施形態では、このような対象および／または動物は、本発明の薬剤を投与されており、または本発明の薬剤を投与されていない。

【0289】

様々な実施形態では、RPE細胞および免疫細胞は、評価される、かつ／または作用する。一部の実施形態では、免疫細胞は、対象および／または動物の生来の免疫系の細胞を含む。一部の実施形態では、このような細胞は、限定するものではないが、マクロファージ、単球、およびミクログリア細胞を含む。様々な実施形態では、本発明は、対象および／または動物の眼における免疫細胞の存在を検出し、非存在を検出し、またはその量を測定することを提供する。

30

【0290】

キット

本発明は、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の投与を単純化できるキットを提供する。本発明の例示的なキットは、単位剤形で本明細書中に記載のいずれかの薬剤を含む。一実施形態では、単位剤形は、滅菌性とすることができる、プレフィルドシリンジなどの容器であり、本明細書中に記載のいずれかの薬剤と、薬学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、またはビヒクルとを含む。本キットは、本明細書中に記載のいずれかの薬剤の使用を説明するラベルまたは印刷された説明書をさらに含むことができる。また本キットは、開瞼器、局所麻酔剤、および眼の表面の洗浄剤を含んでもよい。また本キットは、本明細書中に記載の1つまたは複数の追加的な薬剤をさらに含むこともできる。

40

【0291】

一実施形態では、本キットは、たとえば式Iの化合物、メトトレキサート、またはそれらの薬学的に許容可能な塩を含む本発明の薬剤の有効量と、本明細書中に記載されるなどの別の治療剤の有効量とを含む容器を含む。

【0292】

本発明を、さらに以下の非限定的な実施例により説明する。

50

【0293】

実施例

実施例1. RPEの毒素である NaIO_3 の全身性の注射が、AMDおよび／またはRPDに類似したFAFの複合的なパターンを誘導する。

RPE毒素であるヨウ素酸ナトリウム(NaIO_3)を、地図状萎縮(GA)に類似した、ラットの眼におけるRPEおよび低蛍光DNIRAのパッチ状の喪失を作製した。このモデルはRPE萎縮症を発症するだけでなく、進行した非滲出型AMD、RPD、およびびまん性—しずく型(diffuse trickling)の非滲出型AMDに最も密接に類似している、侵襲性臨床疾患に関連したFAFの複合パターンを明確に再現した。

10

【0294】

材料: ICG (Cardiogreen)、ヨウ素酸ナトリウム、ハリスヘマトキシリン(Harris haematoxylin)およびエオシンは、Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) 製である。0.8%のトロピカミドを含む5%のフェニレフリン塩酸塩溶液(ジオフェニルT)は、Sandoz Canada Inc (Boucherville, QC, Canada) 製であり、GenTeal 潤滑用点眼薬は、Novartis Pharmaceuticals Canada Inc (Dorval, QC, Canada) 製であった。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中32%のパラホルムアルデヒドは、Electron Microscopy Sciences Hatfield, PA) 製であった。マウス抗ラットCD68抗体は、AbD Serotec (Oxford, UK) 製であり、マウスIgGはSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 製であった。ウサギ抗Iba-1は、Wako Pure Chemical Industries Ltd (Osaka, Japan) 製であった。Alexa標識蛍光ヤギ抗マウス二次抗体、イソレクチンIB₄結合体およびTO-PRO-3核酸染色は、Invitrogen (Camarillo, CA, USA) 製であった。Dako蛍光封入培地(Dako fluorescent mounting medium)は、Dako North America (Burlington, ON, Canada) 製であった。

20

【0295】

動物の手順: すべての手順は、カナダ動物協会に従い、かつARVO 宣言(ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)を遵守して行った。すべての実験で、6~10週齢のスプラグドーリー(SD)ラットを、12時間の暗／明期で、食物および水を自由に与えながら保持した。評価のため、ラットに、ケタミン(100 mg/kg)およびキシラジン(10 mg/kg)で麻酔をかけ、ジオフェニルTを用いて瞳孔を散大させた。眼を、GenTealの潤滑用点眼薬を使用して状態を調整した。単回のイメージングセッションまたは一連のイメージングのいずれかの後に、T61 (Intervet Canada, Whitby, Canada)の心臓内注射により、動物を人道的に屠殺した。

30

40

【0296】

ヨウ素酸ナトリウム(45%の溶液)を、0.9%の塩化ナトリウム中、各実験セットのために新たに調製し、最終濃度45 mg/kg体重となるまで注射した。合計192個の眼を評価した。

【0297】

眼底のイメージングを、市販の共焦点走査型レーザー検眼鏡(cSLO, Spectralis, Heidelberg Retinal Angiography, HRA-II; Heidelberg Engineering GmbH, Germany)、およびEye Explorer Image Capture system, version 1.1.10を使用して行った。赤色を含まない(RF、緑色優

50

位の) イメージング用の障壁フィルターを用いないフルオレセインの血管造影の500 nmの障壁フィルターでは、488 nmの励起波長で、ICG血管造影では795/810 nmの励起/発光で、および赤外線反射イメージングでは830 nmのレーザーで、画像を撮像した。

【0298】

488 nmのFAFを評価するために、cSLOのイメージングを、フルオレセイン色素の非存在下で行った。フルオレセインは、ベースライン、または各試験のいずれかの時点でも得られなかった。脈管構造を同時にイメージングし、FAFイメージング解析のための標識を提供することが必要な場合、2 mg/kg、または5 mg/kgのICGを、あらかじめ挿入された23ゲージの尾静脈カテーテル内へ尾静脈を介して注射した。モデルの最初の特徴などの少数の明確に示された状況では、フルオレセインデキストラン(200 kD)を、静脈内に提供した。フルオレセイン血管造影を使用したこれら後者の試験の結果を、動物のサブセットで行いFAF解析に含めなかった。

【0299】

眼底の画像を、ベースライン(0日目、すなわち全身性NaIO₃注射前)、およびNaIO₃から3または4(3/4)日後、7または8(7/8)日後、および13または14(13/14)日後に、定例的に得た。さらに、モデルの最初の特徴に関して、NaIO₃から24時間後、21~28日目、および88日(3ヶ月)以降に、画像を得た。可能である場合、少なくとも9つの画像からなる複合的な画像を、以下の順: 視神経乳頭の右上、右、右下、下部、左下、左、左上、および上部の領域で採取した。場合によっては、第2または第3の完全または部分的な画像のリングを、概して、必要に応じてcSLOに対して動物を再調整することにより、より周辺領域で得た。対照的に、完全な9つの画像が撮像できなかった他の場合では、部分的な複合画像を作製した。

【0300】

高解像度のスペクトル領域のOCT画像を得た(Envisu R2200 VHR Animal SDOIS System, Biopogen, USA)。36,000/秒の速度、網膜のレベルで約2.8 μmの方位分解能を伴い、スキャンを行った。

【0301】

組織解析: パラフィンを埋め込んだ組織のヘマトキシリン(hemotoxylin)およびエオシン(H&E)の組織学的検査を、Dacidsenの固定液を用いて固定した後に、当該分野で知られているように行った。パラフィンを埋め込んだ切片を、Nikonのアップライト型E800顕微鏡を用いて見た。脱パラフィンおよび再水和の手法を、H&Eの組織処理の通りに行った。

【0302】

免疫組織化学的検査のために、切片を、室温でTBS中5%のBSAでブロッキングし、抗CD68抗体とともにゆっくりと震盪させながら4℃で一晩インキュベートした。すすいだ後、試料を2次抗体とともに室温で2時間インキュベートし、再度洗浄した。陰性対照では、同種のIgGを、一次抗体と同等の最大モル濃度で使用した。核を、TO-PRO-3で対比染色した。

【0303】

共焦点顕微鏡および蛍光顕微鏡: 画像を、TCS SL共焦点蛍光顕微鏡(Leica Microsystems, GmbH, ドイツヴェッツラー)を使用して得て、画像を撮影し、Leicaの共焦点ソフトウェアを使用して解析した。アップライト型落射蛍光顕微鏡(Upright epifluorescent microscope)(Olympus BX50)をも使用して、488 nmの波長の光の下で細胞の自己蛍光シグナルを見た。共焦点の連続したZ切片の3Dの再構成を、Imaris software version 7.4.2(Bitplane)を用いて行った。

【0304】

正常なスプラーグドーリーラットの眼のin vivoでのFAFおよび血管造影のイ

10

20

30

40

50

メーキングは、R P E 蛍光を遮断し、よって暗く見える放射状に配置された網膜血管、および視神経乳頭（O N H）での中心の低蛍光のサークルにより、遮断されているかすかな一様地盤のガラス状の輝きを生成した。ここではP R Eは存在しない（図1 A～D）。全身性N a I O₃注射の3日後、過蛍光の境界を伴う同等またはわずかに過蛍光のF A Fの単一の領域が現れ、明確な島、セクター、または360°のリングの形状をとった（図1 A～D）。島またはセクターは、O N Hより下部、または半網膜下部に、一貫して局在している（図1 A～D）。360°のリングが存在する場合、このリングは概して眼底の大部分を含み、このうちの1つの境界は、O N Hの近くまたは周辺および網膜周辺部の中央または遠位部にある。大きな360°のリングが、最も一般的に観察される形状であり、ヨウ素酸ナトリウムで処置した眼の102/110（93%）で発生した（図2 A～D）。すべての場合、島、セクター、またはリングはO N Hに達したが、それに近接はしなかった（図1 A～D～3 A～C）。これらおよび以下の知見は、160個の眼にわたり確認された。

【0305】

N a I O₃の注射からおおよそ4～5日後から始まって、過蛍光／低蛍光が交互のF A Fの顕著な網状または曲線のパターンが島、セクター、またはリングの中に現れた（図1 A～D）。7日目までに、このパターンは明確となった。小さな病変では、これは島またはセクターを完全に満たし、急速に発現する。大きな360°のリングでは、近位および遠位の境界で最初に明らかとなり、次週にわたり出現し続け、これにより、曲線の構成要素は、部分的なループ、長円、円、ロゼット、および貝殻状、または「動物の足跡」のパターンのF A Fに寄与した（図2 A～D）。いくつかの領域では、曲線、円形、または長円の形状は癒着し、周辺領域よりも暗くなり、均一に暗灰色の低蛍光のF A Fのパッチとして現れた。時間の経過とともに、過蛍光の網状のパターンは、i n s i t uで成熟し、より粒状であり、なだらかではない曲線となった（図2 A～D）。しかしながら、20週をすぎると、最終的な時点が解析すると、境界は、過蛍光の網状のパターンを保持しており、網膜周辺部に向けてわずかに変形し続けていた。

【0306】

動物のサブセットで行ったフルオレセインの血管造影は、網状のパターンが、網膜または脈絡膜の脈管構造と対応しないことを確認した（特段記載がない限り、フルオレセイン-デキストラン、488nmの色素は、F A Fのイメージングを行った動物に投与されなかったことに留意されたい）（図1 A～D）。しかしながら、I C Gの血管造影は、F A Fの島またはリングのセクターの部分的および一時的な出現と一致する、N a I O₃の約2～3日後に、R P EおよびB Mを通して脈絡網膜性の界面で起こる透過性の変化を明らかにした（図1 A～D）。この透過性の増加は、一過性であり、7日目までに消散し、この次の時点は定例的に評価した。この網膜の血管は漏出しなかった。N a I O₃モデルでは、H & E染色は、流体が網膜下腔に集積することを確認した。これはまた、i n v i v oでの超高分解像度O C Tによっても観察された。

【0307】

i n v i v oで観察されたF A Fパターンの病理学的な相関を決定するために、摘出した網膜の全載を、白色光下および488nm-i n v i v oでのイメージングで使用した同一の波長での落射蛍光顕微鏡により、I H C標識の蛍光を用いずに低倍率で見た。その後の組織解析に応じて、この目的のために2つの顕微鏡を使用した：狭い励起／発光ウィンドウ（488/520nm）を有する落射蛍光装置、および450～490nmのバンドを含む励起後の515nm超の蛍光を提供する水銀灯およびロングパス（バンドパスではない）フィルターを備える共焦点顕微鏡のI n v e r t e d L e i c a D M I R E 2観察システム（v i e w i n g s y s t e m）。白色光下で、正常なラットの網膜は、全体を通してかなりの部分が均質であり、一部の人工物が変形している（図3 A）。対照的に、微妙な灰白色の、わずかな網状のパターンが、N a I O₃注射から7日後に得られた試料で現れるようになる。14日目までに、このパターンはより明白になり、網膜の切り口で最も良好に表される小さな網膜外部のひだと対応するように観察される（

図3B)。488nmの蛍光で観察すると、これと同一の曲線パターンがはっきりしている。注射から7日目まで明確ではあるが、自己蛍光の増加は、このパターンを14日目までより可視化させている(図3C)。高倍率の落射蛍光顕微鏡を使用すると、このレース状の曲線パターンは、網膜外部の溝またはひだと一致することが明らかである自己蛍光細胞の空間分布と一致することが示された(図3A~C)。

【0308】

図4A~Cは、NaIO₃モデルにおける組織の知見と、RPDの臨床的な特徴の比較を示す。RPD患者(網膜下腔にベースダウンした錐体構造を示す)の臨床OCTイメージングに加えて、色つきおよび赤色を含まない眼底の画像を得た(図4A~C)。赤色を含まない画像は、RPDの個々の偽ドルーゼンを構成する小さな暗いスポットを示した(図4A、上部画像)。これらは、暗灰色のオーバーレイを使用して同定した。さらに本出願人は、円により限定される、RPDを特徴づけるいわゆる「標的病変」の存在を強調した。これらは、より薄い中心を有する暗いスポットとして現れる。並行して、正面および断面の両方における折りたたまれたラットの網膜外部の図式化された例示は、黒色および白色(「陽性」および「陰性」)の画像として偽って色分けされ、提示される場合に、RPDの標的様病変と直接関連し、暈状であるように現れる。まとめると、これらのデータは、2Dの正面で見ると、暗い中心を有する円形、暈状および標的病変のレース状または網状のパターン内の暗い偽ドルーゼンの2Dパターンが、3Dで用量分析的に考慮される増加したリングおよびクレーターと対応することを示唆している。内部の偽ドルーゼンのマトリックスは、断面がOCTによりピラミッドまたはスパイク状として現れる場合に、持続性の網膜下の炎症のリボンからなる。これらの構造間で喪失した網膜外部は、暗く現れる。これは、RPDの暗いパッチに隣接したOCTに画定された偽ドルーゼンを位置付けている。理論による限定を望むものではないが、この網膜の構造的な変形との関連は、なぜRPDが、いくつかのイメージング様式で可視化でき、かつ488nmなどの特定の波長に限定されず、シグナルがフルオロフォア依存性である場合に単独では起こり得ることを説明するものである。

【0309】

実施例2：全身性ICG投与後のラットの眼のDNIRAが、網膜色素上皮(RPE層)を*in vivo*で同定する。

近赤外線色素のICGが、全身に注射した後、RPE/網膜外部を標識でき、よって、RPEおよびRPE萎縮症の検出を高めることができることが示されている。ICGの励起/発光フィルターを使用して観察したDNIRAの変化は、RPE/網膜外部の喪失領域の同定するための疾患モデルにおけるFAFに代わり有用である。

【0310】

ICG色素、またはPBSを、0.35および5.0mg/kgの用量で46匹のスプラグドローリーラットに全身的に注射し、眼底を、注射前、注射から2日後、7日後、および21日後に、所定の795/810nmの励起/発光フィルターを備える共焦点走査型レーザー検眼鏡(cSLO)を使用して、*in vivo*で評価した。網膜電図検査(ERG)を、潜在的な毒性を評価するために行った。動物のサブセットで、RPEの毒素を、注射して、RPEの損傷または喪失を誘導した。

【0311】

具体的には、動物の試験では、眼の研究における人道的な動物の使用に関するAssociation for Research in Vision & Ophthalmology (ARVO)のガイドライン、およびSt. Michael's Hospital Animal Care Committeeのガイドラインに従い、動物を扱った。6~10週齢であり、体重200~300gの46スプラグドローリー(SD)ラットを、12時間の暗/明周期で保持し、食物および水を自由に与えた。ケタミン(100mg/kg)およびキシラジン(10mg/kg)を併用して動物に麻酔をかけ、0.8%のトロピカミドを含む5%のフェニレフリン塩酸塩溶液(ジオフェニルT, Sandoz Canada Inc)を1滴用いて瞳孔を拡大した。すべての工程の間、

角膜の表面にGentlealの潤滑用点眼薬（Novartis, Canada）を繰り返し使用した。

【0312】

CSLO: *in vivo*での画像を、市販のcSLO（Heidelberg Retinal Angiography, HRA-2, Heidelberg Engineering, Germany）を使用して得た。画像を、赤色を含まないFAF（488/500nm励起/発光）、NIRチャネル（830nm）、およびICGチャネル（795/810nm励起/発光）で得た。

【0313】

ICGおよびフルオレセインの血管造影：ICGの色素（Cardiogreen, Sigma, Cat # I2633）を、最終原液濃度5.0mg/mlに、実験前に新たに調製した。23ゲージカテーテルを尾静脈に挿入し、0.35、または5.0mg/kgの用量でICG色素を注入した。注射前（ベースライン）、色素循環の最中、および注射後の様々な間隔～最大20分後に、画像を取得した。動物のサブセットでは、5.0mg/mlのフルオレセイン-デキストラン（200kD）（Sigma, Cat # FD2000S）の溶液を、尾静脈のカテーテルを介してIV注射して、最終用量5.0mg/kgを得た。ICGおよびフルオレセインの血管造影を、動物のサブセットのみで同時に行い、フルオレセインは注射しなかった。血管造影の画像を、それぞれ488/500nmおよび795/810nmの励起および発光フィルターを含むフルオレセインおよびICGチャネルで得た。対照の動物にはPBSを投与した。

【0314】

DNIRA：DNIRAの画像を、ICG血管造影の設定、すなわち、励起/発光フィルターを含むが、血管造影から24時間後、48時間後、3日後、7日後、21日後、および28日後に色素の再注射を伴わない設定を使用して、ICG注射から数日および数週間後に得た。血管造影を、試験の時間経過の間に再度行わなかった。

【0315】

毒素の投与：動物のサブセット（n=7）で、RPE毒素のNaIO₃（Sigma, cat # 424064）を45mg/kg体重の用量で、23Gカテーテルを介して尾静脈へ全身的に注射した。これらの動物で、0.35mg/kgでのICG血管造影を、NaIO₃注射の直前に行った。DNIRAを、ICGおよびNaIO₃注射から7日後に行った。

【0316】

網膜電図検査（ERG）：ICGおよびPBSを投与した動物を、Espion（Diagnosys LLC, USA）mini-Ganzfeld ERG systemを使用して評価した。麻酔をかけた後、動物を、電氣的に静止した加熱パッド上に置き、Gentlealの潤滑点眼薬を使用した後に角膜の表面に金色のコイルの電極を配置した。短期間の鈍いフラッシュ（0.01カンデラs/m²、1.0Hz）の後、暗順応のb波の振幅を、b波の振幅の最大値に近い応答を一定して生成すると本出願人が決定した単一の明るいフラッシュ（3カンデラs/m²）を使用して評価した。スチューデントt検定を使用して、ベースライン（注射前）と注射後の振幅を比較した。

【0317】

統計的な解析は、ANCOVAの回帰解析を使用した。

【0318】

すべての実験に関して正常な対照として、正常なスプラグドローラットの眼における典型的なベースライン（ICG前）のcSLOの知見を示し（図5A～H）、PBS処置した動物を加えて扱った（図6A）。赤色を含まない（すなわち緑色優性の）イメージングは、視神経乳頭（ONH）および網膜の放射状の血管を同定した（図5A）。低度の内因性シグナルは、NIRチャネルにおけるより長い波長でも見られ（830nm）、より深い光の侵入により起こるより深い脈絡膜の血管の一部の有望なイメージングを伴うONHおよび脈管構造の類似の画像を提供した（図5B）。ヒトの試験と一致して、FAF

は、詳細を欠いているかすかなすりガラス様の輝きとして現れ、放射状の網膜血管により不明瞭であり、ONHでは存在していない（図5C）。しかしながらこの拡散した輝きは非常にかすかである。

【0319】

対照的に、ICGの血管造影用のための所定のNIR励起／発光フィルターを用いると、ICG注射前には、眼でシグナルが観察されなかった、または無視できるほど小さかった（図5D）。走査線は明らかであり、脈管構造はほとんど検出できず、または全く検出されなかった。このことは、60個もの眼で観察された。ICG注射の直後では、網膜および脈絡膜の血管の両方（図5F、および図5Gの第2のパネル）は、移行期から実験の最後の、20分後まで同定された。またフルオレセインの血管造影は、正常な網膜の脈管構造をも確認した（図5E）。野生型のSD動物では、フルオロフォアを使用して、血管床のいずれかからの漏出も観察されなかった。

【0320】

ICGの血管造影前のベースラインの画像は、ICG励起／発光フィルターの存在下、NIRの刺激下でシグナルを呈さなかったが、0日目（ $t=0$ ）にICGを単回注射してから3日後、8日後、21日後、および28日後に得た画像は、遅発性および持続性の蛍光を示した（図5G）。これは、フルオレセイン-デキストランの色素での血管造影後に行い、所定のフルオレセイン血管造影フィルターで解析した同様の実験では観察されず（図5H）、ここでは、同一のレベルの低度の注射前の蛍光が、試験の時間経過にわたり可視化できる。また、事前のICG注射の非存在下でも起こらなかった（図6A）。このICG後の遅発性NIR蛍光の定性的な解析は、正面で見られた後極で小斑点の「モザイク状」のパターンを示し、これは、網膜の血管よりも深く（これより外部）、脈絡膜の脈管構造を見ることを阻害しており、網膜と脈絡膜との間の位置を示唆している。ONHおよび乳頭周囲領域は蛍光しなかった。これらの特徴は、患者の青色スペクトラムで行ったFAFの特徴と類似している。焦点の同一の平面は、両方の蛍光技術にとって最適であることが示された。

【0321】

ICG注射後のDNIRAを使用して作成した知見は、用量依存性であった（図6A～D）。血管造影に使用した最初のICGの用量が高いほど、NIRシグナルはより輝く。高用量の 5 mg/kg では、cSLOの増分（感受性）を適切な質の画像を得るために低減することが必要であり、低用量（ 0.35 mg/kg ）は、輝きが少なく、適切な質の画像を得るために増分を増加する必要がある。同一のレベルで設定した増分での比較画像（図6A、図6B、および図6C）は、輝度の用量応答性の増加を示した。同一の実験で、28日目までに、小斑点のパターンが、低用量のICGを投与した動物で消失したことが示された（図6B）。対照的に、高用量のICGを投与した動物では、注射から3日後と28日後との間に明確な差異はほとんどなかった（図6C）。

【0322】

ICGの活性化に必要な $795/810\text{ nm}$ の励起／発光フィルターを伴わない、 830 nm でのNIRの反射率のイメージングは、DNIRAで観察された小斑点の用量依存性および時間依存性の蛍光の知見を得ることがなかった。

【0323】

DNIRAがRPEおよび／または網膜外部の複合体を同定することを示すことにより、DNIRAを使用して、RPEの構造の異常を同定できることを示した。DNIRAは、RPE毒素の NaIO_3 の全身注射と併用して使用した。 NaIO_3 は、RPE細胞にとって直接的に毒性であり、この細胞の喪失をもたらし、その上の光受容体のアポトーシスがその後起こる。 NaIO_3 注射から数日後および数週間後のDNIRAは、地図状（空間的）の、明確な低蛍光のパッチを同定し、これは連続的な小斑点の蛍光の中の大きな黒いパッチとして現れた。これらの低蛍光のパッチは、明確な境界により区切られていた。さらに、cSLO増分の増加に伴い、これらパッチにわたり見られたより大きな輝きが、脈絡膜の明確で詳細な可視化を可能にした（図7A～B）。脈絡膜の血管を、これらの

複雑性、変動する大きさ、ONHに関する非放射状のパターンにより同定した。対照的に、小斑点の層は、この表示をあいまいにするが、進行中の上を覆う網膜血管の可視化が可能である。これらのデータは、DNIRAがICG標識したRPE／網膜外部層を検出するとの見解と、一致した。

【0324】

さらに、前臨床の実験に関するDNIRAの適合性を、毒性試験とともに例証した。PBSに対する、高用量および低用量の全身性ICGの濃度を比較する網膜電図検査を行った。これらのデータは、対照動物で認められた変化と比較して、注射から3週間のb波の振幅における統計的に有意な変化を示さなかったが、使用する用量範囲にわたりDNIRAが脈絡網膜性疾患の前臨床試験において安全であることを示す。高用量は、臨床的に使用した上記で良好であるが、グラム／体重の単位の低用量は、従来の眼底カメラを用いた用量と一致するものである。

10

【0325】

実施例3：眼障害の治療用の化合物の発見

1つまたは複数の眼障害をモデル化する動物を確立して、このような動物に試験化合物を投与する。

【0326】

眼障害の症状は、蛍光検出を含むin vivoでのイメージングを使用して決定する。候補化合物は、眼障害の特徴を呈するために十分な時間または時間経過後に、眼の蛍光を観察することにより、同定する。候補化合物は、本明細書中に記載の眼障害の特徴を低減または排除する特性に関して評価する。

20

【0327】

実施例4：眼障害用の化合物の活性の評価

眼障害をモデル化する動物を開発して、このような動物に候補化合物を投与する。

【0328】

眼障害の症状は、蛍光性検出を含むin vivoでのイメージングを使用して決定する。候補化合物の活性は、眼障害疾患の特徴および候補化合物の活性を呈するために十分な時間または時間後に眼の蛍光を観察することにより、評価する。候補化合物は、本明細書中に記載の眼障害の特徴を低減または排除する特性に関して評価されてよい。

30

【0329】

実施例5：ビンダリットでの非滲出型AMDの治療

56～100歳以上のヒトの対象は、以下の臨床試験：臨床試験、FAF（いずれかの波長）、近赤外線および／または赤色を含まない写真、異常な血管プロセスの同定および局在化を可能にするフルオレセイン血管造影；ヒトの網膜および脈絡膜などの光学散乱媒体内から、高解像度の断面または正面の画像を提供するOCT；ならびに、網膜色素上皮組織切片において小さな自己蛍光構造（リポフスチンの顆粒）の蛍光分布を解像するように特に設計された高解像度の顕微鏡の設定を使用した、構造化照明光学顕微鏡のうちの1または複数により診断された非滲出型AMDを呈する。

【0330】

対象に、2回の300mgの経口投与（または最大1200mg）を、12週間にわたり1日1回行った。最初の12週間の治療期間の後、対象の臨床上的結果を評価した。あるいは、患者に、薬剤送達ビヒクルを含むまたは含まない、ビンダリットを含むビヒクルの硝子体内注射を行う。

40

【0331】

最初の臨床結果を、当該分野でよく知られている標準的な視力検査を使用して決定した。ある距離からのスネレン視力表上のシンボルおよび物体を明確に見る特性に関して、対象を評価した。

【0332】

第2の臨床結果は、地図状萎縮の進行速度を評価する。これを行うために、1.0%のトロピカミドおよび2.5%のフェニレフリンで瞳孔を拡大した後、網膜のイメージング

50

を行った。Helb, et al. Acta Ophthalmol. 2010 Dec; 88 (8) : 842-9に記載されるように、cSLOおよび2つの独立した走査ミラーを備えるスペクトル領域光干渉断層撮影 (SD-OCT) の同時の記録を可能にする器具 (たとえばSpectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, ドイツハイデルベルク) を用いて、イメージングを行う。5つの運用モデルを使用する: 白色光、赤色を含まない光、近赤外線、FAF、およびOCT。

【0333】

第3の臨床結果は、低蛍光DNIRA (低蛍光領域により定量化) の変化の比率を評価する。これを行うために、1.0%および2.5%のフェニレフリン (phylephrine) を用いて瞳孔を拡大した後、網膜のイメージングを行う。(血管造影を行う能力を伴う、または伴わない、所定の適切な励起および発光フィルターを備える共焦点走査方法または改変した眼底カメラを利用し得る) 器具を用いて、イメージングを行い、このイメージングは、ICG注射前 (ベースライン) および、色素を注射しないが、所定の励起/発光フィルターを用いる色素注射から数日後に再度、行う。

10

【0334】

第4の臨床結果は、過蛍光のDNIRAのドットの数および位置の変化を評価する。これを行うために、1.0%および2.5%のフェニレフリンを用いて瞳孔を拡大した後、網膜のイメージングを行う、(血管造影を行う能力を伴うまたは伴わない所定の適切な励起および発光フィルターを備える共焦点走査方法または改変した眼底カメラを利用し得る) 器具を用いて、イメージングを行い、ICG注射の前 (ベースライン)、およびさらなる色素の注射を行うことなく、所定の励起/発光フィルターを用いて、色素注射から数日後に再度、イメージングを行う。

20

【0335】

cSLOの画像を、近赤外線反射 ($\lambda = 815 \text{ nm}$) およびFAF ($\lambda = 488 \text{ nm}$ で励起、500~700 nmで発光) の画像の取得を含む、標準的な操作プロトコルに従って得る。低蛍光 (暗色) FAFの領域を測定し、経時的に類似の測定値と比較する。この増加は低蛍光FAFの大きさであり、GAの進行速度の測定値である。あるいは、GAの領域およびそれらの経時的な変化は、SD-OCTイメージングの正面の再構成から計算することができ、たとえば870 nmの例示的な波長で行うことができ、40,000 A/sキャン速度、および前後走査1.8 mmで得ることができる。眼あたり2つのSD-OCTスキャン (1つは垂直であり1つは平行) を、おおよそ中心窩にわたり行い、またはRPDの場合、黄斑の血管の列弓に近接して、行う。フルオレセイン血管造影 ($\lambda = 488 \text{ nm}$ 、発光500~700 nm、10%のフルオレセイン色素) を、必要に応じて行う。色付きの眼底の写真を、眼底カメラ (たとえばFF 450 Visupac ZK 5; Carl Zeiss Meditec AG, ドイツイエーナ) を用いて得た。

30

【0336】

臨床予後のデータの解釈は、必要に応じてさらなる治療のための決定を知らせるものである。

40

【0337】

実施例6: 併用療法での非滲出型AMDの治療

56~100歳以上のヒトの対象は、以下の臨床試験: 臨床試験、白色光の眼底のイメージング、いずれかの波長でのFAF、近赤外線および/または赤色を含まない写真、青色の蛍光、および/または、異常な血管プロセスの同定および局在化を可能にするフルオレセインもしくはICGの血管造影; ヒトの網膜および脈絡膜などの光学散乱媒体内からの高解像度の断面、三次元、および正面の画像を提供するOCT; ならびに、網膜色素上皮または他の細胞および細胞層において小さな自己蛍光構造 (リポフスチン、リポフスチン様、または他の顆粒) の分布を解像するように特に設計された高解像度の顕微鏡または検眼鏡の設定を使用した、構造化照明光学顕微鏡のうちの1または複数により診断された

50

非滲出型AMDを呈する。

【0338】

非限定的な例により、ビンダリットを、12週間の間、1日1回、2回の300mgの経口用量（または最大1200mg）で、対象に投与した。また、1ヶ月（およそ28日）に1回、罹患した眼あたり0.5mgの用量でランビズマブの注射を対象に行う。最初の12週間の治療期間の後、臨床結果について対象を評価する。また、ビンダリットを、本明細書中に記載の眼経路のいずれか（たとえば硝子体内）を介して投与してもよい。

【0339】

あるいは、ビンダリットを、非限定的な例により12週間の間、1日1回、2回の300mgの経口用量（または最大1200mg）で、対象に投与する。また4～6週間当たり1回、罹患した眼あたり約10mgの用量で、ランパリズマブを対象に投与する。最初の12週間の治療期間の後、臨床結果について対象を評価する。またビンダリットを、本明細書中に記載の眼経路のいずれか（たとえば硝子体内）を介して投与してもよい。

【0340】

第1の臨床結果は、当該分野でよく知られている標準的な視力検査を使用して決定する。ある距離からのスネレン視力表上のシンボルおよび物体を明確に見るための能力に関して、対象を評価する。

【0341】

第2の臨床結果は、地図状萎縮の進行速度を評価する。これを行うために、1.0%のトロピカミドおよび2.5%のフェニレフリン、または適可能な薬剤で瞳孔を拡大した後、網膜のイメージングを行う。Helb, et al. Acta Ophthalmol. 2010 Dec; 88(8):842-9に記載のように、cSLOおよびSD-OCTの同時の記録を可能にする器具（たとえばSpectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, ドイツハイデルベルク）を用いて、イメージングを行う。複数の操作様式を使用することができる：白色光、赤色を含まない光、青色光、近赤外線、およびOCT。同様の解析を、改変した眼底カメラを用いて行うことができる。

【0342】

第3の臨床結果は、低蛍光DNIRA（低蛍光領域により定量化）の変化の比率を評価する。これを行うために、1.0%および2.5%のフェニレフリンを用いて瞳孔を拡大した後、網膜のイメージングを行う。器具（血管造影を行う能力を伴うまたは伴うことなく、所定の適切な励起および発光フィルターを備える共焦点走査方式または改変した眼底カメラを利用し得る）を用いて、イメージングを行い、ICG注射の前（ベースライン）、およびさらなる色素の注射を行うことなく、所定の励起／発光フィルターを用いて、色素注射から数日後に再度、イメージングを行う。

【0343】

第4の臨床結果は、過蛍光のDNIRAのドットの数および位置の変化を評価する。これを行うために、1.0%および2.5%のフェニレフリンで対象の瞳孔を拡大した後、網膜のイメージングを行う。器具（血管造影を行う能力を伴うまたは伴うことなく、所定の適切な励起および発光フィルターを備える、共焦点走査方式または改変した眼底カメラを利用し得る）を用いて、イメージングを行い、ICG注射前（ベースライン）、およびさらなる色素の注射を行わず、所定の励起／発光フィルターを伴い、色素注射から数日後にさらに、イメージングを行う。

【0344】

cSLOの画像は、近赤外線反射（ $\lambda = 800 \sim 1000 \text{ nm}$ ）およびFAF（ $\lambda = 280 \sim 550 \text{ nm}$ 、発光 $350 \sim 700 \text{ nm}$ ）の画像を得ることを含み得る当該分野で知られているプロトコルに従い、得られる。低蛍光（暗色）FAFの領域を測定し、経時的に類似の測定値と比較する。この増加は、低蛍光FAFの大きさであり、GAの進行速度の測定値である。あるいは、GAの領域およびその経時的な変化は、SD-OCTイメージングの正面の再構成から計算でき、たとえば、 870 nm の蛍光波長を用いて行うこと

10

20

30

40

50

ができ、40, 000 A スキャンの速度、および前後走査1.8 mmを得ることができる。眼あたりの2つのSD-OCT走査(1つは垂直であり、1つは平行)を、およそ中心窩にわたり行い、またはRPDの場合、黄斑の血管の列弓に近接して、行われる。フルオレセインの血管造影($\lambda = 488 \text{ nm}$ 、発光500~700 nm、10%のフルオレセインの色素)を、必要に応じて行う、色のついた眼底の写真を、眼底カメラ(たとえばFF 450 Visupac ZK5; Carl Zeiss Meditec AG, ドイツエーナ)を用いて得る。DNIRAの画像を、ICG色素注射前の、所定のICG励起/発光フィルターでのベースラインの画像を得ることを含み得る本明細書中に記載のプロトコルに従い、得る。最大5 mgのICG色素を、血管内に注射し、血管造影を行ってもよく、または行わなくてもよい。DNIRA画像を、所定のICG励起/発光フィルターを用いるが、ICG色素を再度注射することなく、再度得る。低蛍光(暗色)DNIRAの領域を測定し、経時的に類似の測定値と比較する。

10

【0345】

臨床予後のデータの解釈は、必要に応じて、さらなる治療の決定を通達する。例示的なデータ解析は、黄斑の立体解析および5つの線のラスターを含む。

【0346】

実施例7: 薬剤に対する眼障害の対象の応答の検出および/または予測

ラットの眼におけるマルチモードイメージングを使用して、RPEの毒素の NaIO_3 が、非滲出型AMDおよび/またはRPDの侵襲性型の患者と同様のFAFの複合パターンを誘導することが決定された。組織の組織学的検査および蛍光顕微鏡は、FAFのin vivoでのパターンが、RPEの損傷または喪失領域に動員された生来の免疫系の自己蛍光細胞の空間分布と対応することを示した。

20

【0347】

In vivoでのマルチモードおよび血管造影のイメージング: 眼底のイメージングを、市販の共焦点走査型レーザー検眼鏡(cSLO, Spectralis, Heidelberg Retinal Angiography, HRA-II; Heidelberg Engineering GmbH, Germany)、およびEye Explorer Image Capture system, version 1.1.10を使用して行った。赤色を含まない(RF、緑色優性)イメージング用の障壁フィルターを用いず、フルオレセイン血管造影では500 nmの障壁フィルターを用いて488 nmの励起波長で、ICG血管造影に関しては795/810 nmの励起/発光で、および赤外線反射イメージングでは830 nmのレーザーを用いて、画像を撮像した。488 nmのFAFを評価するために、cSLOのイメージングを、フルオレセイン色素の非存在下で行った。同時に、脈管構造を撮影し、FAF画像解析用の標識を提供することが必要な場合、ICGを、尾静脈を介して、2 mg/kgまたは5 mg/kgの用量で、あらかじめ挿入した23ゲージ尾静脈カテーテルに注射した。

30

【0348】

正常なスプラグドローラットの眼のFAFのイメージングは、RPEの蛍光を阻害する放射状に配置された網膜血管により妨げられた、かすかな均一なすりガラス状の輝きを生成し、よって暗く現れる。また、このようなイメージングは、視神経乳頭(ONH)での中心の低蛍光の円を特徴とし、ここでRPEは存在しない。 NaIO_3 (0.9%の塩化ナトリウム中で、一連の実験ごとに新たに調製される45%の溶液、45 mg/kg体重の最終濃度に注射される)、を、実験ラットに与えた。注射から3日後に、過蛍光の境界を伴う同等またはわずかに過蛍光のFAFの単一の領域が現れ、明確な島、セクター、または360°のリングの形状をとった。すべての場合、島、セクター、またはリングは、ONHに達したが、それに近接していなかった。これらおよび以下の知見は、160個にわたる眼で確認した。

40

【0349】

NaIO_3 の注射からおおよそ4~5日後から始まり、過蛍光/低蛍光が交互のFAFの顕著な網状または曲線のパターンが、島、セクター、またはリング内に現れた。7日目ま

50

で、このパターンは顕著になり、数週間発生続け、この曲線の構成要素は、F A Fの部分的なループ、長円、円、ロゼット、および貝殻状、または「動物の足跡」のパターンに起因する。20週間経過した後でさえ、最後の時点を解析すると、境界は過蛍光の網状のパターンを保持しており、網膜周辺部に向けてわずかに進行し続けていた。

【0350】

動物のサブセットで行ったフルオレセインの血管造影から、網状パターンが、網膜または脈絡膜の脈管構造と対応しないことが確認されたが、I C Gの血管造影は、F A Fの島、セクター、またはリングの出現と空間的かつ一時的に一致する、N a I O₃からおよそ2〜3日後に、R P EおよびB Mを通して脈絡網膜性界面で起こった透過性の変化を明らかにした。この透過性の増加は一過性であり、7日目までに分解し、次の時点を定例的に評価した。網膜の血管は漏出してはいない。パラフィンを埋め込んだ組織のヘモトキシン (Hemotoxylin) およびエオシン (H&E) の組織学的検査、ならびに免疫組織化学検査 (IHC) (当業者に既知、たとえばDavidson's fixative and paraffin-embedded sections, viewed with a Nikon Upright E800 Microscopeでの固定の後に行われる) により、流体が網膜下腔に集積したことを確認した。またこれは、in vivoでの超高解像度OCTによっても観察された (高解像度160nmスペクトル領域のOCT画像を、Envisu R2200 VHR Animal SDOIS System, Bioptogen, USAを使用して得た; 走査を、網膜のレベルで約2.8μmの方位分解能、36,000/秒の速度で得た)。

【0351】

摘出した網膜およびR P Eの自己蛍光および免疫蛍光の解析: in vivoで観察されたF A Fパターンの病理学的な相関を決定するために、摘出した網膜全載を、白色下、および488nmの落射蛍光顕微鏡により、低倍率で観察し、同一の波長を、in vivoでのイメージングのために、蛍光IHC標識を用いることなく使用した。その後の組織解析に応じて、この目的のために2つの顕微鏡を使用した: 狭い励起/発光ウインドウ (488/520nm) を伴う落射蛍光装置、ならびに水銀ランプおよび450~490nmのバンドで励起後515nm超からの蛍光を提供するロングパス (バンドパスではない) フィルターを備える共焦点顕微鏡のInverted Leica DM IRE2 viewing system。白色光下で、正常なラットの網膜は、全体的に等しく均質であり、一部の人工物に変形している。対照的に、微細なオフホワイトの、わずかな網状のパターンが、N a I O₃注射から7日後に得た試料で明らかとなった。14日目までに、このパターンはより明確になり、網膜の切り目に最も良好に例示される小さな網膜外部のひだと対応するように観察された。488nmの蛍光下で見ると、この同一の曲線パターンは明らかであった。より高倍率の落射蛍光顕微鏡を使用すると、このレース状の曲線のパターンは、網膜外部の溝またはひだと一致するように見える自己蛍光細胞の空間分布と一致することが示された。

【0352】

F A Fの網状パターンと一致する自己蛍光細胞の同定を決定するために、摘出した網膜を、488nmチャンネルを回避する最初の免疫系のマーカーで染色した。I b a lは、汎微生物性/マクロファージのマーカーであり、ラットの網膜では、これに対する抗体は、主要な食細胞の集合を同定する。このマーカーを使用して、I b a l⁺細胞が、全載網膜、で正面、すなわちZ平面で見える場合に、レース状の曲線パターンで配置されていることを見出した。さらに、光受容体の核染色と比較する場合、この曲線パターンは、変形したONLのひだの間で挿入されたままであるように見られた。このI b a l⁺細胞のパターンは、F A Fイメージングによりin vivoで観察された過蛍光のパターンと対応し、摘出した網膜の自己蛍光細胞のパターンと対応する。in vivoでのF A FおよびI b a l⁺染色の対応するパターンは、N a I O₃注射から7日後および12日後の両方で観察された。重要なことに、N a I O₃から7日後に、すべてのR P E細胞は、後部眼杯 (posterior eye cup) に存在しておらず、これらの細胞は、観察さ

れたF A Fの原因とすることができないことが確認された。また、食作用としての自己蛍光細胞の同定は、単球／マクロファージの欠失が行われていない調製物に対するイメージングの比較により、確認した。このような欠失は、塩化ガドリニウム（G A D）での処置により達成した。G A Dでの処置の後、はるかに少ない、良好に画定されたF A Fの網状のパターンが観察され、これは境界の区分けの減少を含むものであった。

【0353】

このような食細胞の同定は、非滲出型A M Dおよび／またはR P Dを表し、薬剤への対象の応答を予測するものである。特に、このような食細胞の観察は、薬剤での処置に対象が応答しない可能性を高くする。

【0354】

非疾患状態と比較して、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通して透過性の一過性の増加の同定は、非滲出型A M Dおよび／またはR P Dを表し、薬剤に対する対象の応答を予測するものである。特に、非疾患状態と比較した、脈絡膜と網膜との間の対象の上皮性関門を通した透過性の一過性の増加の知見は、薬剤での処置に対象が応答しない可能性を高くする。

【0355】

摘出した網膜およびR P Eの遅延性の近赤外線解析（D N I R A）：同様に、正常な眼と比較して異常な特徴の同定は、遅延性の近赤外線解析（D N I R A）で行われる。I C G血管造影の設定、すなわち励起／発光フィルターを含むが、血管造影から24時間後、48時間後、3日後、7日後、21日後、または28日後に色素を再度注射することのないI C G血管造影の設定を使用して、I C G注射などの色素注射から数日および数週間後に、D N I R A画像を得る。血管造影は、試験時間の間再度行うものではない。

【0356】

毒素の投与では、N a I O₃（S i g m a, c a t #424064）などの毒素を、45mg／kg体重の用量で23Gカテーテルを介して全身に注射する。0.35mg／kgでのI C G血管造影を、N a I O₃注射の直前に行う。D N I R Aを、I C GおよびN a I O₃注射から7日後に行う。

【0357】

実施例8：全身性I C G投与後のラットの眼のD N I R Aは、i n v i v oで免疫細胞を標識する。

i n v i v oで観察されたF A Fパターンの病理学的な相関を決定するために、摘出した網膜の全載を、白色光により、蛍光性I H C標識を用いることなく、488nm-i n v i v oでのイメージングで使用した同一の波長の落射蛍光顕微鏡により、低倍率で見た。その後の組織解析に応じて、この目的のために2つの顕微鏡を使用した：狭い励起／発光ウィンドウ（488／520nm）を備える落射蛍光装置、ならびに水銀ランプおよび450～490nmのバンドで励起した後に515nm超の蛍光を提供するロングパス（バンドパスではない）フィルターを備える共焦点顕微鏡のI n v e r t e d L e i c a D M I R E 2 v i e w i n g s y s t e m。白色光下で、正常なラットの網膜は、全体的にかなり均質であり、一部の人工物が変形している（図3A）。対照的に、かすかなオフホワイトの微細な網状のパターンは、N a I O₃注射から7日後に得た試料で明らかとなった。14日目までに、このパターンは、より明確になり、網膜の切り目に良好に現れた小さな網膜外部のひだと対応するように観察された（図3B）。488nmの蛍光下で見ると、この同一の曲線パターンは明らかであった。注射から7日目までに明確になると、自己蛍光の増加は、このパターンを14日目までにより可視化させた（図3C）。高倍率の落射蛍光顕微鏡を使用して、本出願人は、このレース状の曲線パターンが、網膜外部の溝またはひだと一致するように見える自己蛍光細胞の空間分布と一致することを示した（図3D）。

【0358】

理論による限定を望むものではないが、このことは、観察されるF A Fのi n v i v oでのパターンが、網膜外部の自己蛍光細胞の分布と対応することを示唆する。これは、

10

20

30

40

50

異常な R P E に臨床的に関連する F A F のパターンに属する広く行われている理論と対比しており、R P E が、本出願人が使用した単離した網膜の試料には存在していないことに留意されたい。理論による限定を望むものではないが、このことはまた、このモデルで観察される F A F の 2 次元のパターンが、網膜外部の 3 次元曲線のひだ内に限定された自己蛍光細胞の分布と対応することを示唆している。

【0359】

よって、網膜外部構造の空間的および一時的な変化、ならびに自己蛍光細胞の種類の同定を、調査した。

【0360】

神経網膜層の性質により、本出願人は、網膜外部の変形が、正常に平坦な顆粒層 (O N L)、高密度に配置された光受容体の核の層の立体構造的な変化を観察することにより、容易に評価できると考えた。よって、新たに摘出した網膜全載の自己蛍光解析の直後に、核の染色を行い、組織を、非 488 チャンネルの落射蛍光または共焦点顕微鏡により評価した。また、断面を、眼全体の H & E により評価した。

【0361】

N a I O₃ の投与前のベースラインで、核染色 T o p r o 3 を使用した共焦点顕微鏡は、O N L が平坦であり、血管染色を欠いていることを確認した (図 4 C)。N a I O₃ 投与から 3 日後に、わずかな曲線状の O N L の溝、同時に場合によっては浅く線状のひだが認められた。7 日目までに、O N L の変形はより顕著となり、明確に相互接続した一連の溝を産生した。14 日目までに、これらの変化はより複雑となり、大きさが大きくなった。

【0362】

共焦点顕微鏡を使用して得た画像に対して 90°での網膜の断面の H & E の組織検査は、N a I O₃ 誘導型の R P E の毒性が、網膜下の流体の増大を随伴する O N L の小さな凹凸を最初にもたらし、光受容体はほとんど喪失しないことを示した (図 4 B)。後に、O N L のくぼみが、ブルッフ膜 (B M)、R P E の基底膜に対して並置しているより大きな大きさのひだを形成した。結果的に、これらのくぼみの側部の拡大が、多くの網膜内層が B M に対して並置するように、大きな網膜外部変性の近接領域をもたらした。

【0363】

F A F の網状のパターンと一致する自己蛍光細胞の同定を決定するために、免疫系のマーカーで摘出した網膜を染色し、488 nm チャンネルを回避した。I b a 1 は、汎微生物 / マクロファージのマーカーであり、ラットの網膜にあり、これに対する抗体は、主要な食作用の細胞集合を同定する。このマーカーを使用して、I b a 1⁺ 細胞は、網膜全載で正面、すなわち Z 平面から見た場合にレース状の曲線パターンに配置されている (図 5 A ~ H)。さらに、光受容体核染色と比較すると、この曲線パターンは、変形した O N L のひだの間で挿入されていることが観察された。図 5 A ~ H に示されるように、この I b a 1⁺ 細胞のパターンは、F A F イメージングにより i n v i v o で観察された過蛍光のパターンと対応し (図 1 A ~ D および 2 A ~ D)、摘出した網膜の自己蛍光細胞のパターンと対応する (図 3 A ~ C)。i n v i v o での F A F および I b a 1⁺ 染色の対応するパターンは、N a I O₃ 注射から 7 日後および 12 週間後に示される (図 5 A および 5 B)。N a I O₃ 投与から 7 日後までに、すべての R P E 細胞は、後部眼杯 (p o s t e r i o r e y e c u p) に存在しておらず、これらの細胞が、観察された F A F の原因ではないことが確認された (図 5 C および 5 D)。

【0364】

次に、I b a 1⁺ 細胞と網膜外部との間の 3 次元 (3 D) の関係を、内部網状層 (I N L) から外部網状層 (O P L) を介して、内部、中間、および外部の O N L に、段階的に移動する網膜全載の正面の (すなわち z 軸) 連続的な共焦点顕微鏡により、評価した。共焦点画像の小さな積み重ね (セグメント) を、これら 3 つのステップで投影 (平坦化) した (図 6 A ~ D)。単球系の活性化した C D 68⁺ マクロファージの同時分布もまた評価した。

【0365】

NaIO₃の投与前のベースラインで、Iba1⁺細胞は、IPLのみで見られた。CD68⁺細胞を同定した(図6A)。NaIO₃投与から3~4日後に、Iba1⁺細胞数が増加し、IPLおよび外部ONLを含む網膜外部にわたっても増加した(図6B)。NaIO₃投与から2週間後に、Iba1⁺およびCD68⁺細胞の複合的な分布が、ONLの曲線のひだの間で組み合わさって観察された。さらに、良好に画定された、光受容体の核の光学的に区分けされた異所性の円または長円が、OPL、血管の中央網膜層のかなり内部で観察され、これにより、対照的に、2つの正常な別々の組織の区画である、変形した光受容体の顆粒層および血管層をもたらした。中央のONLでは、変形した顆粒層の長円状の断面は、より曲線または魚型となり、大きなIba1⁺およびCD68⁺細胞は、中心の空隙内で見いだされた。最外部の三番目のONLはでは、光学的な断面図は曲線のままであり、多くの架橋しているセグメントとかなり近接していた。網膜下腔は、通常単なる潜在的な空間であり、網膜外部の変形により拡大し、ブルッフ膜のすぐ内部(喪失した光受容体外部セグメントが正常に残っている空間)で、Iba1⁺および/またはCD68⁺炎症細胞および光受容体をまとめて示す。

10

【0366】

摘出した網膜全載の共焦点走査顕微鏡および三次元の再構成を行った(図7A)。これらのデータは、Iba1⁺細胞が、光受容体の核の間で挿入されている網状またはレース状のパターンを形成したことを示した。さらに、同一の3つの平面に分割されたZ-stackの投影(図7B、右側)は、内部のONLが、ONLの円形または長円状の断面図を特徴とすることを示した。対照的に、中央のONLは、顆粒層のループした曲線状の断面を特徴とし、外部のONLは、複数の架橋する要素を備えるより大きな曲線のセグメントから形成されている。これらの層の斜めの容積測定のプロジェクションは、基部に単一の近接するひだから伸びるいくつかの円錐体のピークを伴う、結果として生じるONLの偽長円の構成(pseudo-eggcrate configuration)を容易に表す(図7B中央および右側)。理論による限定を望むものではないが、これらのデータは、炎症細胞の大部分がONLのくぼみの中または間に局在していないが、拡大した網膜下腔のONLピーク下(すなわちONL外部)で見いだされることを示す。

20

【0367】

理論による限定を望むものではないが、これらの知見は、変形した網膜外部下の自己蛍光炎症細胞の3次元の分布が、これら動物におけるin vivoでのFAFイメージングの2Dパターンを考慮することを示す。

30

【0368】

In vivoでの変化およびFAFの知見と摘出した組織で作成したこれらの知見を相関させるために、in vivoでの高解像度OCTを使用して、生存する網膜の3D容積測定解析を行った。HR-OCTは、眼球除去後の組織標本でのみ以前に観察された、非侵襲性のin vivoでの網膜の断面を提供する。OCTのイメージングは、異なる光学密度の層の間の界面で作成されたシグナルに依存しており、正常なラットの網膜では、複数の層状の構造を確認した。網膜の3つの主要な最外層のOCTの境界は、内から外に向かって、外部限定膜(ELM)、光受容体の内部および外部の接合(IS/OS)、ならびにRPE/BMである(図8A、左)。診療所およびこれら任意の研究の両方における標準的な技術は、ONLを含む顆粒層を暗く(すなわち単一の空隙として)設定した。

40

【0369】

NaIO₃の投与後に、OCTを使用して撮像した生存する網膜の再構成した正面の画像は、視神経後部の領域に限定されているわずかな変化を示した(図8A、中央)。ベースラインおよび上部網膜に対する比較(NaIO₃投与から3日後に肉眼で正常に見える)(図8A、中央)を行い、網膜下部の光学断面は、明るい(超エコー性)の浅い隆起が可視化されるように、光受容体のIS/OS接合およびELMのわずかな変形を示した(図8A、右)。このシグナルは、ONLの外部およびBMの内部で見いだされた。このR

50

P Eを表すかすかに暗い線は、もはや存在しなかった。14日目までに、これらの隆起は、基部がBM上に見える明確な三角形またはピラミッドを形成する一部の、明確なピークに成熟した(図8Bおよび8C)。他の隆起は、E L Mから、光受容体層を介して中央網膜に達するように伸びる明確に狭いスパイクを形成した。ヒトのR P D患者由来の臨床O C Tの画像は、この疾患の特徴である錐体の網膜下の沈着物を示す(図8D)。

【0370】

R P Dを特徴づける、本システムで見られる明るい隆起、三角形、およびスパイクが、網膜下腔の体積一輝度の投影(V I P)で観察された自己蛍光食細胞の分布と対応するかどうかを試験するために、網膜下腔の体積一輝度の投影(V I P)を使用した。これらは、z軸およびy軸で再構成できるi n v i v oでの生存組織の3次元ブロックを評価する手段を提供するために、O C Tで作成した光学的なセクションから構成されるものであった。

10

【0371】

y軸において隣接するO C T画像の再構成物は、並んで配置された隆起または三角形が、円、長円、暈状、および標的様病変などの複合的な構造に寄与することを示した。図9Aの例では、2つの網膜下の隆起が、円の「側部」を形成し、上部および後部の態様とともに近接して、中央では最大限離れている。単一の隆起、ピラミッド、およびスパイクは、より単純な曲線構造に寄与している。

【0372】

この知見をさらに裏付けるために、z軸のV I P(すなわち、内部O N L～外部O N Lまでの短い段階的なセグメント)を次に解析した(図9B)。内部O N Lを介したV I Pは、網膜全体にわたり規則的に離れている、一連の点状のスポットを示した。中央O N L由来のV I Pは、より少なく、規則的に離間した魚型または曲線の短い線を示し、このうちの一部は架橋している。外部O N L由来のV I Pは、多くの架橋している要素を伴う近接した曲線セグメントを示した。これらの知見は、摘出した網膜全載から作成した3Dデータと直接対応する(図6A～D)。

20

【0373】

さらに、過蛍光F A Fまたは異常なF A Fパターン、および過蛍光D N I R Aが、食細胞の分布と相関または同時に局在したことを確認するために、循環するマクロファージ/単球の集合を、塩化ガドリニウム(G A DまたはG d C l₃)、マクロファージの活性を抑圧する希土類金属塩を使用して欠失させた。免疫細胞のG A Dの欠失は、N a I O₃誘導型のF A FおよびD N I R Aのパターンの明確な変化をもたらした。単球/マクロファージの集合のG A Dの欠失は、N a I O₃誘導型F A Fパターンの明確な変化をもたらした。このことは、損傷の地図状領域およびその境界内の両方で定性的に明らかであった(図8A～C)。

30

【0374】

さらに、反復して行われたD N I R A、パルスD N I R Aと本出願人が名付けた方法により、経時的に移動するように見えるD N I R Aにおける小さな過蛍光のドットを同定する(図32)。D N I R Aでも標識できるR P E細胞は、移動するものではない。上記の過蛍光との同時局在に加えて、これは、マクロファージが同時局在しており、疾患の進行に起因することを示唆するものである。

40

【0375】

実施例9：R P Dおよびびまん性一しずく型(d i f f u s e t r i c k l i n g)AMDの臨床的なi n v i v oでのイメージング

図10A～Cで、N a I O₃モデルにおける組織の知見に対するR P Eの臨床的な特徴を直接比較する画像および解釈上の表を提供する。ヒトのR P D患者(網膜下腔にベースダウンした錐体構造を示す、図8D)の臨床的なO C Tイメージングに加えて、色付きおよび赤色を含まない眼底の画像をも得た(図10A～C)。赤色を含まない画像は、R P Dの個々の偽ドルーゼンを構成する小さな暗いスポットを示した(図10A、上部画像)。これらは、暗灰色のオーバーレイを使用して同定した。さらにこのことは、R P Dを特

50

徴づけるいわゆる「標的病変」の存在を、円により限定して強調する。これらは、明るい中心を備える暗いスポットとして現れる。並行して、折りたたまれたラットの網膜外部の略式的な表示を提示し、似せの色付けをし、黒および白色の画像（両方が「陽性」および「陰性」）として提示される正面および断面は、標的およびR P D量と直接関連する。

【0376】

これらのデータは、暗い中心を伴う、レース状または網状のパターンの円、量状、および標的病変内の暗い偽ドルーゼンの2 Dパターンが、2 Dの正面で見られ、3 Dで容積測定が考慮されるリングおよびクレーターの増加と対応することを示す。

【0377】

実施例10：ビンダリットの治療効果

10

この実施例は、特に、ビンダリットが、非滲出性（dry）AMDおよびR P Dのモデルにおける毒素誘導型の損傷から、網膜およびR P Eを保護し、ビンダリットが、地図状萎縮（GA）としての、網膜色素上皮（R P E）および光受容体の喪失のパッチの発症に効果があることを示す。

【0378】

動物を、眼の研究における人道的な動物の使用に関するAssociation for Research in Vision and Ophthalmology（ARVO）ガイドラインに従い、およびCanadian Council on Animal Care guidelinesに従って扱った。ケタミン（100mg/kg）およびキシラジン（10mg/kg）の組み合わせで動物に麻酔をかけ、0.8%のトロピカミドを含む5%のフェニレフリン塩酸塩溶液（ジオフェニルT， Sandoz Canada Inc）一滴を用いて瞳孔を拡大させた。GenTealの潤滑用点眼薬（Novartis， Canada）を、すべての手順の間角膜の表面に反復して使用した。

20

【0379】

in vivoでの画像を、市販の共焦点走査型レーザー検眼鏡（cSLO）（Heidelberg Retinal Angiography， HRA-2， Heidelberg Engineering， Germany）を使用して得た。画像を、赤色を含まないFAF（488/500nm 励起/発光）、IR反射率チャンネル（830nm）、およびICG蛍光チャンネル（795/810nm励起/発光）で得た。動物を、cSLOを使用してあらかじめスクリーニングし、自然発症した欠陥のあるものを試験から排除した。すべてのin vivoでのイメージングの間、角膜の表面を、一般的な潤滑点眼薬（Alcon， Mississauga， Canada）を反復して使用して湿潤させたままにした。視神経乳頭（ONH）で開始し、可能な限り中央および遠位の周辺まで同心リングで移動した各眼の複数の画像を撮影した。場合によっては、小さな瞳孔とcSLOを合わせることが困難であるため、半網膜のみで近接した画像を得た。ここでは、第2の半分のその後のイメージングのため動物の再配置を伴う。眼底の複合した画像を、その後、パワーポイントでまとめ、解析のためエクスポートした。

30

【0380】

血管造影：ICG色素（Cardiogreen， Sigma）を、無菌水中最終濃度5.0mg/mlに、実験前に新たに調製した。24ゲージカテーテルを尾静脈に挿入し、ICG色素を、0.35、または5.0mg/kgの用量で注入した。注射前（ベースライン）、色素循環の間、および注射から最大20分後までの様々な間隔で、画像を撮影した。

40

【0381】

遅延性の近赤外線解析（DNIRA）：DNIRAの画像を、ICGの血管造影の設定であって、所定の励起/発光フィルターを伴うが、0日目後の色素の再注入を行うことのない、ICGの血管造影を使用して、ICG注射から数日後および数週間後に得た。血管造影から2～120日後に画像を撮影した。

【0382】

50

F A F 画像の定量化：複合的な画像をグループわけし、盲検観察者による解析のため、Image J (National Institutes of Health) にインポートした。異なる用量の毒素で異なる画像から決定された損傷パッチの大きさ間の比較は、参照として中心の（視神経乳頭）c S L O の画像を使用して画像の大きさを正規化することにより、達成された。眼底画像間の大きさが、ラット間で有意に変動しなかったとの仮定を作製した。異常なF A F シグナルを伴う領域は、「ポリゴン」トレーシングツールを使用して盲検リーダーにより手動で輪郭を描き、対象の領域を画素で測定した。用量応答解析では、パッチの大きさを、 45 mg/kg の NaIO_3 （100 単位の値が割り当てられている）からのパッチの平均値と比較した。

【0383】

10

網膜電図検査（ERG）：高用量（ 5.0 mg/kg ）および低用量（ 0.35 mg/kg ）の用量の I C G または対照の生理食塩水の投与の後に Espion (Diagnosys LLC, USA) mini-Ganzfeld system を使用して動物において、明るいフラッシュ ERG 応答を評価した。麻酔をかけた後、動物を、電氣的に静止した加熱パッド上に置き、GenTeal の潤滑点眼薬を使用した後角膜の端に金色のコイルの電極を配置した。短期間の薄暗いフラッシュ（ 0.01 カンデラ s/m^2 、 1.0 Hz ）の後、明順応の b 波の応答を、最大値に近い b 波の振幅を本出願人があらかじめ決定した単一の明るいフラッシュ（ 3 カンデラ s/m^2 ）を使用して評価した。

【0384】

20

ヨウ素酸ナトリウム：R P E の毒素のヨウ素酸ナトリウム（ NaIO_3 、Sigma）を、生理食塩水中 45 mg/ml の原液の溶液で毎週新たに調製した。この溶液を、 5 mg/ml 、 15 mg/ml 、 30 mg/ml 、および 45 mg/ml の最終濃度に希釈し、これによりすべての動物に、 $5\text{ mg/kg} \sim 45\text{ mg/kg}$ の最終用量を達成するために同一の量が投与された。 NaIO_3 を、尾静脈に挿入した 24 ゲージカテーテルを介して、全身的に注射した。I C G 注射（ 0.35 mg/kg ）および血管造影を、 NaIO_3 注射の直前の 0 日目に行った。ビンダリットの効果を試験するために、標準化した用量を使用した。

【0385】

30

ビンダリットの眼内注射：ビンダリットの硝子体内注射を、Hamilton syringe (Cat # 7634-01, Hamilton Company, Reno, USA) を備えた解剖顕微鏡（SMZ800; Nikon Instruments, 米国メルビル）下で行った。小さな切込みを、斜めに切った 33 ゲージニードル（BD, Mississauga, Canada）を使用して角膜輪部の後ろに作製した。次に、30 ゲージの平坦な針を、瞳孔軸に対して約 45° の角度で挿入した。 $2\text{ }\mu\text{l}$ のビンダリット溶液または対照溶液（生理食塩水）を手動で注射した。

【0386】

自己蛍光顕微鏡：新たに摘出した眼の全載の試料、網膜または網膜を欠いた後部眼杯を、 $488\text{ nm} / 512\text{ nm}$ の波長を伴う落射蛍光顕微鏡を使用して評価した。

【0387】

40

免疫蛍光顕微鏡：免疫組織化学的検査を、標準的なプロコルを使用して行った。簡潔に述べると、細胞を 4 % の P F A / P B S を用いて 15 分間固定し、T B S 中 1.25 % の B S A を用いて、室温で 30 分間ブロッキングした。一次のウサギ抗 Z O - 1 を、1.25 % の B S A / T B S 中 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ で使用して、室温で 1 時間インキュベートした。細胞を T B S で洗浄し、ヤギの抗ウサギ 488 (Invitrogen) $5.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ とともに、室温で 1 時間インキュベートし、洗浄し、T o - P r o - 3 (Invitrogen) で、室温で 20 分間染色した。一部の R P E 単層を、 647 nm の共役ファロイジン (Invitrogen) で対比染色し、S y t o x g r e e n n u c l e a r s t a i n (Invitrogen) で対比染色した。スライドを、蛍光搭載媒体 (Dako) とともに取り付け、画像を、Leica TCS SL 共焦点蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems, GmbH, ドイツヴェッツラー) を使用

50

し、Leica Confocal Software V 2.61を用いて得た。

【0388】

ビンダリットでの治療は、地図状萎縮（GA）として知られている非滲出型AMDおよびRPDの末期失明性合併症に対して二次的な予防を提供する。二次的な予防の目的は、喪失前に中心視力および中心視野を維持することである。

【0389】

AMDの患者は、「非滲出型」から始まり、ドルーゼンとして知られている黄斑における小さな沈着物を有する。疾患の末期では、患者の網膜外部およびRPEのパッチ状の喪失を特徴とする進行型の疾患に転換する。ここでは、ビンダリットが、末期疾患に進行するのを予防または遅らせることができること、すなわち、GAの二次的な予防を、本発明の動物モデルにおいて示している。図16A～Fは、ビンダリット（TMi-018）が、ラットの眼におけるRPEの喪失のパッチの大きさを減少することを示す。さらに図16A～Fは、眼底自発蛍光（FAF）を使用して経時的に評価される場合、硝子体内のビンダリットが、過蛍光FAFの複合的なパターンの発症を低減することを示す。図17A～Bは、ビンダリットが、用量依存的に網膜の機能（電気生理学的な機能）を保護し、最小限の有効な用量を示すことを示す。図18A～Cは、ビンダリットが、組織の損傷、RPEの喪失、および網膜外部の破壊に有効であることを示す。

【0390】

図19A～Jは、ビンダリットが、単球走化性タンパク質（MCP）-1の発現を低減し、M1マクロファージの応答、M2を選択して均衡を傾けることを低減することを示す。特にこのデータは、とりわけ、硝子体内ビンダリット後の網膜下腔におけるMCP-1タンパク質の発現の用量依存的な低減を示す（たとえば図19D参照）。また、このデータは、RPEに対する毒素誘導型の損傷の間、眼疾患（たとえば非滲出型AMDおよび／またはRPD）のモデルの遺伝子発現は、M1分極化に向けてシフトすることを示す。また、M1のmRNAの発現の相対的な減少およびM2発現レベルの増加を伴い、遺伝子発現は中立に戻る。理論による限定を望むものではないが、これらのデータは、ビンダリットが、「炎症に関連する」転写を低減するよう特異的に作用することを示唆する。

【0391】

ビンダリットがパッチの発症に有効なだけでなく、既存のGAの増殖（拡大）をも低減することができる。ビンダリットでの治療は、RPEのこれら増殖および網膜外部の喪失のパッチを減少することにより、既存の地図状萎縮（GA）、非滲出型AMDの末期の失明性合併症を治療する。このような治療の目的は、患者が視野の中心で観察する「失明性のスポット」の大きさを減少することである。図20Aは、既存のパッチの陰性対照（生理食塩水）の治療を示し、このパッチは拡大し、図20Bは、既存のパッチのビンダリットの治療を示し、このパッチは拡大しない。

【0392】

実施例11：ビンダリットのRPEの保護および補体の調節

MCP-1は、RPEにより発現すると報告されており、M1マクロファージを活性化する有力な危険関連分子タンパク質（Danger Associate Molecular Protein（DAMP））である。この例は、特に、マクロファージの活性と無関係なRPE細胞におけるMCP-1発現に直接ビンダリットが影響できるかどうかを試験する。in vitroで、不死化したテロメラゼ陰性ヒトRPE細胞株（hTERT-RPE1）を使用して、ビンダリットが、これらの細胞に直接影響し、MCP-1のmRNAおよびM1の転写をダウンレギュレートすることが示されている（図21）。免疫細胞化学は、MCP-1およびK κ Bタンパク質のダウンレギュレーションを示した（図21）。さらに、NaIO₃で試験する場合、ビンダリットは、hTERT-RPEの細胞の生存性を保護し、理論による限定を望むものではないが、非滲出型AMDの治療における潜在的な有効性と非常に関連した第2の予測されていない作用機構を示唆している（図21）。ビンダリットは、マクロファージの分極化における影響を介して直接的に、かつ局所応答を開始するRPEシグナリングのレベルを低減することにより間接

的に、生来の免疫応答を調節する可能性を有することが明らかである。

【0393】

図21は、パネルAおよびBにおいて、hTERT細胞が、RPE識別のマーカーを発現するために限定されていることを示す。パネルCでは、TMi-018が、ヒトのRPE (hTERT) において、Nfkbの発現を低減し、MCP-1を低減することが示されている。パネルDは、TMi-018が、毒素試験に対してRPEの生存を上げることが示す。

【0394】

さらに、ビンダリットは、優れた併用剤であると本明細書中に示されている。図22は、補体のカスケード成分のmRNA種が、毒素誘導型のRPE損傷後に変化することを示し、ビンダリットが補体の遺伝子発現を変化させることを示す。試験した遺伝子は、C1qb、C1qt nf5、C2、C3、C4b、C5、C6、C7、C8a、C9、Cfb、Cfd、Cfh、およびCfiを含む。

【0395】

加齢黄斑変性は、生来の免疫の機能不全に関連しており、有望な治療がこれらの経路を標的としている。AMDの発症のリスクを最も示す多型は、補体H因子 (CFH) であり、これは、代替的な補体カスケードの成分である。Cfhは、補体の陰性調節物質であり、その不存在は、応答の加速をもたらす。ダウンストリームのメンバーはC5およびC3を含み、その両方は、臨床試験ではうまく標的化されていない。しかしながら補体D因子 (CFD) 阻害剤、ランパリズマブを用いた、近年の有望なフェーズIIの試験は、CFDの阻害が、18か月間にわたり地図状萎縮の増殖、すなわち拡大を遅らせることができることを示唆している。この効果は、補体H因子およびI因子の多型と併用した患者で最も強力であった。ここで、変化は、NaIO₃投与後に経時的な補体の応答で起こることが示される。ベースラインに対対して正規化して (毒素前)、多くの補体遺伝子のmRNAレベルが、2または3倍超、増加または減少することが観察される (図22)。主な変化は、C1、C3、C5、およびC9で同定されており、特に、CFHおよびCFIは、両方とも減少する。後者の知見は、CFD阻害剤のランパリズマブが、これら遺伝子の多型を有す患者で最も有効であったとの知見と相関し得る。CFDのmRNAは、大部分の経時変化にわたり3倍未満とあまり変化しなかった。

【0396】

次に、これら遺伝子に及ぼすビンダリットの効果を調査した。ビンダリットは、複数の補体の遺伝子のmRNAを用量依存的にアップレギュレートまたはダウンレギュレートした。

【0397】

よって、ビンダリットは、mRNAの応答を大きく変え、補体系の調節物質と相乗的に作用する。

【0398】

実施例12：DNIRAでの薬剤の効果および／または疾患の進行の臨床評価

この実施例は、特に、DNIRAが、眼障害の診断方法または予後診断方法として有用であることを示す。たとえば、このデータは、DNIRAが、1つもしくは複数の眼障害に対する薬剤の治療上の有効性のためのバイオマーカー、および／または1つもしくは複数の眼障害の発症のための診断、および／または1つもしくは複数の眼障害の進行の診断として有用であることを示す。重要なことに、このデータは眼障害に罹患したヒト対象における知見を提示する。

【0399】

DNIRAは、診断、疾患の進行、および治療応答用の新規かつ以前には記されていないバイオマーカーである。この使用、定性的な記載、および定量化は、これらの目的に重要な用途を提供する。

【0400】

現在ICG血管造影を行うために使用される器具は、たとえば眼 (網膜および脈絡膜)

10

20

30

40

50

の血管を介して通過するような色素のリアルタイムのイメージングを必要とする。このように、イメージングは、概して、腕または手の静脈中の色素の注射の数秒および数分前に開始し、概してその後10～30分間継続する。末期の血管造影は、概して最大45分後まで行われる。よって画像は、移行期（色素が血管を通過する際）および再循環段階（血管から組織へと漏出する際）に得られる。よって、ICG色素をイメージングするために必要とされる装置は、フィルム、ビデオ、またはより近年ではデジタルの血管造影の形態で、一連の画像を独自に撮像しなければならない。これらのシステムは高価であり、継続したイメージングを必要とする。代わりに、この実施例は、血管造影のイメージングを使用することなく、ICG励起／発光フィルターの使用を提供する。ベースラインのDNIRA画像是、ICG色素の全身性注射の前に、所定のICGex/emフィルターを用いて得る。注射から数日後および数週間後に、個体の画像を得る。血管造影を用いないICGフィルターの使用は、以前に記されていないかった。

10

【0401】

臨床疾患に対するDNIRAの使用を、本明細書中に示す。簡潔にまとめると、すべての手法は、St Michael's Hospital Research Ethics Boardにより承認されており、ヒトの対象の臨床試験に関してGood Clinical Practice (GCP) and the Declaration of Helsinkiを遵守するものである。手法の性質および潜在的な結果を完全に説明し、インフォームドコンセントを行った後、非滲出型のAMDと臨床的に診断された患者を試験に動員した。ベースライン検査は、色素を注入しない所定のICG励起／発光フィルターでのFAFおよびNIRイメージングを含むcSLOイメージングに加えて、メガネ矯正視力、スリットランプ顕微鏡での眼の検査、および眼底検査を含むものであった。その後、血管造影を1週間に1回未満で行い、同時に、単回用量のICG色素（Cardio green, 25mg/5ml）およびフルオレセインナトリウムを投与した。FAFおよびDNIRAのイメージングを、7日後に2回行い、この手順の間は、最短で2日、最大で4日であった。

20

【0402】

DNIRAを、ICGの血管造影と比較した。中心シグナル（ほとんど検出できない）の重なっている阻害以外のわずかな異常を、ICGの血管造影で観察する（図23）。これは、DNIRAとは全く対照的に、中心の黄斑で顕著な過蛍光領域である（図24）。さらに、ヒョウ柄様のパターンが、現在までのいずれかのイメージング技術により同定されていない黄斑周辺で観察される。さらに、DNIRAを、これらの技術よりも優れているFAFおよび近赤外線（IR）と比較する（図25）。図25の左（IR）および中心（FAF）のパネルで示されている患者と同一の患者のDNIRAの画像是、顕著に対比している。たとえば、DNIRAのみが、画像の中心に明確な過蛍光（暗色）の領域を明らかにしている。より小さなパッチが、中心の病変の周辺および視神経乳頭に近接して認められる。さらに、同一の患者の複合的な画像是、他のイメージング方式で見られず、以前に記載されていない過蛍光および低蛍光が交互のDNIRAのレース状、網状、またはヒョウ柄様のパターンを示す（図26）。比較して、RPE損傷を有すると知られていない同年齢の非AMD患者は、このような過蛍光および低蛍光が交互のDNIRAのレース状、網状、またはヒョウ柄様のパターンを示すものではない（データ不図示）。

30

40

【0403】

FAFとの類似により、脈絡網膜性損傷の領域は、低蛍光（暗色、黒色、または不存在）のシグナルとして見られる。このような領域は、正常または過蛍光の背景の間との純粋なコントラストにより、容易に定量化されている。低蛍光FAFの定量化のためのアルゴリズムは、現在市販のイメージング装置（たとえば共焦点走査型レーザー検眼鏡システムまたは改変された眼底カメラ）に備わっている。低蛍光FAFの定量化は、現在、試験対象算入基準および結果判定法の両方としての臨床試験のデザインに組み込まれている。たとえば、Mahallo検定（Genetech）は、患者が、試験に入るために低蛍光FAFの領域の大きさの最小値および最大値を有することを必要とする。この領域の大きさ

50

は、試験の最中に反復して測定され、増殖、すなわち拡大速度を、治療群の間で比較する。この例は、DNIRAが、現在のイメージング方法では見られなかった低蛍光の領域を明確にすることを示す。よって、特に、DNIRAを使用して、試験の動員に適した患者の同定を改善し、疾患の進行を評価することができる。

【0404】

さらに、経時的に一人の患者を解析することにより、本明細書中、DNIRAの画像が経時的に変化することが示されている。このことは、低蛍光または過蛍光シグナルの領域の連続した定量化を可能にし、疾患進行の解析のための戦略を提供する（たとえば代理のバイオマーカーとして）。たとえば、図27のDNIRAの画像は、末期の非滲出型AMD患者における低蛍光の拡大を示す。

10

【0405】

低蛍光DNIRAに加えて、本明細書中で、臨床状況での過蛍光DNIRAの存在を説明する。色素をさらに注射することはないが、所定のICG励起／発光フィルターののみを用いて、ICG注射から数日後および数週間後に、明るい点状のドットまたはスポットをげっ歯類の眼で同定することができる（たとえば実施例1、2、および8などの本明細書中の実施例参照）。動物の眼では、Pulsed DNIRA（ICG色素が、血管内に反復して提供され、注射から数日後に生存する眼の眼内で評価される）、およびImmunodでは、マクロファージが、ICGを用いてin vitroおよびin vivoで標識することができ、小さな運動性の過蛍光ドットとして可視化することができることが示されている。図28は、過蛍光DNIRAの明確なドットが、AMD患者の黄斑にわたり散乱していることが同定されていることを示す。一部は、視神経乳頭に近位であり、その他は、地図状萎縮の領域のすぐ近くにあり、両方が境界およびいわゆる接合領域にある。

20

【0406】

AMD患者にDNIRAを使用することに加えて、本実施例はまた、ヒトのRPD患者に関してのDNIRAの有用性を示す（たとえば診断および／または予後のツールとして）。従来のドルーゼンおよび偽ドルーゼンは、その後の地図状萎縮および／または脈絡膜新生血管に関連している。図29は、ヒトのRPD患者の眼を示す。IRおよびFAFイメージングを使用してRPDを有すると患者を特徴づけると、DNIRAイメージングは、他のいずれかの方法（図29に示されない他の方法を含む）では見えない低蛍光FAFの複数の領域を示す。これらの領域は、黄斑全体にわたり分布している。ヒョウ柄様のスポットが、再度黄斑の周辺で見られる。RPDは経時的に成熟するように示されており、RPEの前部の浅い隆起から開始して、のちにベースダウンしたピラミッドまたはスパイクへと目立って成熟する。いくつかの試験では、RPDは、求心性の方向に成熟するように観察され、より新規で若年の部分は周辺にあり（この場合では上部に）、およびより古い部分は中心にある（より下位に）。DNIRAでの示唆と一致して、上部に見られる過蛍光のドットは、組織を浸潤する標識したマクロファージの存在と一致する。マクロファージが、より長く組織に残る可能性がある中心領域では、組織喪失の領域は、低蛍光DNIRAの小さなパッチにより示唆されている。図30は、上記以外の異なるRPDにおける低蛍光および過蛍光シグナルの勾配を示す。下側の矢印は、中心黄斑のすぐ上の明確な低蛍光FAFの領域を示す。これより上では、過蛍光FAFドットの集積が増加している。

30

40

【0407】

DNIRAシグナルの供給源を良好に理解するため、および臨床勾配cSLOシステムを使用したげっ歯類およびヒトのイメージングの間での倍率の大きな差異に適応するために、中間の大きさのウサギの眼を使用して、点状の過蛍光DNIRAシグナルの供給源を試験した。

【0408】

RPE毒素を、ニュージーランドホワイトウサギに全身的に投与し、上述のようにDNIRAを行った。ICG注射から数日後および数週間後に画像を連続してとり、ここでは

50

、色素をさらに注射せず、かつ所定の励起／発光フィルターを用いた。ヒトの活性減少を過蛍光F A Fにより特徴づけたが、この原因は、部分的にはまだ知られていないままである。異常または損傷したR P E細胞は、ルポフスチンの集積により、青色蛍光下で過蛍光することが理解されている。しかしながら、本出願人は、以前に、理論による限定を望むものではないが、マクロファージもまた、損傷した蛍光R P E細胞の食作用またはリポフスチン様物質の内因的な産生により過蛍光する可能性があることを示唆していた（*i n v i t r o*で記載）。よって、マクロファージがF A Fで過蛍光し、D N I R AでI C G色素を集積する場合、これらは2つのチャンネルで同時に局在することが裏付けられる。このことが観察されている。

【0409】

図31は、ウサギの眼における過蛍光F A Fシグナルと過蛍光D N I R Aシグナルとの間の対応を示す。D N I R Aがマクロファージを標識することをさらに示すために、経時的な過蛍光D N I R Aのドットの移動を評価した。全身に毒素を投与した後、明るいドットの波が、ウサギの視神経乳頭から、外側に向かうように移動または標識するように観察される。図32は、過蛍光D N I R Aのドットが、マクロファージのように、経時的に位置を変化することを示した。図32の画像の上部の列は、ラットの全身性の毒素の注射後のD N I R Aのイメージングを示し、視神経乳頭を囲む点状の過蛍光ドットを示す。経時的に、これらのドットは外側に向かうように移動するように見える。図32の下側の列は、ウサギの眼におけるD N I R Aのイメージングを示し、マクロファージのマーカーに関して、免疫組織化学的検査により陽性的に染色する個々に標識したドットの類似した同様の移動を示す。両方の列では、最も左側の画像が、ベースラインのD N I R A（すなわち、所定のI C Gフィルターを伴うI C G注射前）である。最終的に、視神経乳頭周辺の領域において、ラットおよびウサギの眼の過蛍光ドットを同定して、ヒトの視神経乳頭を、同様の知見で評価した。ラット、ウサギ、およびヒトのD N I R Aの間の類似性は、臨床的な病理学的な相関を許容し、マクロファージは、三種すべての過蛍光を構成することを示唆している。図33は、明るく標識した小さなD N I R A陽性ドットが、ラット、ウサギ、およびヒトの画像において、視神経乳頭の近くで観察されていることを示す。

【0410】

実施例13：糖尿病性網膜症のビンダリットの治療

炎症は、糖尿病性網膜症および糖尿病性浮腫の両方を含む糖尿病性眼疾患において中心的な役割を果たすことが示唆されている。サイトカイン、ケモカイン、および他の炎症誘発性もしくは透過促進性分子が、硝子体、眼房、および同様に血清などのヒトの眼組織で説明されている。動物モデルにより、前臨床試験における炎症性の応答が確認されている。

【0411】

今まで同定された50+のケモカインのうち、約50%が糖尿病で変性することが報告されている。これらのうち特に、M C P-1／c c l 2およびR A N T E Sが挙げられる。N F K bなどの転写因子もまた、糖尿病性眼疾患に関与しており、肥満および過剰な遊離脂肪酸に直面して直接活性化している。I K K bリン酸化の増大は、核へのN F k bの転位および炎症性トランスクリプトームの活性化をもたらす。さらに、血清のM C P-1／c c l 2およびC R Pのレベルは、重度な糖尿病性網膜症の患者で上昇し、眼に由来する介在物質の全身性放出、または同時に発生する全身性疾患が起こる可能性がある。よって、これらの全身性因子を局所的または全身的に低減できる薬剤は、糖尿病性眼疾患の治療に有効であり得る。

【0412】

本実施例は、特に、ビンダリットが、糖尿病性眼疾患に関与していると示されている炎症性介在物質を低減することを示す。高用量の45mg／kgのヨウ素酸ナトリウムを使用して、高用量（20μg／μl、2μl容量）、および低用量（2μg／μl、2μl容量）の硝子体内ビンダリットで治療した炎症性応答を誘導した。ビンダリットの効果を、毒素注射から16日後に評価した。図34に示されるように、ビンダリットは、糖尿病

性網膜症に関与していると知られている炎症性介在物質を減少させた。

【0413】

図36は、ビンダリットが、他のインターロイキンIL-10およびIL-3または腫瘍壊死因子(TNF α)およびcc15(MCP-3)に関して有意な効果を有さなかったことを示す。以下の条件：1. 硝子体内生理食塩水(ビヒクル)、2. 高用量のビンダリット、2 μ g/ μ l、(毒素なし)、3. 毒素+低用量2 μ g/ μ lのビンダリット、4. 毒素+高用量の20 μ g/ μ lのビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、mRNAの変化倍数を、ベースライン(正常)の条件と比較した。

【0414】

さらに、ビンダリットは、血管内皮増殖因子A(VEGF-A)のmRNAに関して有意な効果を示さなかった(図37)。しかしながら、このパラダイムでは、VEGF-Aは、注射後のいずれの時間でも毒素処置(右)により増加しなかった。すべての変化は、およそ1.0倍前後である。以下の条件1. 硝子体内生理食塩水(ビヒクル)、2. 高用量のビンダリット、2 μ g/ μ l、(毒素なし)、3. 毒素+低用量2 μ g/ μ lのビンダリット、4. 毒素+高用量20 μ g/ μ lのビンダリット+NaIO₃、および5. 毒素単独の下で、mRNAの変化倍数を、ベースライン(正常)な条件と比較した。

【0415】

図38は、不死化したヒトのRPE細胞株で、ビンダリットが、NF κ bの核への転位を低減させることを示す。

【0416】

最後に、単離したヒトRPE細胞に及ぼす高血糖の効果を提示した。高血糖の存在下(血清中グルコースの上昇)およびインスリンの非存在下では、大部分の細胞は低血糖となる。このことはまた、インスリンに非応答性または耐性のある細胞にとって真である。しかしながら、脳および網膜の細胞は、インスリンの非存在下で高レベルのグルコースを取り込み、よって、高血糖となる。低レベルでは、このことは、細胞の活性を刺激するが、高用量では、グルコースは毒性となり、炎症を促進させ、終末糖化産物(AGE)の形成をもたらす。不死化したヒトの細胞株、hTERTを、通常の培地—高濃度および非常に高濃度のD-グルコースとともにインキュベートした。蛍光単位で測定した細胞の活性を、標準的な濃度のグルコースに対して正規化した；L-グルコースは浸透性の対照である。細胞を、ビンダリットを伴う、または伴うことなく5日間インキュベートした。図39は、ビンダリットが、高濃度のグルコースとともにインキュベートしたhTERT細胞における細胞ストレスを正常にすることを示す。特に、この実施例は、糖尿病性網膜症の治療のための薬剤としてのビンダリットを指摘するものである。

【0417】

均等物

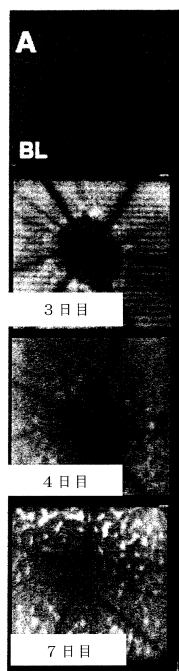
当業者は、単なる定例的な実験を使用して、本明細書中に記載されている特定の実施例との多くの均等物を確認することを認識、または確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包有されると意図されている。

【0418】

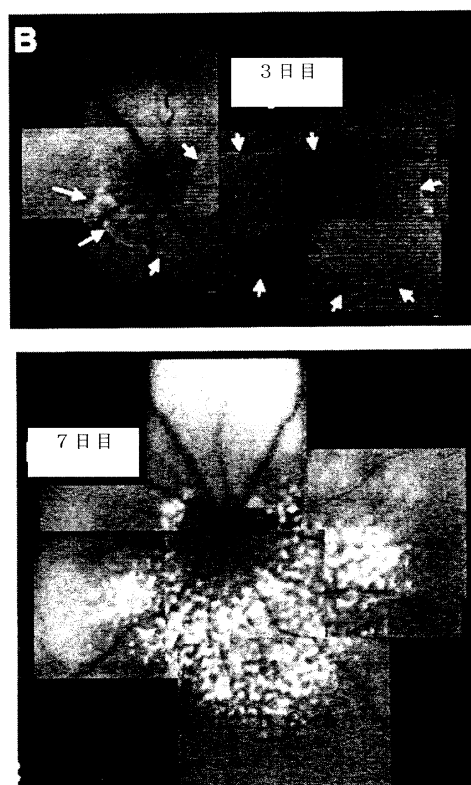
参考文献の援用

本明細書中で参照したすべての特許および刊行物は、全体が本明細書中参照として援用されている。

【図 1 A】



【図 1 B】



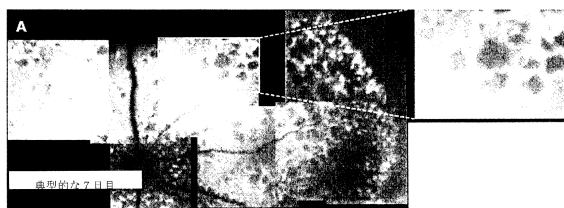
【図 1 C】



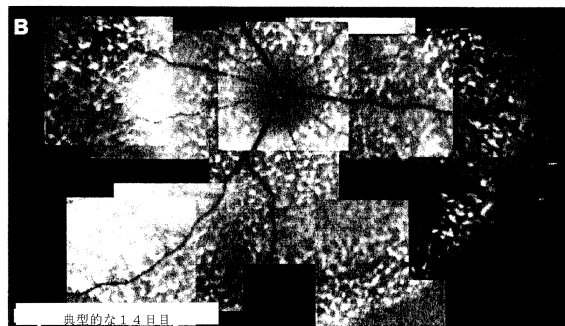
【図 1 D】



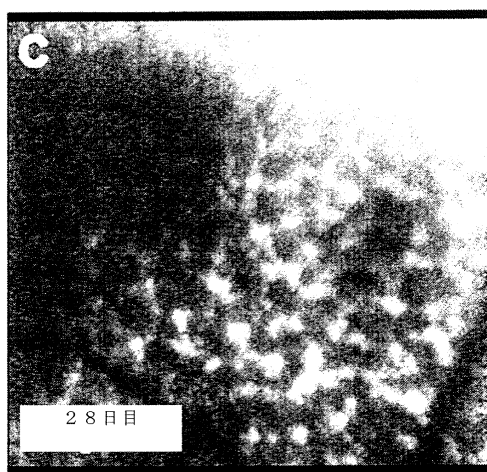
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 C - D】

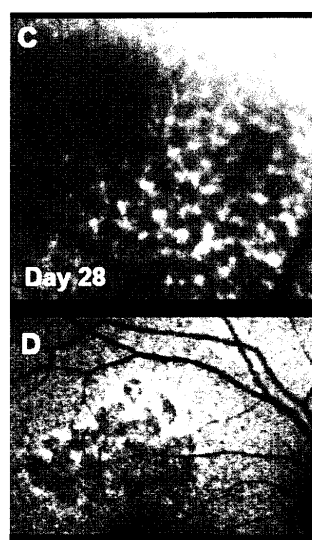
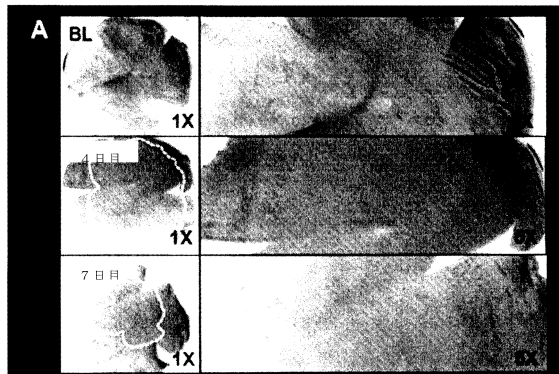
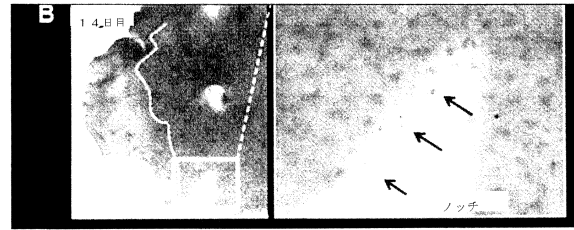


FIG. 2C-D

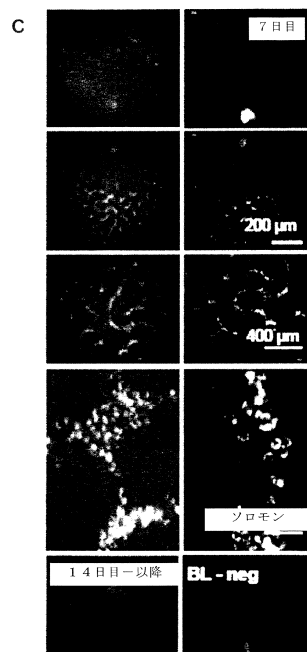
【図 3 A】



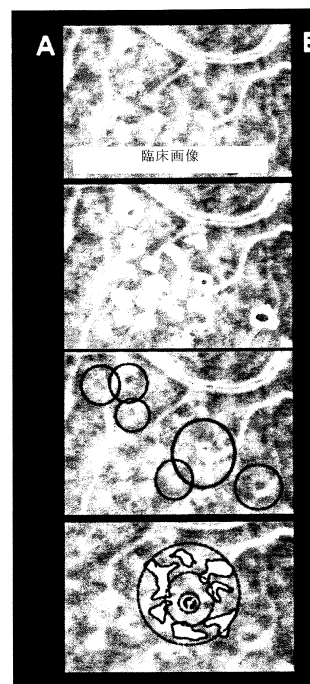
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 4 A】



【図 4 B】

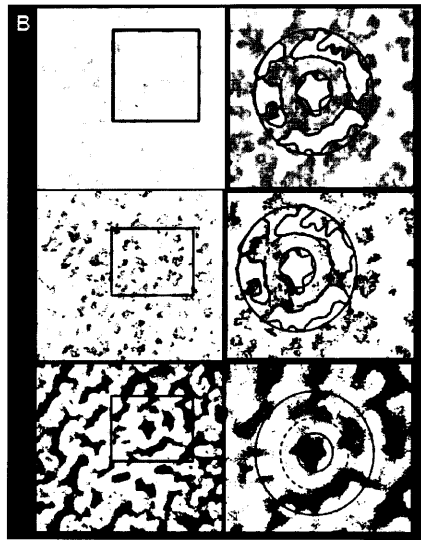


FIG. 4B

【図 4 C】

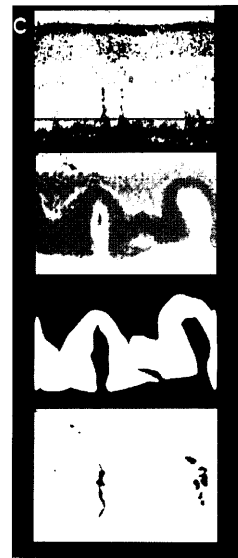
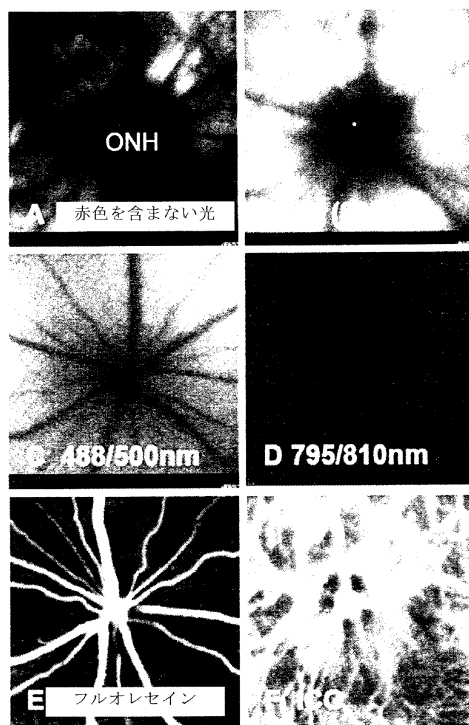
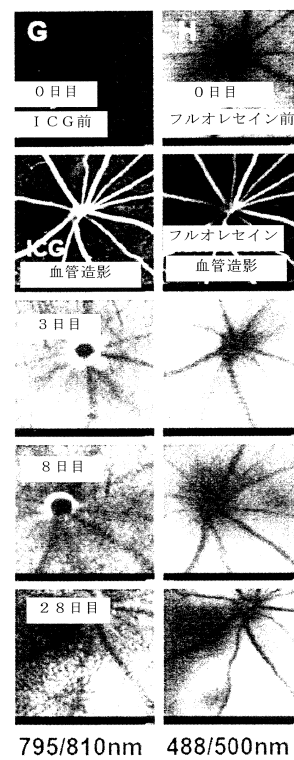


FIG. 4C

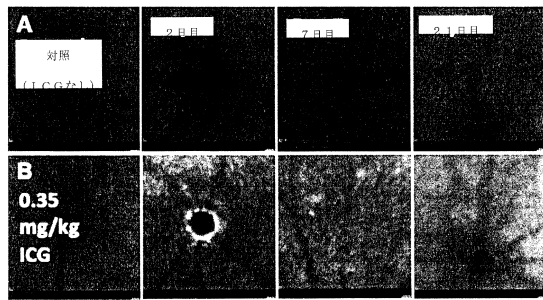
【図 5 A - F】



【図 5 G - H】



【図 6 A - B】



【図 6 C - D】

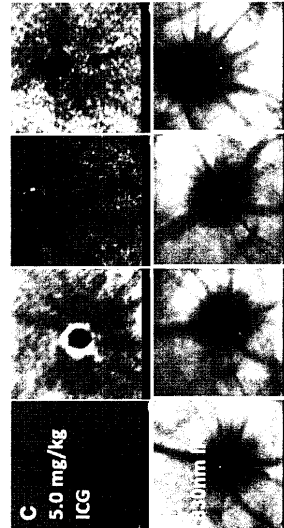


FIG. 6C-D

【図 7 A】



FIG. 7A

【図 7 B】

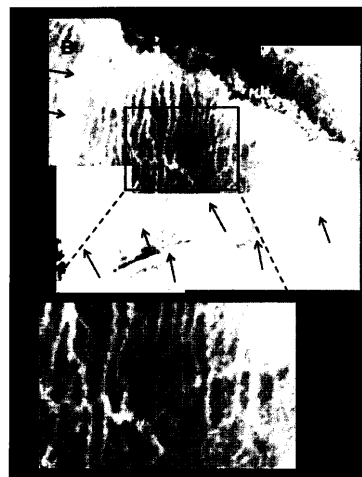


FIG. 7B

【図 8 A】

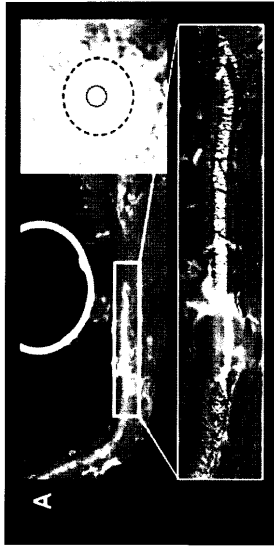
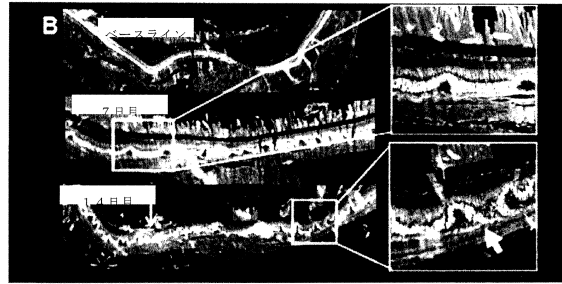
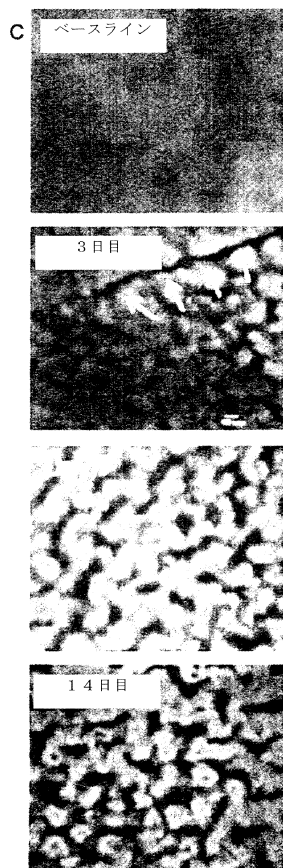


FIG. 8A

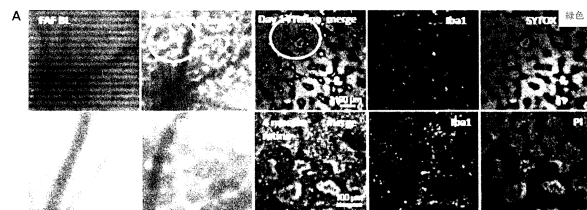
【図 8 B】



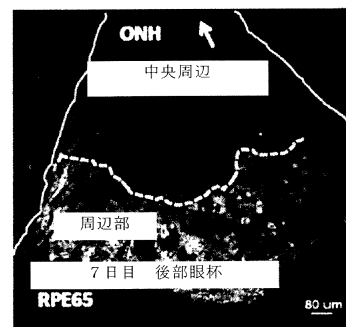
【図 8 C】



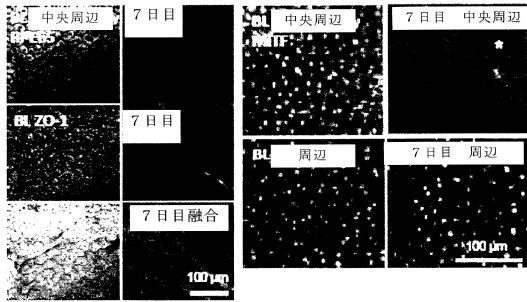
【図 9 A】



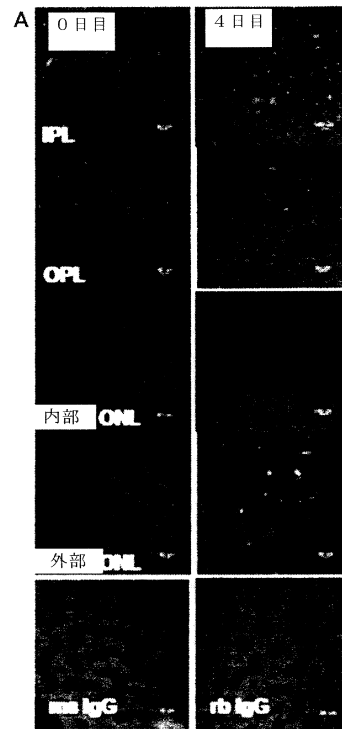
【図 9 B】



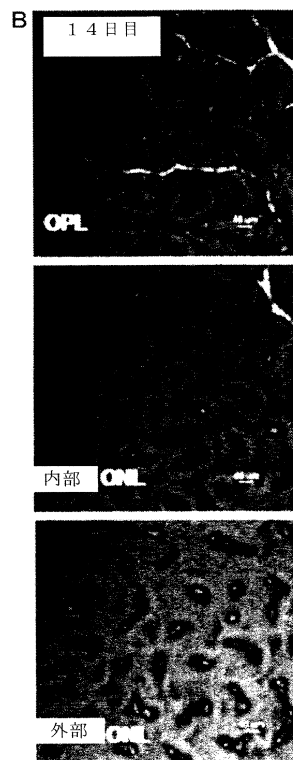
【図 9 C】



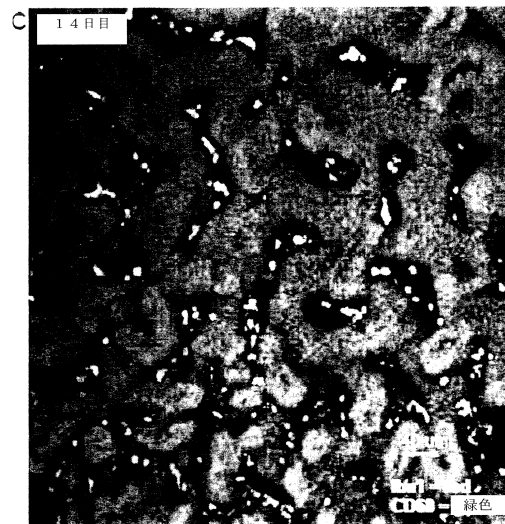
【図 10 A】



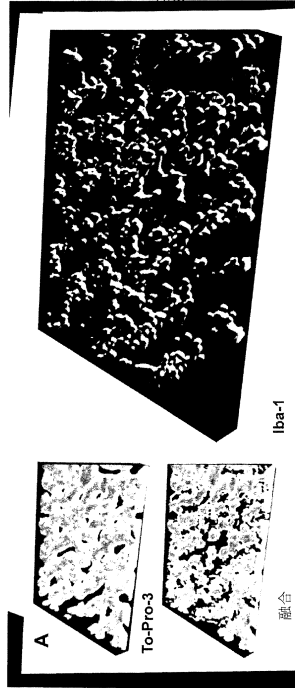
【図 10 B】



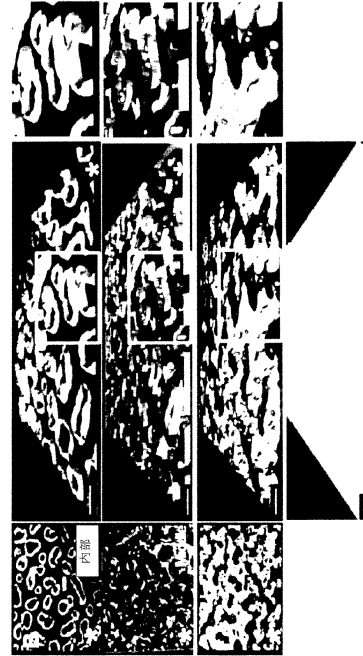
【図 10 C】



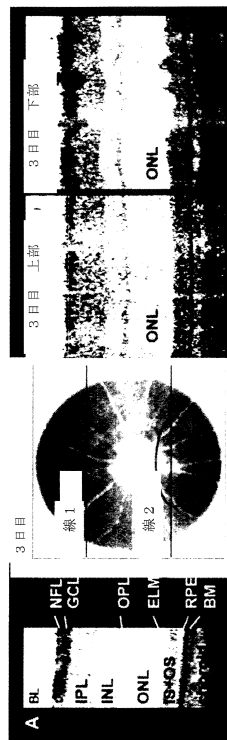
【図 1 1 A】



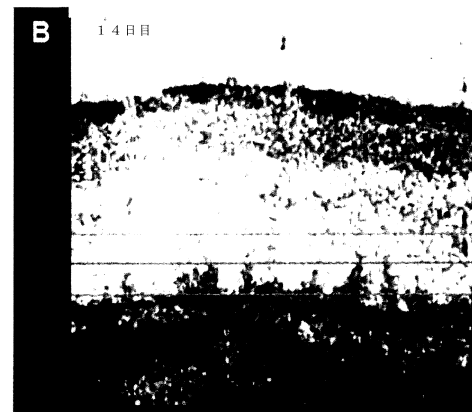
【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



【図 1 2 D】

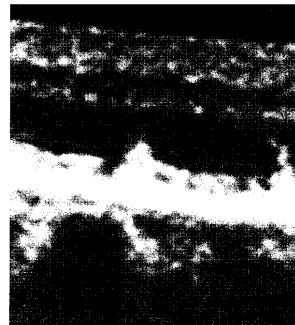


FIG. 12D

【図 1 3 A】

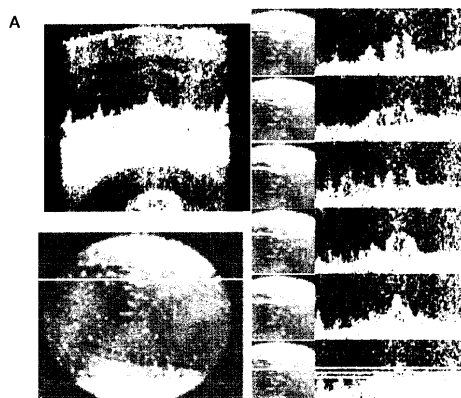
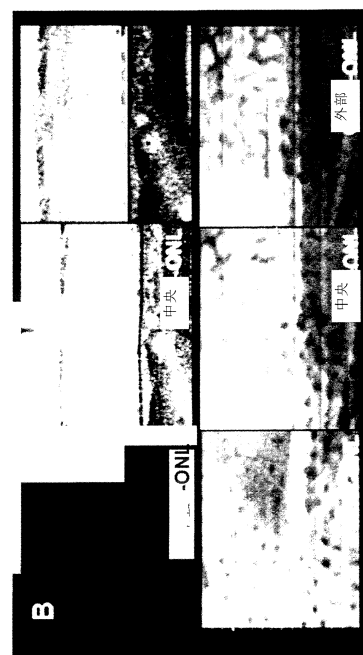


FIG. 13A

【図 1 3 B】



【図 1 4 A】

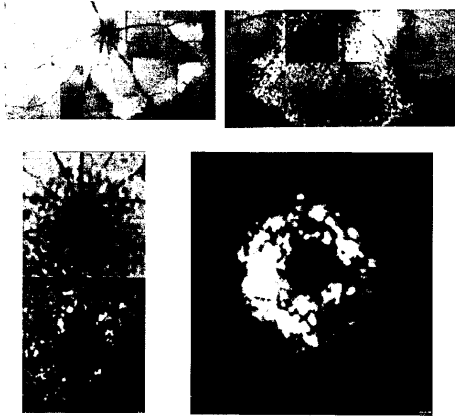


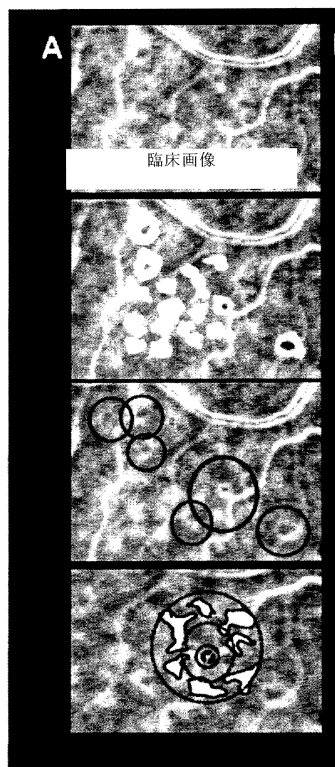
FIG. 14A

【図 1 4 B】



FIG. 14B

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】

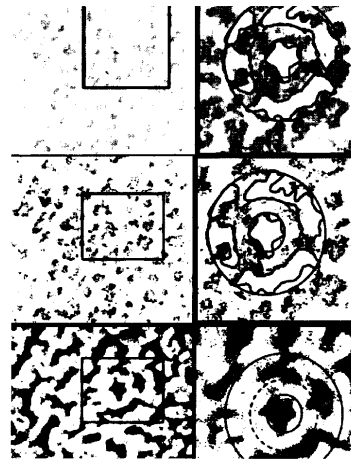


FIG. 15B

【図 1 5 C】

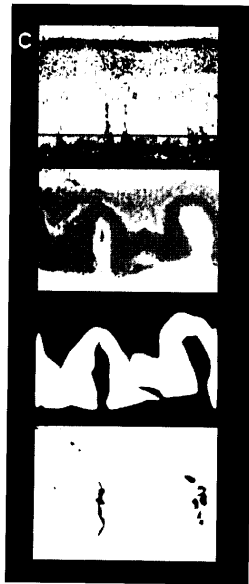
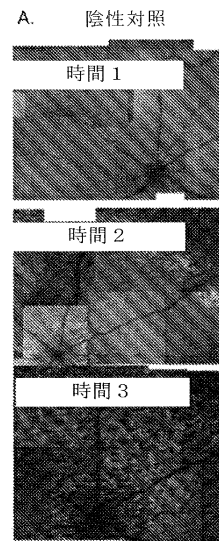
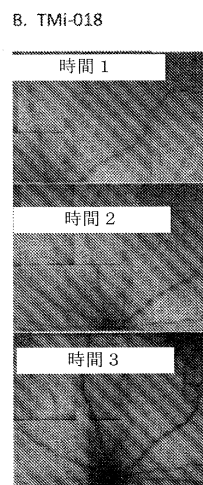


FIG. 15C

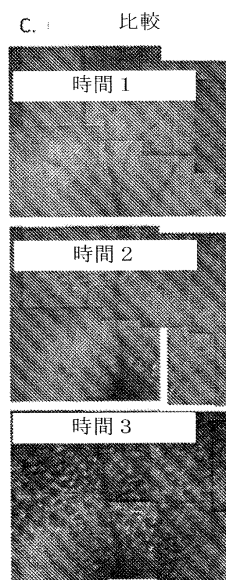
【図 1 6 A】



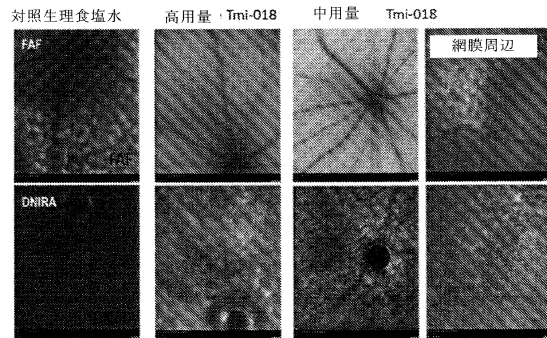
【図 1 6 B】



【図 1 6 C】



【図 16 D】

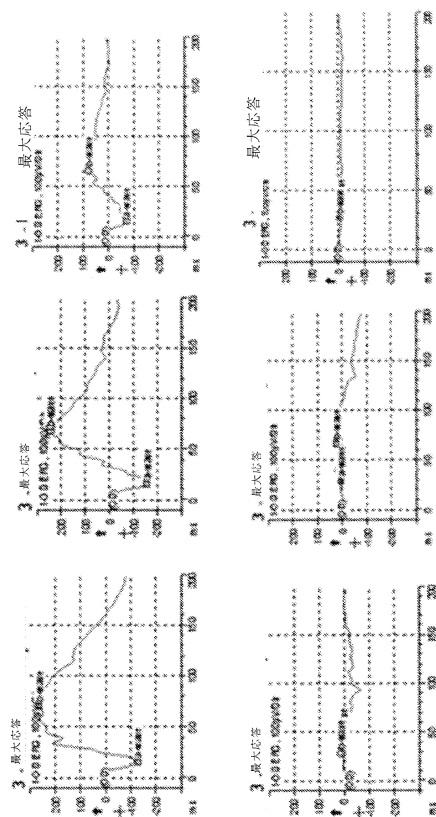


【図 16 E】

用量 Tmi-018 の減少	
20ug/ul	98.40%
10ug/ul	52.10%
1ug/ul	5.60%
ビヒクルのみ	0.00%
毒素のみ (ビヒクルなし)	-0.09%

ビヒクルで治療した眼と
比較したパッチの大きさ

【図 17 B】



【図 16 F】

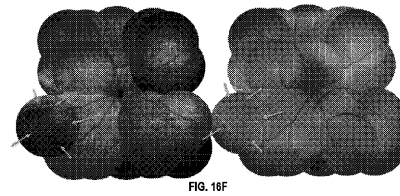
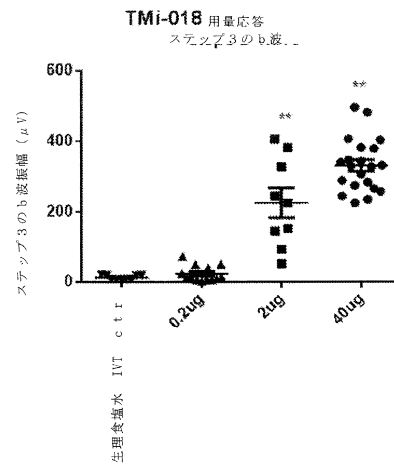


FIG. 16F

【図 17 A】



【図 18 A】

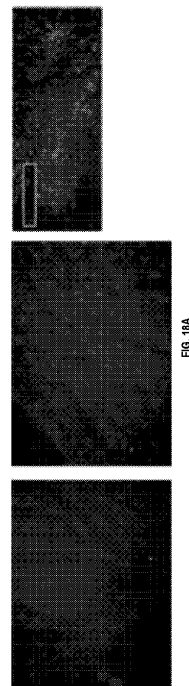
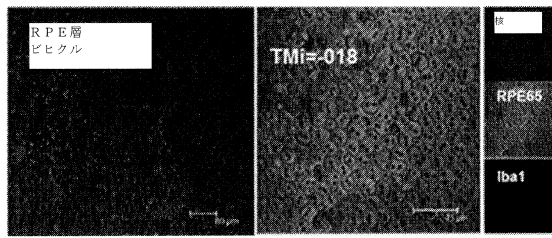
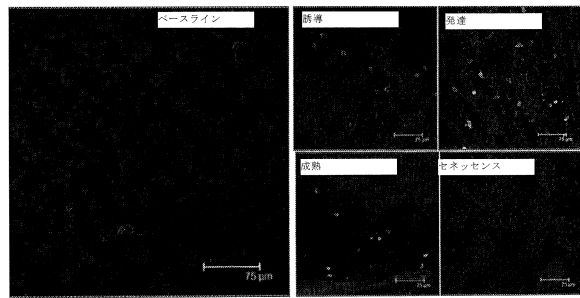


FIG. 18A

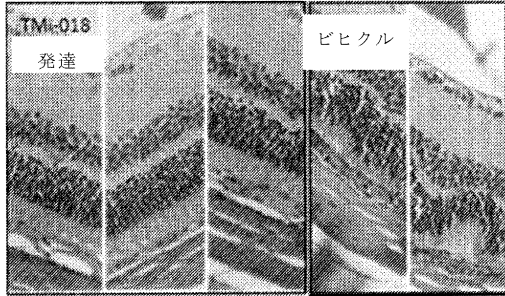
【図 18 B】



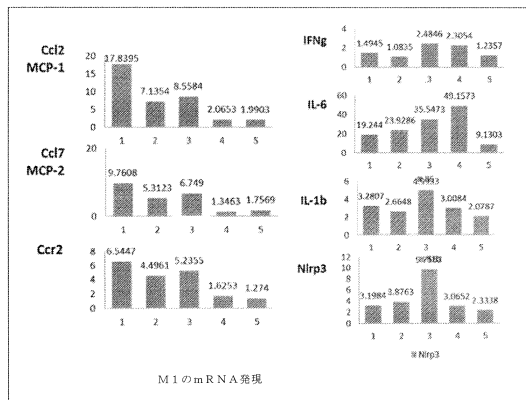
【図 19 A】



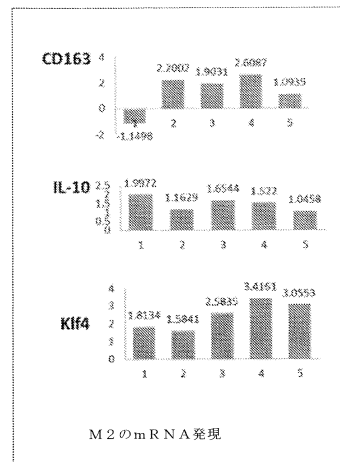
【図 18 C】



【図 19 B】



【図 19 C】



【図 19 D】

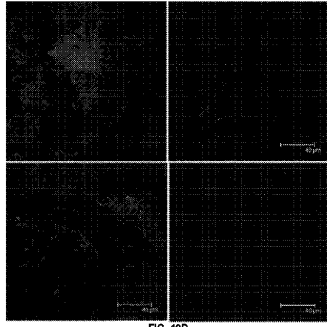


FIG. 19D

【図 19 E】

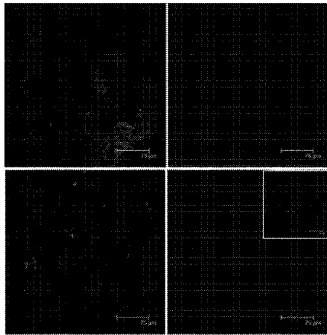
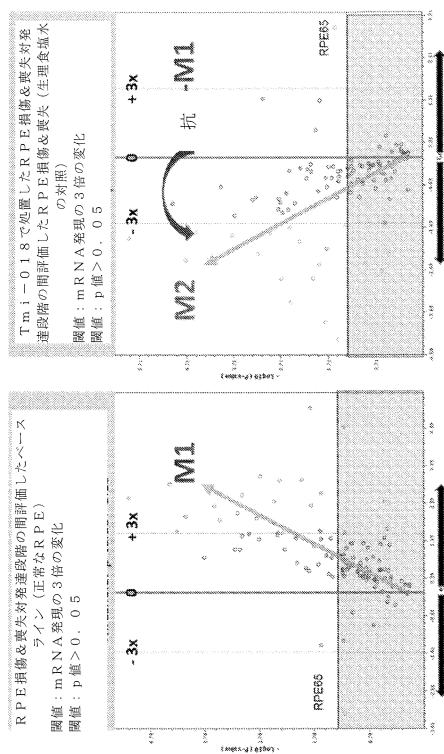
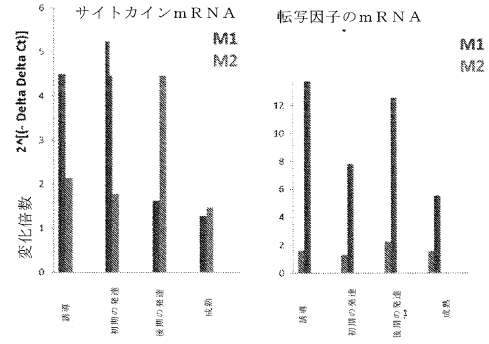


FIG. 19E

【図 19 G】



【図 19 F】



【図 19 H】

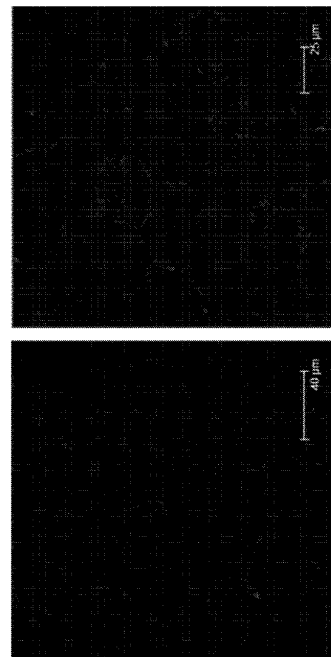
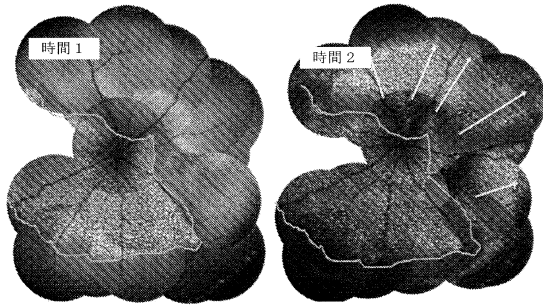
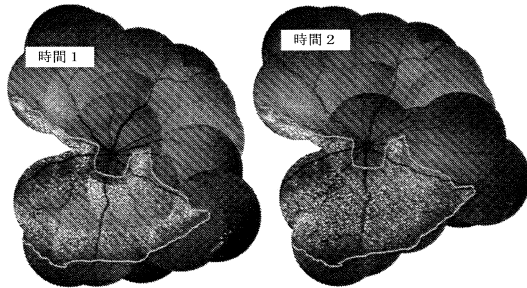


FIG. 19H

【図 20 A】



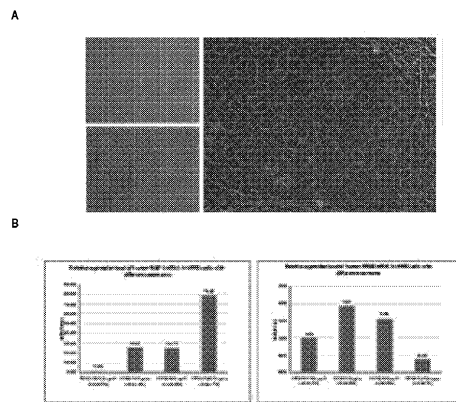
【図 20 B】



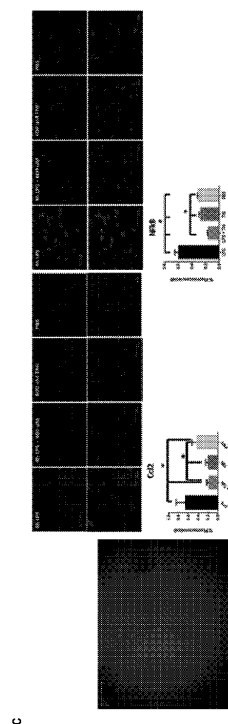
【図 20 C】

治療	成功した目の数	成功パーセント (割合)
第 1 のヒット (すなわち毒素 1)	86/119	72.7%
第 2 のヒット (すなわち毒素 2)	26/28	97.86%
第 2 のヒット + 生理食塩水 1 TV	6/8	75%
第 2 のヒット + ビンダリット 1 TV	0/18	0%

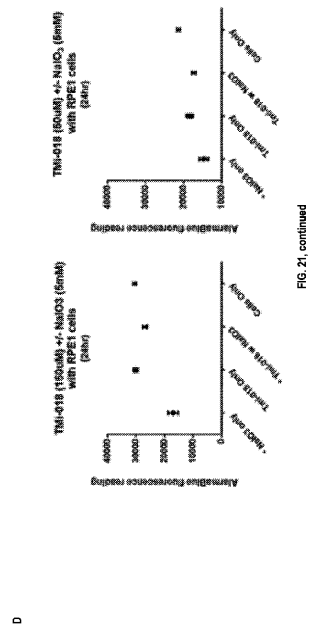
【図 21 - 1】



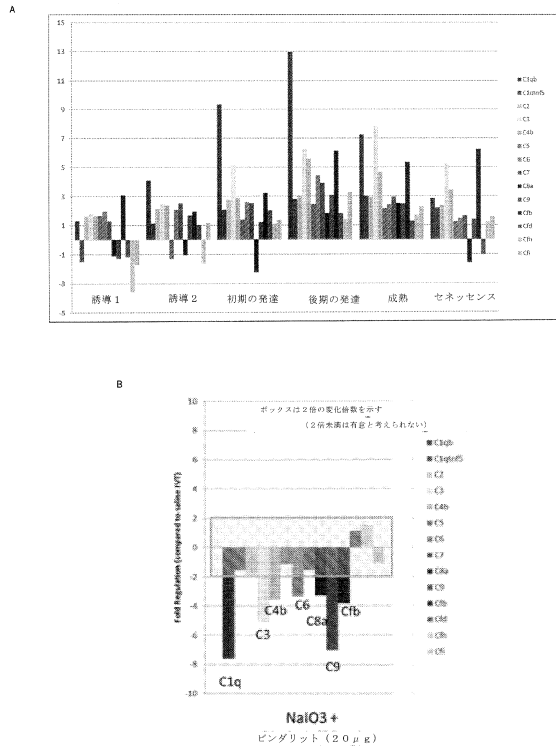
【図 21 - 2】



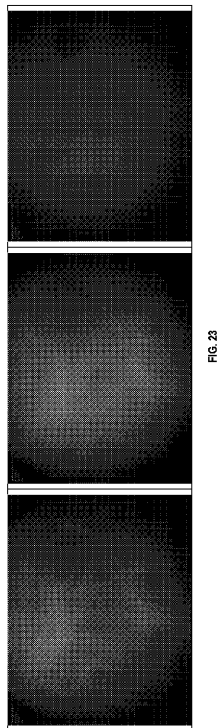
【図 2 1 - 3】



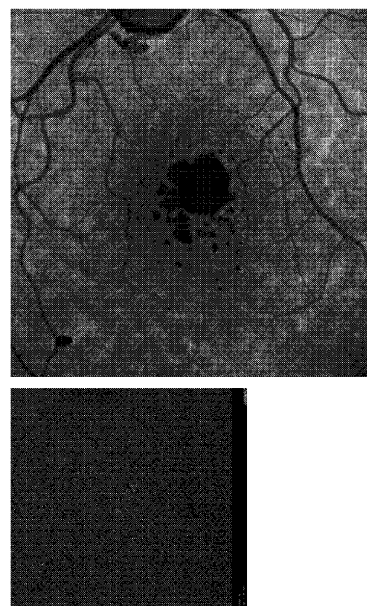
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】

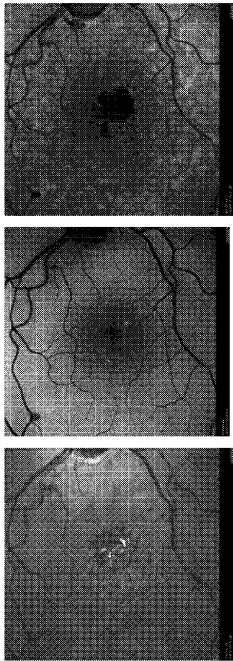


FIG. 25

【図 2 6】

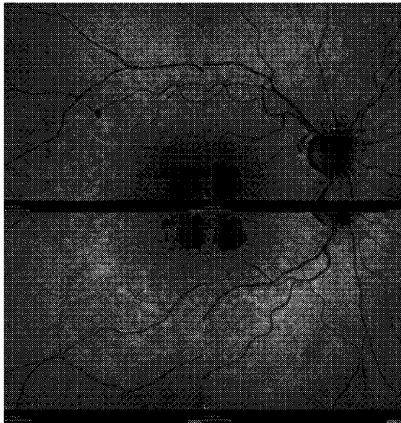


FIG. 26

【図 2 7】

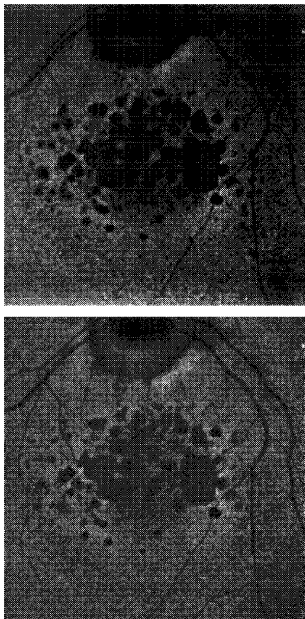


FIG. 27

【図 2 8】

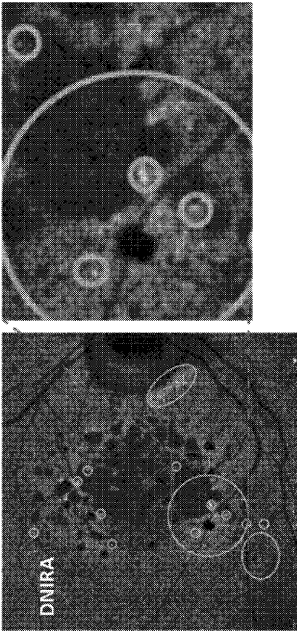


FIG. 28

【図 2 9】

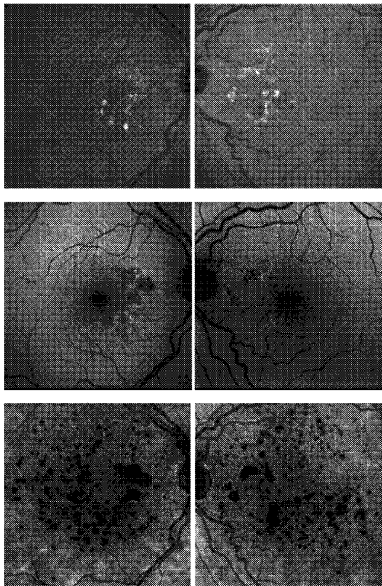


FIG. 29

【図 3 0】

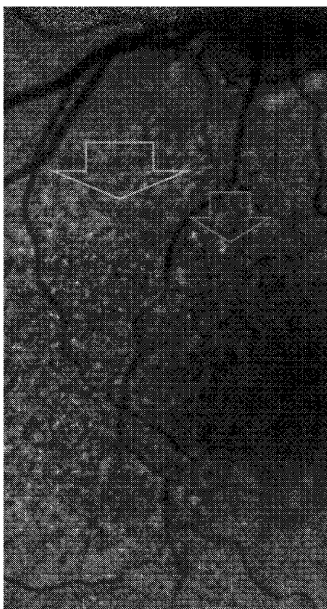


FIG. 30

【図 3 1】

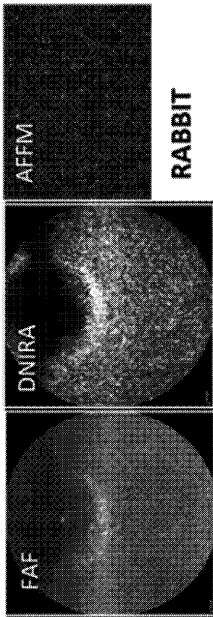


FIG. 31

【図 3 2】

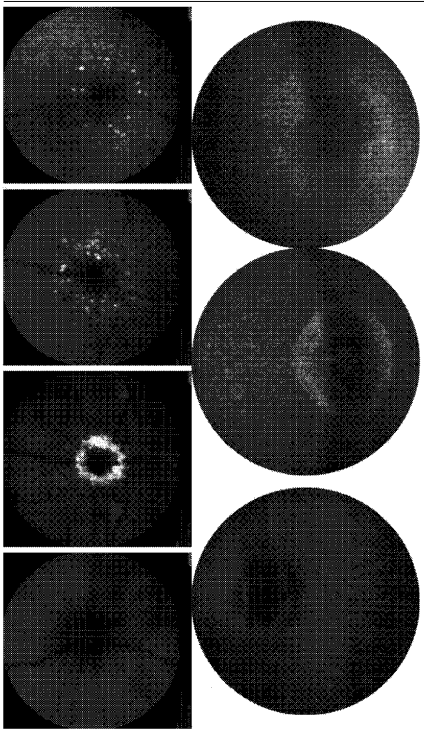


FIG. 32

【図 3 3】

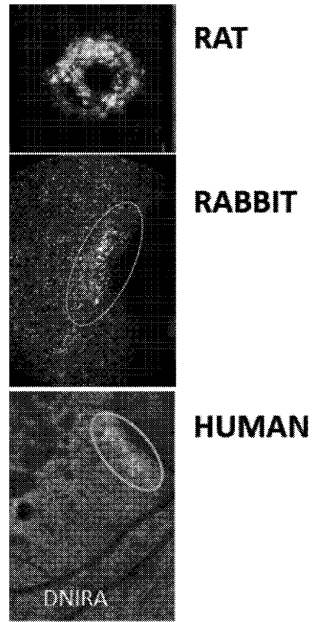


FIG. 33

【図 3 4】

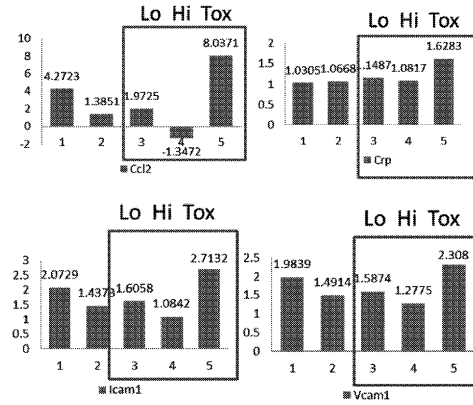


FIG. 34

【図 3 5】

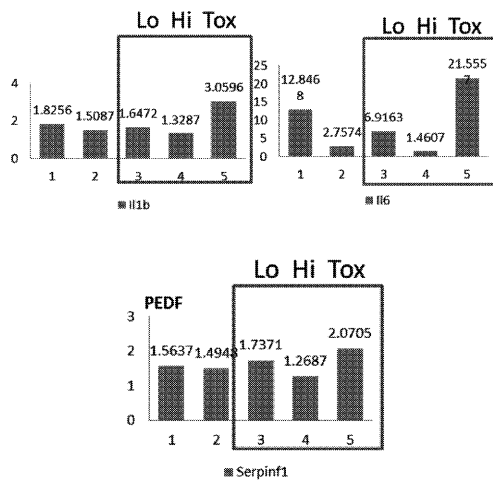


FIG. 35

【図 3 6】

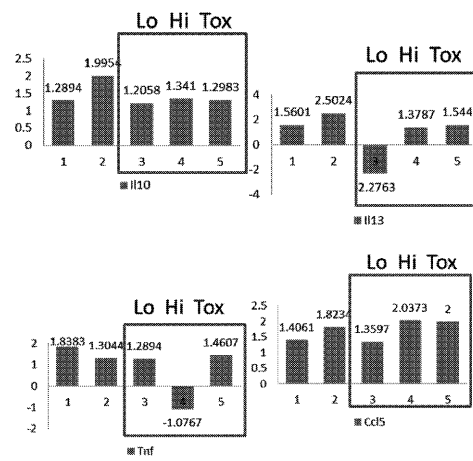
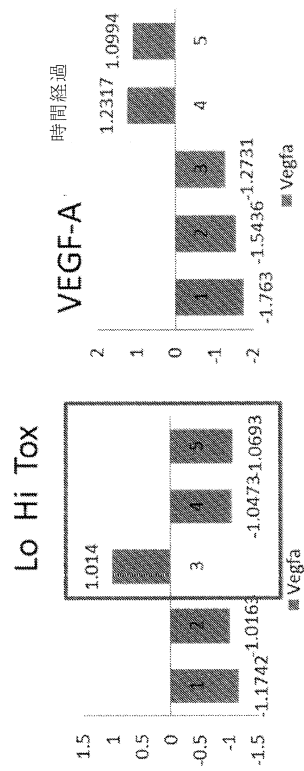
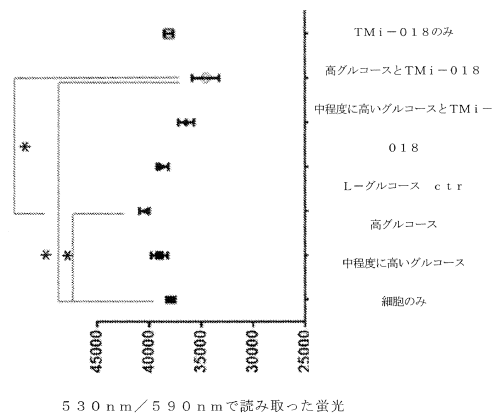


FIG. 36

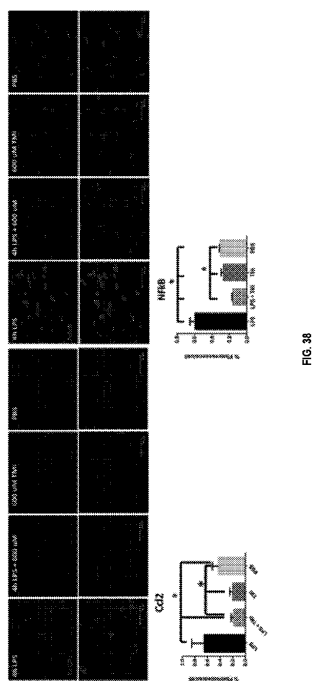
【図 37】



【図 39】



【図 38】



【図 40】

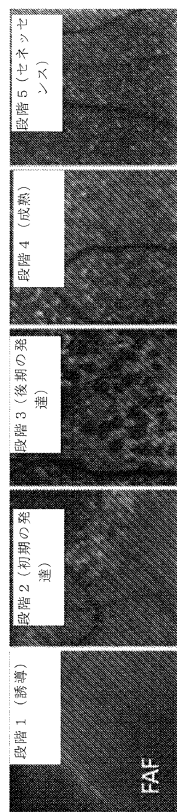


図 40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K 45/06
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00

(31)優先権主張番号 62/076,162

(32)優先日 平成26年11月6日(2014.11.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/157,773

(32)優先日 平成27年5月6日(2015.5.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ボイド, シェリー ロメイン
カナダ国, オンタリオ州 エム5エー 2エム5, トロント, 112 ジョージ ストリート, ユ
ニット 2106

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表2001-510793(JP, A)
国際公開第2013/163758(WO, A1)
Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 2012年, Vol.53, p.7567-7575

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 31/00-31/80
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)