

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月22日(22.09.2022)



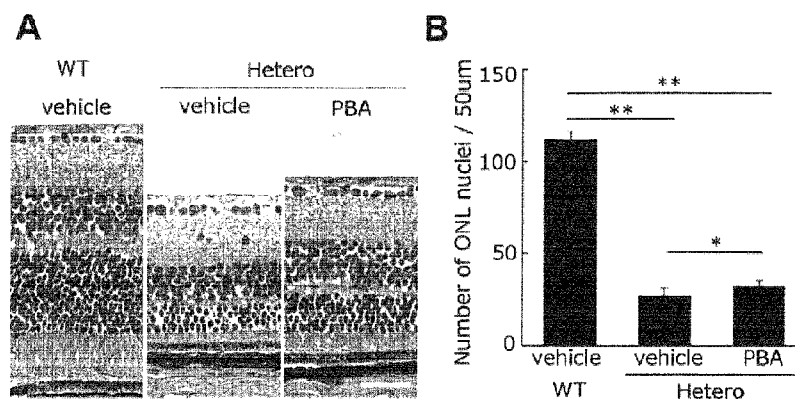
(10) 国際公開番号

WO 2022/196609 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/192 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/011209
- (22) 国際出願日: 2022年3月14日(14.03.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-042005 2021年3月16日(16.03.2021) JP
- (71) 出願人: 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目
1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小澤 洋子(OZAWA, Yoko); 〒1608582
東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP). 岡野 栄之(OKANO,
Hideyuki); 〒1608582 東京都新宿区信濃町
3 5 番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo
(JP). 坪田 一男(TSUBOTA, Kazuo); 〒1608582
東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾
大学 医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所(IP
FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東
日本橋三丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス
2 1 ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING RETINAL DEGENERATION

(54) 発明の名称: 網膜変性抑制用組成物



(57) Abstract: It is found that phenylbutyric acid (PBA) can prevent progressive retinal photoreceptor cell death and can prevent the deterioration in a visual function. On the basis of these findings, a pharmaceutical composition for preventing retinal degeneration including retinitis pigmentosa can be provided.

(57) 要約: フェニル酪酸 (PBA) が進行性の網膜視細胞死を抑制すること、視機能低下を抑制することを見出し、網膜色素変性をはじめとする網膜変性を抑制するための医薬組成物を提供することができた。

[続葉有]

SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明 細 書

発明の名称： 網膜変性抑制用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、網膜色素変性をはじめとする網膜変性を抑制するための医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 網膜色素変性は遺伝性の網膜疾患で、光の明暗を認識する視細胞である杆体視細胞が遺伝子変異により変性することで、初期症状として夜盲症や視野狭窄、視力低下などを呈し、最終的には失明をきたす恐れがある疾患である。

現時点では有効な治療法が無く、これまで臨床的には神経保護目的でビタミン剤を投与することがあったが、効果は乏しい。またこれまでにウイルスを用いた遺伝子導入治療に関する研究が進められており、世界的に臨床試験が行われている。また、薬物療法として視覚サイクルモジュレータ（V i s u a l C y c l e M o d u l a t o r）の研究が行われているが（非特許文献1）、これは視機能を使わないようにして網膜を保護するものであり、視機能を維持しながら網膜を保護する治療が求められている。

網膜色素変性のほか、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、もしくはそれ以外の原因に伴う網膜変性に対する網膜を保護する治療法もなく、同様に治療法が求められている。

[0003] また尿素サイクル異常症の特効薬として既に使用されているフェニル酪酸（p h e n y l b u t y r i c a c i d（以下、PBAとも言う））が、角膜内皮における小胞体ストレスを抑制する作用があることがこれまでに示されている（特許文献1、2）。しかしながら、眼領域において、角膜内皮以外でのPBAの作用については不明であり、特に網膜におけるPBAの作用は不明であった。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開2015/064768号

特許文献2：国際公開2018/164113号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：PLoS One, 2015 May 13;10(5):e0124940

非特許文献2：J Biol Chem., 2011;286(12):10551-10567

非特許文献3：FASEB J., 2020;34(4):5016-5026

非特許文献4：PLoS One, 2017;12(6):e0178627

非特許文献5：Free Radic Biol Med., 2014;71:176-185

非特許文献6：Clin Exp Ophthalmol., 2014;42(6):555-563

非特許文献7：Commun Biol., 2020;3(1):767

非特許文献8：Mol Neurobiol., 2019;56(12):8124-8135

非特許文献9：Mol Neurobiol., 2015;52(1):679-695

非特許文献10：Bioorg Med Chem., 2010;18(19):7022-7028

非特許文献11：Invest Ophthalmol Vis Sci., 2012;53(12):7590-7599

非特許文献12：Adv Exp Med Biol., 2012;723:191-197

非特許文献13：Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis., 1864(9 Pt B):2938-2948

非特許文献14：Front Cell Neurosci., 2019;13:535

非特許文献15：Cell Death Dis, 2014;5:e1236

非特許文献16：Nat Struct Mol Biol., 2014;21(4):325-335

非特許文献17：Trends Cell Biol., 2012;22(1):22-32

非特許文献18：eLife, 2020;9:e57306

非特許文献19：Front Cell Dev Biol., 2020;8:270

非特許文献20：Curr Opin Cell Biol, 2015;37:18-27

非特許文献21：Traffic, 2018;19(8):569-577

非特許文献22：Neurobiol Dis, 2016;90:3-19

非特許文献23：Ageing Res Rev., 2020;66:101250

非特許文献24 : J Neurosci Res., 2017;95(10):2025-2029

非特許文献25 : FEBS Lett., 2018;592(5):793-811

非特許文献26 : Redox Biol., 2020;37:101779

非特許文献27 : Neural Regen Res., 2017;12(8):1252-1255

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] すなわち、本発明は、網膜色素変性をはじめとする網膜変性を抑制するための医薬組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく検討を進め、PBAが進行性の網膜視細胞死を抑制すること、視機能低下を抑制することを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち、この出願は、以下の発明を提供するものである。

[1] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜変性抑制用医薬組成物。

[2] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜変性疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。

[3] 前記網膜変性疾患が、網膜視細胞が変性した疾患である、[2]に記載の医薬組成物。

[4] 前記網膜変性疾患が、網膜色素変性、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、及びMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) に伴う網膜変性から選択される1つ以上の疾患である、[2]又は[3]に記載の医薬組成物。

[5] フェニル酪酸の塩が、ナトリウム塩である、[1]～[4]のいずれかに記載の医薬組成物。

[6] 錠剤、顆粒剤、懸濁剤、注射剤又は点眼剤である、[1]～[5]のいずれかに記載の医薬組成物。

〔 7 〕 フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜における小胞体ストレス関連分解を促進するための医薬組成物。

〔 8 〕 フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜におけるミトコンドリア生合成を活性化するための及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能を改善するための医薬組成物。

〔 9 〕 対象において、網膜変性を抑制する方法であって、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を、該対象に投与することを含む、方法。

〔 1 0 〕 対象において、網膜変性を治療又は予防する方法であって、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を、該対象に投与することを含む、方法。

〔 1 1 〕 対象において、網膜における小胞体ストレス関連分解を促進する方法であって、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を、該対象に投与することを含む、方法。

〔 1 2 〕 対象において、網膜におけるミトコンドリア生合成を活性化する及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能を改善する方法であって、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体を、該対象に投与することを含む、方法。

〔 1 3 〕 網膜変性の抑制において使用するための、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体。

〔 1 4 〕 網膜変性の治療又は予防において使用するための、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体。

〔 1 5 〕 網膜における小胞体ストレス関連分解の促進において使用するための、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体。

〔 1 6 〕 網膜におけるミトコンドリア生合成の活性化及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能の改善において使用するための、フェニル酪酸（ P B A ） 若しくはその塩又はそれらの誘導体。

〔 1 7 〕 網膜変性の抑制において使用するための医薬の製造における、フェ

ニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体の使用。

[18] 網膜変性の治療又は予防において使用するための医薬の製造における、フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体の使用。

[19] 網膜における小胞体ストレス関連分解の促進において使用するための医薬の製造における、フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体の使用。

[20] 網膜におけるミトコンドリア生合成の活性化及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能の改善において使用するための医薬の製造における、フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体の使用。

発明の効果

[0009] 本発明は、PBAが網膜色素変性モデルにおいて視機能維持を促進することを見出したことにより、網膜色素変性をはじめとする網膜変性を抑制するための剤を提供でき、これまで診断がついても有効な治療法が無かった網膜変性患者に対する新規医薬組成物を提供することができた。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] PBAによるP23Hロドプシンノックインヘテロ接合型網膜色素変性モデルマウス（本開示中、単にP23Hノックインヘテロ接合型マウス、P23H RPモデルマウスとも言う）における視機能維持促進を示す図である。図中、WTは野生型マウスを示し、HeteroはP23Hノックインヘテロ接合型マウスを示す。Aは、マウス網膜のヘマトキシリン・エオジン染色を行った顕微鏡写真図である。Bは、外顆粒層（ONL）における、核の数を示すグラフである。図中、*は $P < 0.05$ を示し、**は $P < 0.01$ を示す。

[図2] PBAによるP23Hノックインヘテロ接合型マウスにおける視機能維持促進を示す図である。A～Eは暗順応ERGの結果図であり、Aは網膜電図の波形を示し、B～Cはそれぞれa波の振幅及び潜時を示し、D～Eはそれぞれb波の振幅及び潜時を示す。F～Hは明順応ERGの結果図であり、Fは網膜電図の波形を示し、G～Hはそれぞれ振幅及び潜時を示す。図中、

*は $P < 0.05$ を示す。

[図3] PBAによるP23Hノックインヘテロ接合型マウスの網膜における小胞体ストレス関連分解とミトコンドリアマーカの発現上昇を示す図である。A～Iのグラフはそれぞれ、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）による、各遺伝子マーカの発現量の変化を示す。図中、*は $P < 0.05$ を示し、**は $P < 0.01$ を示す。

[図4] PBAによる細胞株におけるミトコンドリアの代謝改善を示す図である。A～Bはそれぞれ、Pgc1- α とTfamのmRNA発現量がPBAの用量依存的に増加することを示す。Cは、ミトコンドリアのプロトノフォア脱共役剤であるBAM15の投与前後における膜電位改善を示す電子顕微鏡写真図である。Dは、ミトコンドリア膜電位改善を示すグラフである。E～Fはそれぞれ、PBAによる電子輸送鎖の複合体I V（COX I V）の活性亢進、及びATP発現レベルの上昇を示すグラフである。図中、*は $P < 0.05$ を示し、**は $P < 0.01$ を示す。

[図5] PBAの経口投与によるP23Hノックインヘテロ接合型マウスの体重推移を示す図である。

[図6] PBAの経口投与によるP23Hノックインヘテロ接合型マウスの網膜におけるミトコンドリアマーカの発現上昇を示す図である。A～Bのグラフはそれぞれ、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）による、各遺伝子マーカの発現量の変化を示す。図中、*は $P < 0.05$ を示し、**は $P < 0.01$ を示す。

発明を実施するための形態

- [0011] 本発明の一実施形態は、フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜変性抑制用医薬組成物又は網膜変性疾患を治療若しくは予防するための医薬組成物である。
- [0012] 本実施形態において、フェニル酪酸は、本発明の効果を妨げない限り限定されず、4-フェニル酪酸、3-フェニル酪酸、2-フェニル酪酸、2-フェニルイソ酪酸、3-フェニルイソ酪酸等が挙げられるが、好ましくは4-

フェニル酪酸である。試薬・工業原料等として入手することもできるし、常法に従って合成することもできる。

また、フェニル酪酸塩は、本発明の効果を妨げない限り限定されず、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等が挙げられるが、好ましくはナトリウム塩である。

[0013] 本実施形態において、フェニル酪酸若しくはフェニル酪酸塩の誘導体とは、本発明の効果を妨げない限り限定されず、例えば、フェニル基上の任意の水素が、任意の置換基（例えば、炭素数 1～3 のアルキル基等の炭素数 3 以下の飽和炭化水素基、炭素数 3 以下の不飽和炭化水素基、ハロゲンなど）で 1 または複数置換されたものであってもよく、フェニル酪酸又はフェニル酪酸塩の炭化水素鎖上の任意の水素が、任意の置換基（例えば、炭素数 1～3 のアルキル基等の炭素数 3 以下の飽和炭化水素基、炭素数 3 以下の不飽和炭化水素基、ハロゲンなど）で 1 または複数置換されたものであってもよい。また、フェニル酪酸塩の誘導体は、フェニル酪酸塩のエステルやエーテル等であってもよく、例えば、メチルエステル、エチルエステル、n-プロピルエステル、イソプロピルエステル等であってもよい。

[0014] 本実施形態において、網膜変性とは、疾患については特に限定されず、網膜細胞の変性が生じた状態のことである。好ましくは網膜視細胞の変性が生じた状態のことである。網膜視細胞の変性は、杆体視細胞の変性又は錐体視細胞の変性のいずれでもよい。

[0015] 本実施形態において、網膜変性が抑制されるとは、本実施形態の医薬組成物を投与することにより、例えば、変性の進行が阻害されることや、変性の進行が遅延されること、変性状態が改善されること、変性状態が完全に消失することなどが挙げられる。

[0016] 本実施形態の医薬組成物を投与することにより、網膜における変性が生じた異常タンパク質の分解が促進されることや、ミトコンドリア機能が改善若しくは向上すること、及び／又は網膜視細胞の保護機能が改善若しくは向上すること等によって、網膜変性が抑制される。

[0017] 網膜変性の抑制を判断する指標は特に限定されることはないが、例えば、本実施形態の医薬組成物投与後の検体において、本実施形態の医薬組成物を投与していない対照検体と比較して、網膜細胞の数、特に網膜視細胞の数が増加することにより網膜変性が抑制されたと判断してもよく、網膜電図にて振幅が増加すること及び／又は潜時が短くなることにより網膜変性が抑制されたと判断してもよい。統計学的に有意差があることが好ましいが、必ずしも有意差があることは必要とはしない。

[0018] 本実施形態の治療対象となる網膜変性疾患は、網膜変性を引き起こす原因によらず、網膜細胞の変性が生じた疾患であれば特に限定されないが、網膜視細胞の変性が生じた疾患であることが好ましい。

具体的には、特に限定されないが、例えば、網膜色素変性、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、及びMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) に伴う網膜変性から選択される1つ以上の疾患が挙げられる。

[0019] 本実施形態において、治療とは疾患の発生を予防することも含む。

[0020] 本実施形態において、医薬組成物中のフェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体の含有量又はそれを含む医薬組成物の投与量若しくは投与方法は、該医薬組成物による治療効果が得られる限り特に限定されず、疾患の種類、疾患の程度、症状、患者の年齢、体重などによって適宜定めることができる。

[0021] 例えば、錠剤又は顆粒剤である場合、該医薬組成物中のフェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体の含有量は、医薬組成物1gあたり、10～1000mgであってよく、100～1000mgであってよい。液剤の場合、該医薬組成物中のフェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体の含有量は、例えば、0.001μg/mL～1000mg/mLであってよく、0.001μM～1000mMであってよい。

[0022] 本実施形態の医薬組成物の剤型は、投与方法に応じて適宜選択できる。例

例えば、経口投与の場合は、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等の固形製剤；溶液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤等の液剤等に製剤化することができる。また、非経口投与の場合は、注射剤、液剤、懸濁剤等に製剤化することができる。

[0023] 投与経路は、治療効果が得られる限り特に限定されず、経口投与、眼投与、静脈内投与、局所投与などであってよい。例えば、錠剤、顆粒剤、又は懸濁剤などの剤型で経口投与してもよく、注射剤として眼内などに局所投与してもよく、点眼剤として眼投与してもよい。

[0024] 本実施形態の医薬組成物の投与量は、フェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体に関しては、経口投与や静脈内投与等を行う場合は、例えば、体重60kgのヒトであれば、1日あたり0.001~100.0g/m²（体表面積）であってよく、0.01~50.0g/m²（体表面積）であってよく、0.1~30.0g/m²（体表面積）であってよく、1.0~20.0g/m²（体表面積）であってよく、9.9~13.0g/m²（体表面積）であってよく、0.1~10.0g/m²（体表面積）、0.1~1.0g/m²（体表面積）であってよい。上記投与量の医薬組成物は、1日1回で投与してもよく、1日数回に分けて投与してもよい。また、点眼剤として眼投与等を行う場合は、例えば、0.001μg/mL~1000mg/mLまたは0.001μM~1000mMの濃度の医薬組成物を片眼あたり1滴又は複数滴、1日1回又は複数回投与してもよい。

[0025] 本実施形態の医薬組成物は、本発明の効果を妨げない限り、追加の有効成分を含んでもよい。さらに、追加の疾患治療方法と組み合わせて使用してもよい。

[0026] 本実施形態の医薬組成物は、担体や添加剤が含まれていてもよい。ここで、担体としては、薬理的に許容される溶媒、希釈剤、賦形剤、結合剤などが挙げられ、液体状の医薬組成物の調製には例えば、水、生理食塩水、緩衝液などが用いられる。添加剤としては、安定剤、pH調整剤、増粘剤、抗酸化剤、等張化剤、緩衝剤、溶解補助剤、懸濁化剤、保存剤、凍害防止剤、凍結

保護剤、凍結乾燥保護剤、制菌剤などが挙げられる。

[0027] 本発明の他の実施形態は、フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜における小胞体ストレス関連分解を促進するための医薬組成物である。

[0028] 網膜における小胞体ストレス関連分解を促進するとは、特に限定されないが、例えば、XBP1s（XBP1 spliced form）、VCP（valosin-containing protein）、Derlin1（degradation in endoplasmic reticulum protein 1）などの小胞体ストレス関連分解に関連する分子マーカーの遺伝子発現量又はタンパク質発現量が増強されることである。この分子マーカーの発現量増強により、網膜に発生した異常タンパク質の分解を促進することができる。特に小胞体ストレス関連分解の促進により、異常なP23Hロドプシンに分解が促進されることにより、網膜変性を抑制することができる。

[0029] ここで各種分子マーカーの発現量増強とは、特に限定されないが、本実施形態の医薬組成物を投与した対象において、該医薬組成物を投与していない対照となる対象と比較して、該マーカーの遺伝子又はタンパク質発現量が増えたことを意味してもよい。

または、本実施形態の医薬組成物を投与した対象において、該マーカーの遺伝子又はタンパク質発現量が、予め設定されたカットオフ値を超えた場合に発現量が増強されたと判断してもよい。

[0030] 本実施形態における、フェニル酪酸の塩や誘導体の種類、医薬組成物中のフェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体の含有量又は医薬組成物の投与量、投与方法、剤形、追加の成分などは特に限定されず、上述の網膜変性抑制用医薬組成物における記載を準用できる。

[0031] 本発明の他の実施形態は、フェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜におけるミトコンドリア生合成を活性化するための及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能を改善するための医薬組成物であ

る。

[0032] 網膜におけるミトコンドリア生合成を活性化すると、特に限定されないが、例えば、Fis1 (Mitochondrial fission 1 protein) などのミトコンドリア分裂マーカ―や、LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) などのオートファジーマーカ―、若しくはMfn1 (mitofusin 1)、Mfn2 (mitofusin 2) などの融合マーカ―の遺伝子発現量又はタンパク質発現量が増強されること、またはミトコンドリア生合成調節因子であるPgc1- α (peroxisome proliferators-activated receptor- γ co-activator-1 α) 若しくはミトコンドリア転写因子であるTfam (mitochondrial transcription factor A) などの遺伝子発現量又はタンパク質発現量が増強されることである。これらの分子の遺伝子発現量又はタンパク質発現量の増強により、網膜においてミトコンドリアの生合成を活性化させ、かつ損傷を受けたミトコンドリアのマイトファジーを促進することができる。

また、網膜におけるミトコンドリアの代謝機能を改善すると、特に限定されないが、例えば、ミトコンドリア膜電位の増強や、シトクロムc酸化酵素I V (COX I V) の活性が増強されることである。

ミトコンドリア生合成が活性化され、ミトコンドリアの代謝機能が改善された結果、ミトコンドリアにおけるATPレベルが増加し、視細胞の保護を導くことができる。すなわち、本実施形態の医薬組成物を使用することにより、網膜変性を抑制することができる。

[0033] ここで各種分子マーカ―の発現量増強やミトコンドリア膜電位の増強、COX I Vの活性増強とは、特に限定されないが、本実施形態の医薬組成物を投与した対象において、該医薬組成物を投与していない対照となる対象と比較して、該マーカ―の遺伝子又はタンパク質発現量が増えたことや、ミトコンドリア膜電位が増強したこと、COX I Vの活性が増強したことを意

味してもよい。

または、本実施形態の医薬組成物を投与した対象において、該マーカの遺伝子又はタンパク質発現量、ミトコンドリア膜電位の測定値、若しくはC O X I V活性の測定値が、予め設定されたカットオフ値を超えた場合に、該マーカの遺伝子又はタンパク質発現量が増えた、ミトコンドリア膜電位が増強した、若しくはC O X I Vの活性が増強したと判断してもよい。

[0034] 本実施形態における、フェニル酪酸の塩や誘導体の種類、医薬組成物中のフェニル酪酸若しくはその塩又はそれらの誘導体の含有量、又は医薬組成物の投与量、投与方法、剤形、追加の成分などは特に限定されず、上述の網膜変性抑制用医薬組成物における記載を準用できる。

実施例

[0035] 実施例は、開示する目的のために記載されており、本発明の範囲を制限する意図はない。

[0036] <実験動物>

当業者に既知の方法により得られたP 2 3 Hノックインヘテロ接合型マウス(+/-、2週齢、オス)を(非特許文献2)、慶應義塾大学医学部の動物実験施設で、温度管理された部屋(22℃)で12時間の明暗サイクル(午前8時から午後8時まで点灯)で、餌と水を自由に摂取できる環境下で飼育した。すべての動物実験は、ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research及び慶應義塾動物実験委員会のガイドラインに準拠して実施した。

[0037] <組織学的解析>

マウスの眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド中で一晩、4℃で固定した。固定後、パラフィン包埋し(サクラファインテックジャパン、東京、日本)、視神経乳頭から網膜における最も離れた領域までを含む厚さ6~8μmの切片を作製し、脱パラフィン化した後、ヘマトキシリンとエオジンで染色した。切片は、デジタルカメラ(オリンパス株式会社、東京、日本)を

装着した顕微鏡で観察した。当業者に既知の方法により、視細胞層である外顆粒層 (outer nuclear layer: ONL) の厚さを、ONLの上部から下部までの距離を測定することによって評価し、杆体視細胞の外節 (outer segment: OS) の長さを、後上部網膜において視神経から500 μ mのところで、ImageJソフトウェア (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) を用いて、ヘマトキシリンおよびエオジン染色を観察することによって決定し、平均化した (非特許文献2~6)。

[0038] <リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)>

TRIzol試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、生後4週齢のマウス網膜から全RNAを単離した。RNA濃度をNanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、1 μ gのRNAをSuperScript VILLOマスターミックス (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、製造者の指示に従って逆転写した。以下の配列のプライマーを使用した。

グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gapdh) : フォワードプライマー5' - ACTTTCGGCCCATCTCTCA-3' (配列番号1) 及びリバープライマー5' - GATGACCCCTTTTGGCTCTCCAC-3' (配列番号2)。

Pgc1- α : フォワードプライマー5' - GATGAATACCGCAAAGAGCA-3' (配列番号3) 及びリバープライマー5' - AGATTTACGGTGCAATTCCT-3' (配列番号4)。

Fis1 : フォワードプライマー5' - ATATGCCTGGTGCCTGGTTC-3' (配列番号5) 及びリバープライマー5' - AGTCCCGCTGTTCTCTTTG-3' (配列番号6)。

M f n 1 : フォワードプライマー5' - G A T G T T C C A C C A G A G C T G G G A - 3' (配列番号7) 及びリバープライマー5' - A G G A G C C G C T C A T T C A C C C T T T T A - 3' (配列番号8)。

M f n 2 : フォワードプライマー5' - C C C C T C C T C A A G C A C T T T G G T T C - 3' (配列番号9) 及びリバープライマー5' - A C C C T G C T C T C T C C G T G T T G T A A A C - 3' (配列番号10)。

X b p 1 s : フォワードプライマー5' - C T G A G T C C G C A G C A G G T G - 3' (配列番号11) 及びリバープライマー5' - T G C C C A A A A G G A T A T C A G A C T - 3' (配列番号12)。

V C P : フォワードプライマー5' - A A G T C C C C A G T T G C C A A G G A T G - 3' (配列番号13) 及びリバープライマー5' - A G C C G A T G G A T T T G T C T G C C T C - 3' (配列番号14)。

D e r 1 1 : フォワードプライマー5' - C G C G A T T T A A G G C C T G T T A C - 3' (配列番号15) 及びリバープライマー5' - G G T A G C C A G C G G T A C A A A A A - 3' (配列番号16)。

T f a m : フォワードプライマー5' - A G T C A G C T G A T G G G T A T G G A G A A - 3' (配列番号17) 及びリバープライマー5' - T G C T G A A C G A G G T C T T T T T G G - 3' (配列番号18)。

L C 3 b : Mm00782868 (Taqman)。

Taqmanプローブ (Applied Biosystems、Thermo Fisher Scientific) を、Kir2.1 (Kcnj2としても知られる、カリウム内向き整流性チャネル、サブファミリーJ、メンバー2 ; Mm00434616)、Aqp4 (Mm00802131)、Kir4.1 (Kcnj10としても知られる、カリウム内向き整流性チャネル、サブファミリーJ、メンバー10 ; Mm00445028)、Kcnv2 (カリウムチャネル、サブファミリーV、メンバー2 (Mm00807577)、およびBCL2関連Xタンパク質 (Bax ; Mm0043205

0) を用いた。リアルタイムPCRをStepOnePlus™ PCRシステム (Applied Biosystems、Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて遺伝子発現を定量した。すべてのmRNAレベルはGapdhに正規化した。

[0039] <網膜電図 (electroretinogram (ERG)) のレコーディング>

当業者に既知の方法に基づき、マウスを少なくとも12時間暗順応させ、その後、ERGを実施する前に暗赤色灯下に置いた (非特許文献7~8)。マウスを腹腔内複合麻酔薬 [ミダゾラム4mg/kg体重 (サンドジャパン株式会社、東京、日本)、メドミジン0.75mg/kg体重 (日本全薬工業株式会社、福島、日本)、及びブトルファノール酒石酸塩5mg/kg体重 (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本)] で麻酔し、実験中は加熱パッドの上に置いたままにした。トロピカミドとフェニルフリンの混合物 (各0.5%; Mydrin-P (登録商標); 参天製薬、大阪、日本) を一滴使用して、マウスの瞳孔を拡張させた。活性金線電極を角膜上に配置し、設置電極と基準電極をそれぞれ尾部上と口内に配置した。

網膜電図のレコーディングは、PowerLabシステム2/25 (ADインスツルメンツ、ニューサウスウェールズ、オーストラリア) を用いて行った。全視野暗順応ERGは、 -2.1 から $2.9 \log \text{cd s/m}^2$ の範囲の刺激強度でのフラッシュ刺激への応答を測定した。明順応ERGは光適応10分後に測定した。 0.4 から $1.4 \log \text{cd s/m}^2$ の範囲のフラッシュ刺激への応答を、 30cd s/m^2 のバックグラウンドにて測定した。応答は差動増幅され、 0.3 から 1000Hz の範囲のデジタルバンドパスフィルタを介してフィルタリングされた。各刺激は、市販の刺激装置 (Ganzfeld System SG-2002; LKC Technologies, Inc.) を用いて行った。a波の振幅は、ベースラインからトラフまでを測定し、b波の振幅は、a波のトラフからb波のピークまでを測定した。a波とb波の潜時は、それぞれ刺激の開始から各波のピークまでを

測定した。ピークポイントはシステムによって自動的に算出され、試験者がその算出結果を確認した。

[0040] <細胞培養>

HEK293細胞(ATCC CRL-1573)を、10%ウシ胎児血清(Life technologies, Carlsbad, CA, USA)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium(#08456-65;ナカライテスク、京都、日本)、及び100unit/mlペニシリン及び100μg/mlストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)で維持した。

[0041] <統計解析>

すべての結果は、平均±標準偏差として表される。その結果値は、3群間の比較についてはTukeyのポストホック検定を用いた一方向ANOVAにより解析し、2群間の比較についてはSPSS Statistics 24(IBM, Armonk, NY, USA)ソフトウェアを用いたスチューデントの両側t検定により解析した。P<0.05で統計的に有意差があると判断した。

[0042] <実施例1 フェニル酪酸(PBA)がP23Hノックインヘテロ接合型マウス(P23H RPモデルマウス)における視細胞喪失を抑制した>

これまでに、P23Hノックインヘテロ接合型マウスでは、生後12日目までは視細胞層の厚さに変化はなく、内節(IS)と外節(OS)の長さは野生型(WT)と同程度であり、その後、徐々に網膜色素変性が進行することが報告されている(非特許文献9)。

本検討において、生後2週齢からPBAの連続投与を開始した。連続投与は、フェニル酪酸ナトリウム(4-フェニル酪酸ナトリウム(以下の各実施例でも同様);Sigma-Aldrich、10mg/kg体重)を、生後2週齢から週5回、毎日腹腔内投与することで行った。なお、腹腔内投与において、PBAは、体重(g)×10μLの量に調製して1日分の投与量を

1回で投与した。その結果、PBAを投与したP23H RPモデルマウスの網膜では、10週齢になると、残存する視細胞数（視細胞核数）がビヒクルを投与したマウスよりも有意に多くなったことが示された（図1A、B）。この結果から、P23H RPモデルマウスにおいて、PBA投与によって視細胞の生存が促進され、網膜変性が抑制されることが示された。

[0043] <実施例2 PBAはP23H RPモデルマウスの視覚機能を回復させた>

これまでに、P23H RPモデルマウスでは、6週齢で暗順応ERGによる杆体視細胞機能の障害が認められ、10週齢で明順応ERGによる錐体視細胞機能の障害が認められ、いずれも徐々に進行することが報告されている（非特許文献2）。

そのため、PBA治療による組織学的な改善が、より良い視覚機能の保持に寄与しているかどうかを調べるために、暗順応ERG（図2A-E）と明順応ERG（図2F-H）を測定した。P23H RPモデルマウスに、PBA（10mg/kg体重）を、生後2週齢から週5回、毎日腹腔内投与することで行った。なお、腹腔内投与において、PBAは、体重（g）×10μLの量に調製して1日分の投与量を1回で投与した。その結果、暗順応ERGにおいて、10週齢のPBA処理したP23H RPモデルマウスではビヒクル処理したマウスと比較して、杆体視細胞の機能を反映するa波の振幅が大きくなり、さらにその後の網膜神経機能を反映するb波の振幅が大きくなり、潜時が短くなることが示された。つまり、PBA処理の継続によって、杆体系の視覚機能が保護されることが示された。また、明順応ERGにおいて、主に錐体視細胞の機能を示すb波の潜時がPBA処理後に短くなり、P23H RPモデルマウスではPBA処理によって、錐体系の視覚機能も保護されることが示された。

[0044] <実施例3 PBAはP23H RPモデルマウスの網膜における小胞体ストレス関連分解（ERAD）及びミトコンドリアマーカの発現上昇を誘導した>

これまでにP23H変異ロドプシンがERストレスを引き起こす一方（非特許文献9～15）、異常タンパク質を分解するERADシステム（非特許文献16～17）がP23H RPモデルマウスで誘導されることも明らかになっている（非特許文献9）。また、ERADはIRE1に関連したXBP1のXBP1sへの変換によって活性化され、Derlin1と相互作用するVCP（Cdc48またはp97としても知られている）の誘導につながり、そのATPase活性を利用して、特定のミスフォールドされたタンパク質がERから細胞質へと輸送されること（非特許文献18）、さらにユビキチンプロテアソームシステム（UPS）を介してタンパク質が分解されることがこれまでに明らかになっている（非特許文献16～17）。

P23H RPモデルマウスの網膜における小胞体ストレス関連分解に関する検討を行った結果、実施例1及び2に記載するPBAの腹腔内投与により、XBP1s（図3A）、VCP（図3B）、Derlin1（図3C）の発現が亢進していることが示された。これらの結果から、PBAはERADの誘導を促進し、異常なP23Hロドプシンを除去することが示唆された。

[0045] これまでにERストレスはVCPによるミトコンドリアの分裂及び融合を制御することでミトコンドリアの品質管理にも影響を与えること（非特許文献18～19）、VCPはオートファジーにより異常なミトコンドリアを排除するために分裂を誘導すること（非特許文献19～20）、一方で融合関連タンパク質であるミトフシンタンパク質はUPSを介して分解を誘導することが明らかになっている（非特許文献18～19）。このシステムは細胞の恒常性を維持し（非特許文献21）、神経の可塑性と生存を維持することも明らかになっている（非特許文献22）。

P23H RPモデルマウスの網膜におけるミトコンドリアの分裂及び融合に関する検討を行った結果、実施例1及び2に記載するPBAの腹腔内投与により、ミトコンドリア分裂マーカーFis1（図3D）とオートファジーマーカーLC3（図3E）のmRNAレベルが上昇することが示された。

また、融合マーカーであるM f n 1（図3 F）とM f n 2（図3 G）のm R N AレベルもP B Aによって上昇することが示された。これらの結果から、V C Pがミトフシンタンパク質の分解を誘導することが示唆された。

[0046] ミトコンドリアの品質管理の間、損傷したミトコンドリアを新しい健康なミトコンドリアに置き換えるミトコンドリア生合成が行われる（非特許文献19、23）。ミトコンドリア生合成を調節することが知られているP g c 1- α と（非特許文献24）、呼吸に関連する分子をコードするミトコンドリアD N Aを誘導する転写因子であるT f a m（非特許文献25）のm R N Aレベルが実施例1及び2に記載するP B Aによって上昇することが示された（図3 H及びI）。これらの結果から、P B A処理により、ミトコンドリア生合成が活性化することが示された。

[0047] <実施例4 P B Aはミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（O X P H O S）をi n v i t r oで活性化した>

さらにP B Aにより生じる電位効果を解析するために、H E K 2 9 3細胞株を用いた検討を行った。各測定の前又は24時間前に、細胞を0~2.5 μ MのP B Aで処理した。ミトコンドリア膜電位は、細胞をテトラメチルローダミンメチルエステル（T M R E）（10 μ M）で、37℃、30分間インキュベートし、B A M 1 5（S i g m a - A l d r i c h）投与前後の平均輝度を、共焦点顕微鏡（T C S - S P 5；ライカ、東京、日本）を用いて測定し、次の計算式により算出した：膜電位=B A M 1 5添加前の平均輝度14秒間（7枚×2秒おき）/B A M 1 5添加直後の平均輝度14秒間（7枚×2秒おき）。シトクロムc酸化酵素（C O X I V）活性の測定は、保存用液体窒素で細胞を瞬間凍結した後、キットに付属の溶解バッファーに入れてから、製造業者の指示に従い、C o m p l e x I V R o d e n t E n z y m e A c t i v i t y M i c r o p l a t e A s s a y K i t（A b c a m）を用いて行った。発光シグナルを、C y t a t i o n

5システム（B i o T e k, W i n o o s k i, V T, U S A）を用いて測定した。A T P測定のために、瞬間凍結サンプルは、A T P B i o l u

minescence Assay Kit CLSII (Sigma-Aldrich) を用いて ATP 含有量を測定する前に、溶解緩衝液に入れ、発光シグナルを、Cytation 5 システム (BioTek) を用いて測定した。

この結果、HEK293 細胞株において、PBA は $Pgc1-\alpha$ (図 4 A) と $Tfam$ (図 4 B) を用量依存的に発現させた。ミトコンドリアの膜電位はミトコンドリアにおける ATP 合成に不可欠であり、ミトコンドリアのプロトノフォア脱共役剤である BAM15 はこの電位を打ち消す。BAM15 投与前後の電位の減算法を用いて、PBA で処理した細胞では膜電位が上昇した (図 4 C、D)。さらに、PBA によって、シトクロム c 酸化酵素 IV (COX IV) の活性が増加し (図 4 E)、その結果、ATP レベルが増加したことが示された (図 4 F)。これらの結果から、PBA がミトコンドリアの機能を増加させて、細胞保護に利用できる ATP レベルを獲得できることが示され、これにより病態改善につながることを示唆された (非特許文献 3、26～27)。

[0048] <実施例 5 PBA の経口投与により、P23H RP モデルマウスのミトコンドリアマーカーの発現上昇を誘導した>

PBA の経口投与による、P23H RP モデルマウスの網膜におけるミトコンドリア生合成関連因子の発現への影響に関する検討を行った。P23H RP モデルマウスに、PBA (200 mg/kg 体重) を、生後 2 週齢から生後 4 週齢まで、14 日間毎日経口投与することで行った。なお、経口投与において、PBA は、体重 (g) $\times$ 20 μ L の量に調製して 1 日分の投与量を 2 回に分けて投与した。すなわち、PBA を 200 mg/kg 体重で投与する場合、例えば体重が 20 g のマウスあたり PBA を 1 日 4 mg 投与することが必要であるため、100 mg/10 mL (PBS) の濃度となるように調製した PBA の懸濁液を 1 日 400 μ L (200 μ L $\times$ 2 回) 投与した。

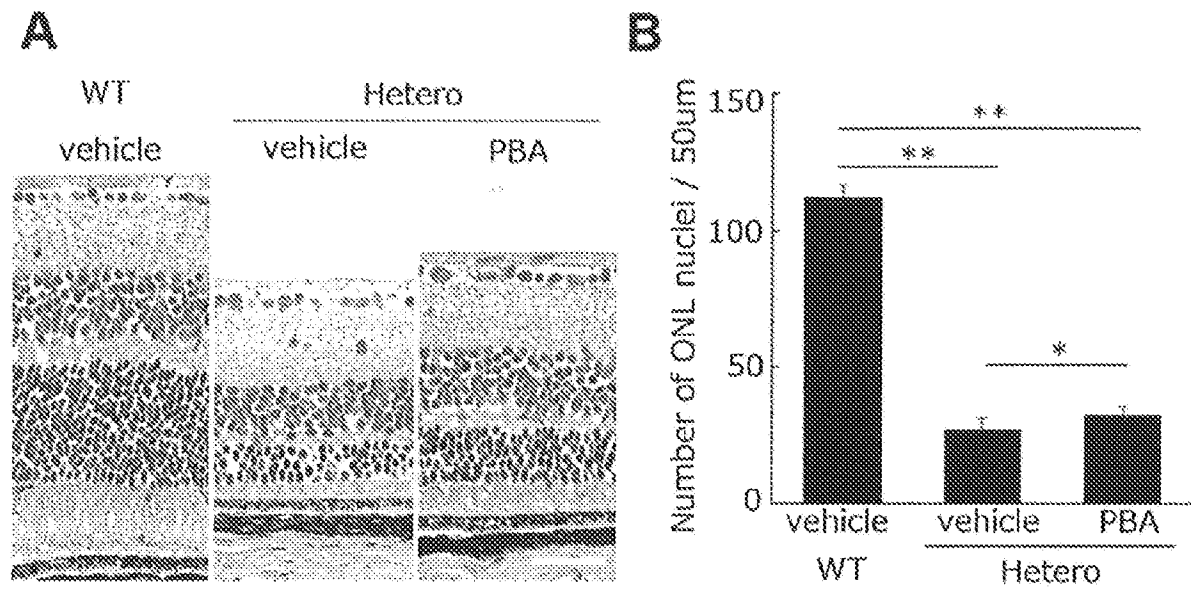
この結果、PBA を投与した群 (PBA 200 mg/kg) と対照群 (P

B Sを投与した群) とでは、投与初日から投与最終日に至るまで、体重に大きな差は生じず、また体重減少は見られなかった(図5)。その一方で、網膜内mRNA発現をリアルタイムPCRで確認したところ、PBAを投与した群は、対照群と比較して、ミトコンドリアマーカである $pgc1-\alpha$ 及び $tfam$ の発現が上昇した(図6)。このことはPBAの腹腔内投与のときと同様の結果を示すものである。

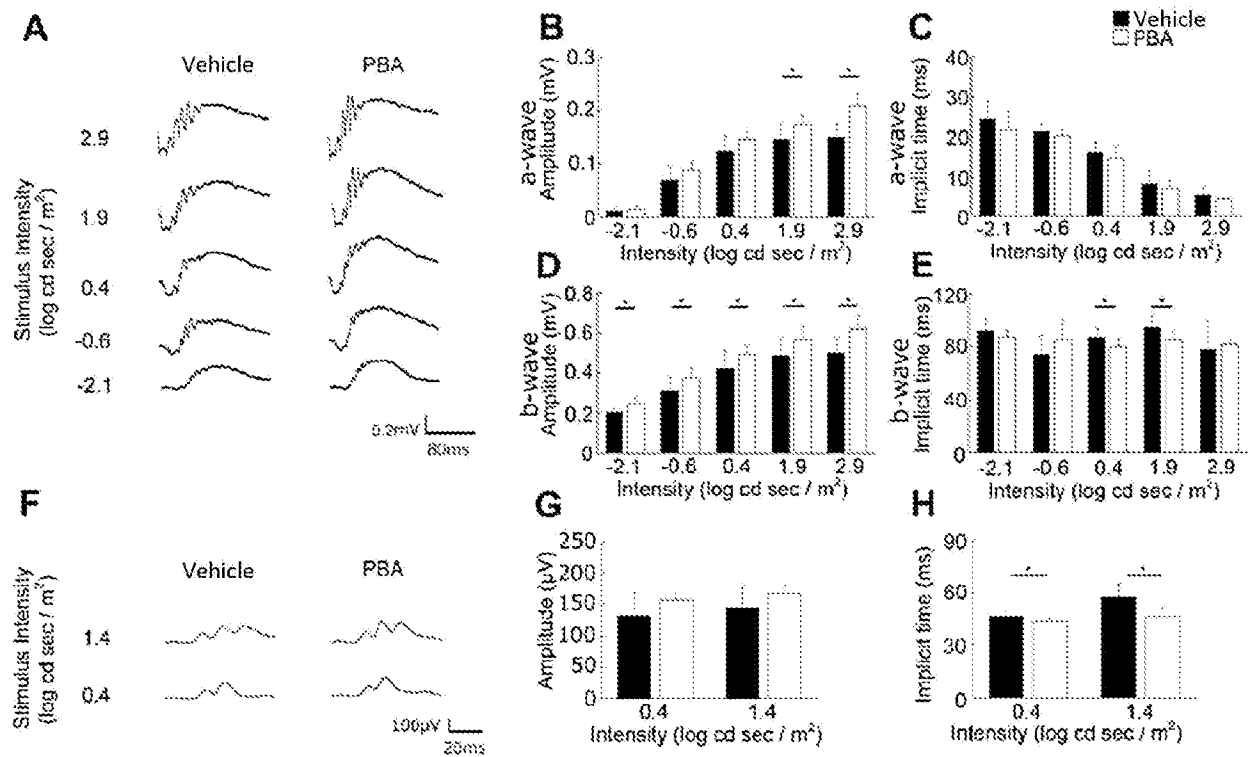
請求の範囲

- [請求項1] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜変性抑制用医薬組成物。
- [請求項2] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜変性疾患を治療又は予防するための、医薬組成物。
- [請求項3] 前記網膜変性疾患が、網膜視細胞が変性した疾患である、請求項2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記網膜変性疾患が、網膜色素変性、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、及びMELAS（mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes）に伴う網膜変性から選択される1つ以上の疾患である、請求項2又は3に記載の医薬組成物。
- [請求項5] フェニル酪酸の塩が、ナトリウム塩である、請求項1～4のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 錠剤、顆粒剤、懸濁剤、注射剤又は点眼剤である、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜における小胞体ストレス関連分解を促進するための医薬組成物。
- [請求項8] フェニル酪酸（PBA）若しくはその塩又はそれらの誘導体を含む、網膜におけるミトコンドリア生合成を活性化するための及び／又は網膜におけるミトコンドリアの代謝機能を改善するための医薬組成物。

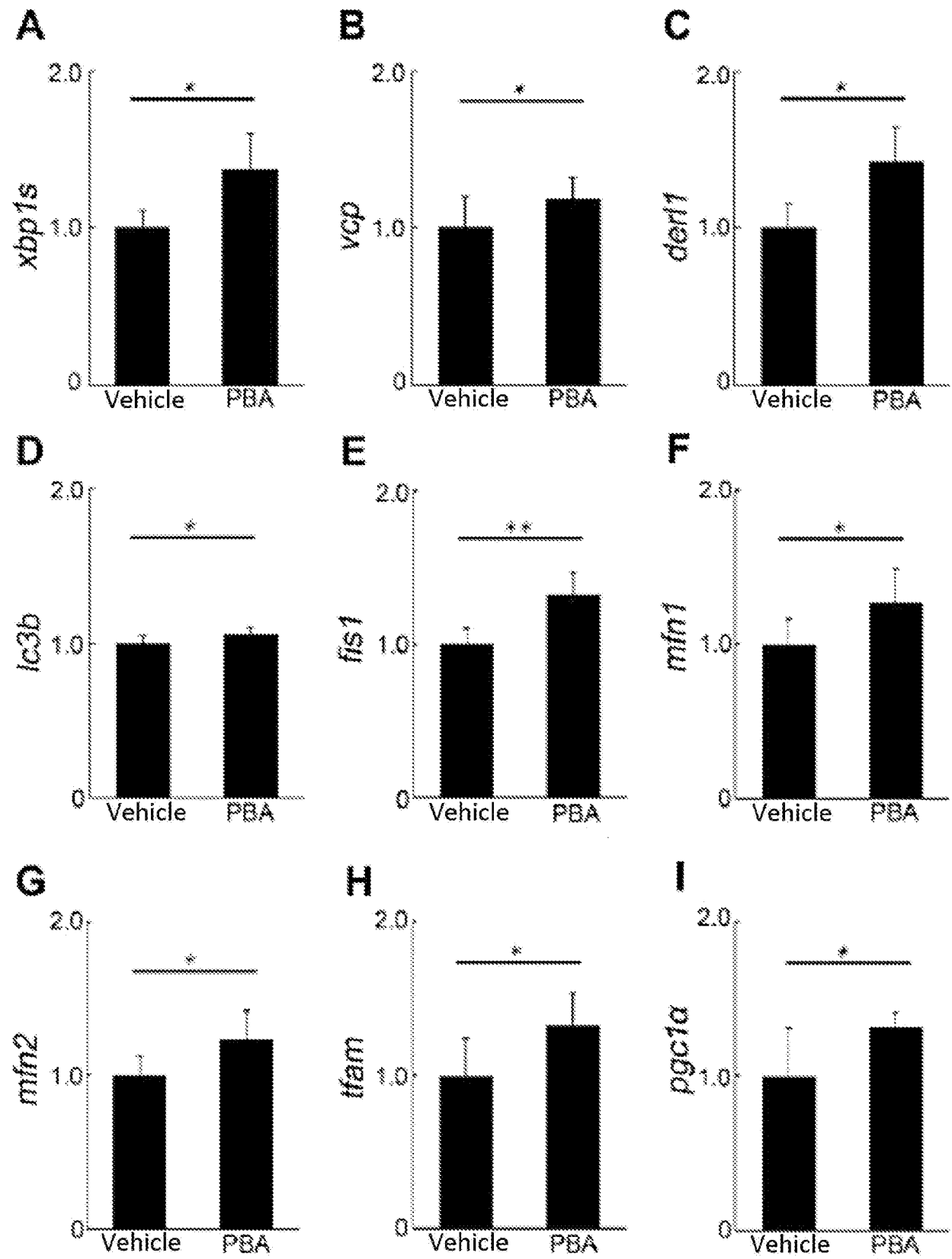
[図1]



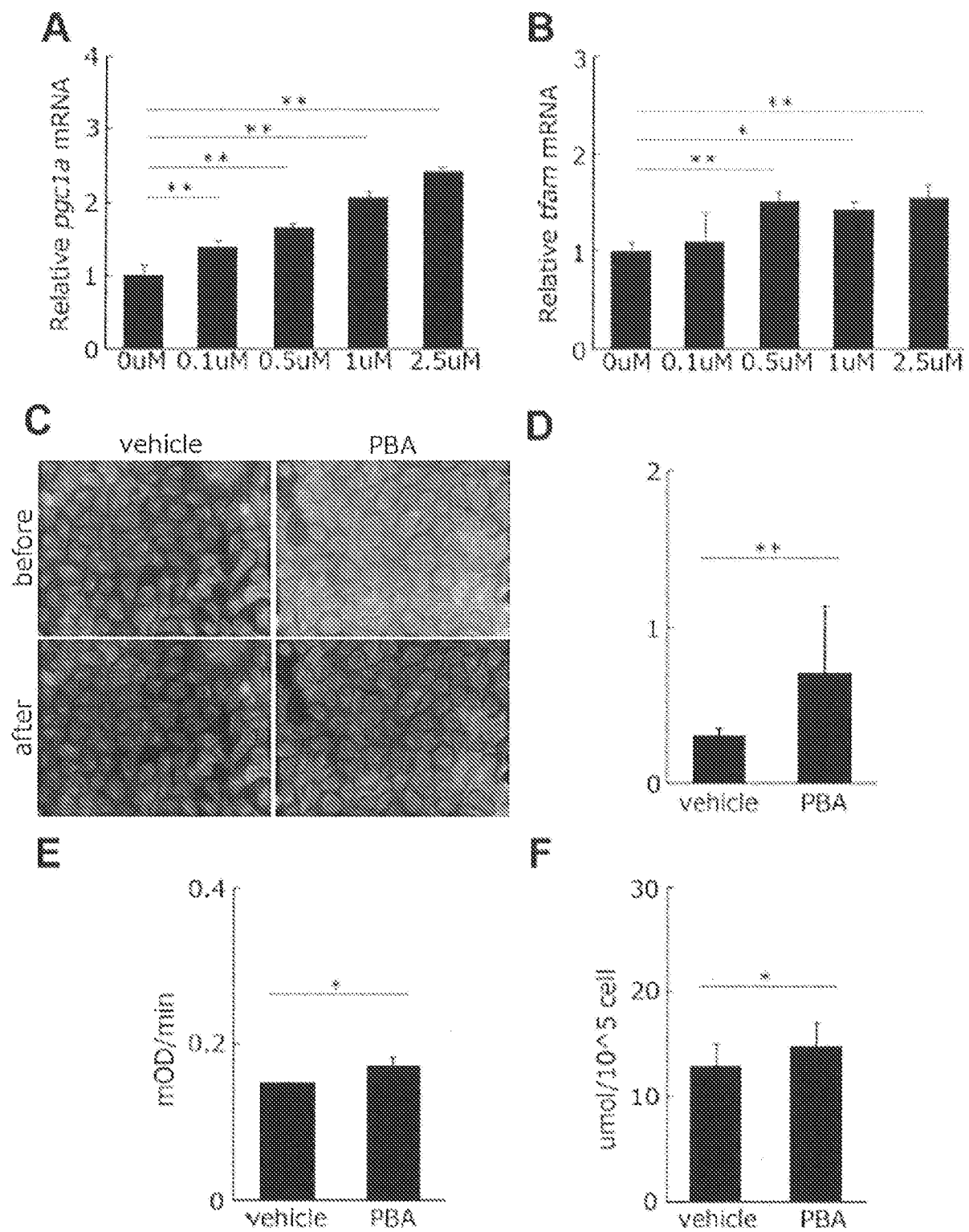
[図2]



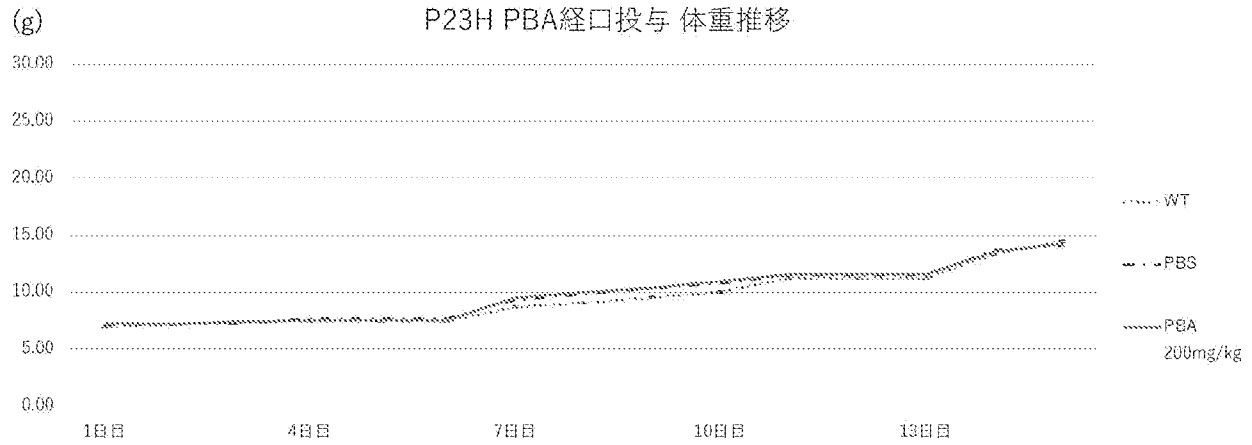
[図3]



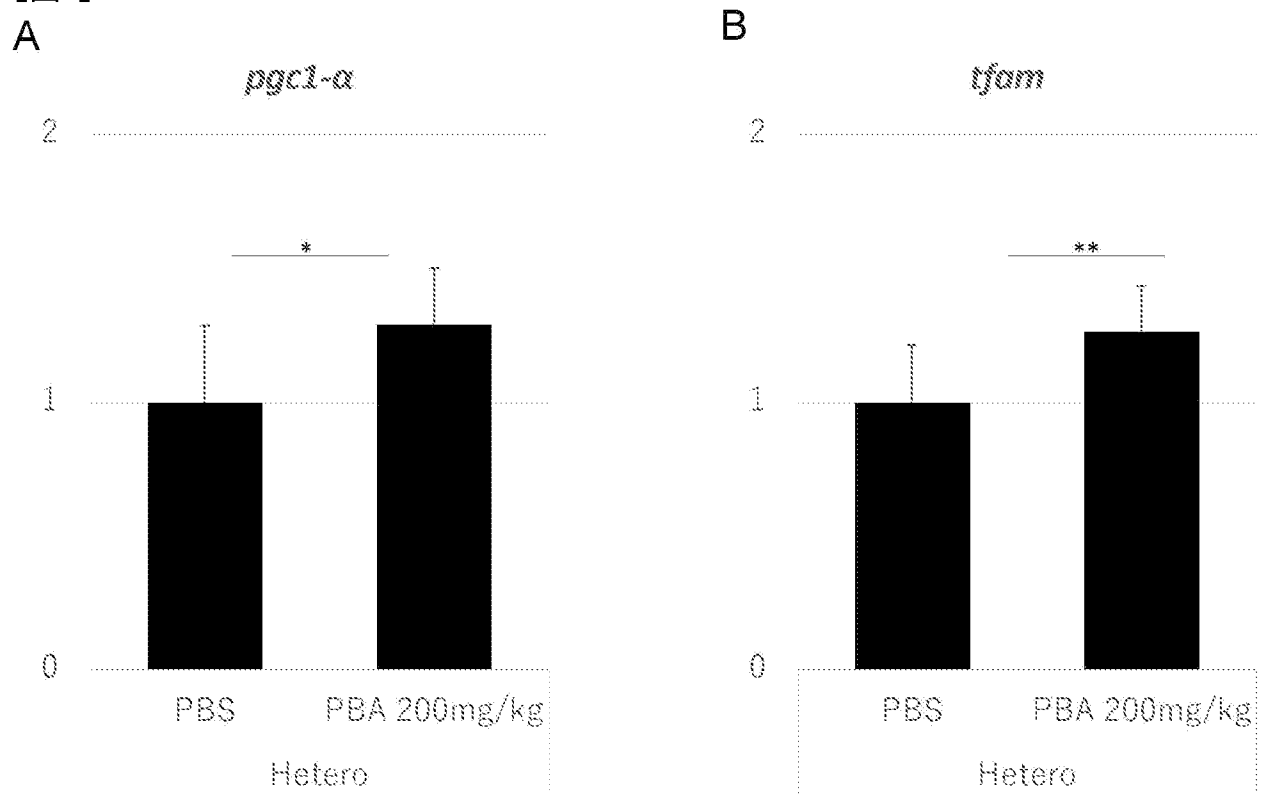
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/011209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 31/192**(2006.01)i; **A61P 27/02**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i

FI: A61K31/192 ZNA; A61P27/02; A61P43/00 107

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/192; A61P27/02; A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHRUTHI, K. et al. Ubiquitin-proteasome system and ER stress in the retina of diabetic rats. Archives of Biochemistry and Biophysics. 01 August 2017, vol. 627, pp. 10-20 outline, fig. 7, 9, 3.7 "Chemical chaperone prevents alterations in UPS, ERAD and ER stress in diabetic rats"	1-7
Y		8
Y	JP 2019-112338 A (UNIV KUMAMOTO) 11 July 2019 (2019-07-11) claim 1, paragraph [0015], example 9	8
Y	WO 2015/064768 A1 (KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIV CORP) 07 May 2015 (2015-05-07) paragraphs [0054], [0136]	8
Y	JP 2017-529344 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 05 October 2017 (2017-10-05) paragraph [0063], experiment examples 2-2 to 2-4	8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 2022

Date of mailing of the international search report

31 May 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAO, J. et al. Protective effect of shifting protein degradation from autophagy to proteasome on retinal degeneration in P23H mice. Investigative Ophthalmology & Visual Science. July 2019, vol. 60, no. 9, 288 abstract	1-7
X	LI, S. et al. Pharmacological Amelioration of Cone Survival and Vision in a Mouse Model for Leber Congenital Amaurosis. The Journal of Neuroscience. 25 May 2016, vol. 36, no. 21, pp. 5808-5819 "Materials and Methods", "Animals.", "Results", "PBA reduced cone degeneration in the KI mice", "PBA improved cone visual function in the KI mice but not in rd12 mice", fig. 6-8	1-6
A	WO 2018/164113 A1 (UNIV KEIO) 13 September 2018 (2018-09-13) examples 1-4	1-8
A	JP 2013-525451 A (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG) 20 June 2013 (2013-06-20) fig. 1-12	1-8
A	HUGO, F. et al. Pharmacological manipulation of gain-of-function and dominant-negative mechanisms in rhodopsin retinitis pigmentosa. Human Molecular Genetics. 17 July 2008, vol. 17, no. 19, pp. 3043-3054 fig. 2, table 1	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/011209

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/011209

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2019-112338	A	11 July 2019	(Family: none)	
WO	2015/064768	A1	07 May 2015	US 2016/0296505 A1 paragraphs [0081], [0199] EP 3064222 A1	
JP	2017-529344	A	05 October 2017	US 2017/0224754 A1 paragraph [0070], experimental examples 2-2 to 2-4 EP 3199171 A1 CN 108064160 A	
WO	2018/164113	A1	13 September 2018	US 2020/0150457 A1 examples 1-4 EP 3593817 A1 CN 110392579 A	
JP	2013-525451	A	20 June 2013	WO 2011/137173 A1 fig. 1-12 US 2012/0101074 A1 EP 2563119 A1 CN 103037691 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/192(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i FI: A61K31/192 ZNA; A61P27/02; A61P43/00 107		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K31/192; A61P27/02; A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	SHRUTHI, K et al., Ubiquitin-proteasome system and ER stress in the retina of diabetic rats, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017.08.01, Vol.627, p.10-20 概要, 図7, 図9, 3.7 [Chemical chaperone prevents alterations in UPS, ERAD and ER stress in diabetic rats]	1-7
Y		8
Y	JP 2019-112338 A (国立大学法人 熊本大学) 11.07.2019 (2019-07-11) 請求項1, [0015], 実施例9	8
Y	WO 2015/064768 A1 (京都府公立大学法人) 07.05.2015 (2015-05-07) [0054], [0136]	8
Y	JP 2017-529344 A (ユニバーシティ インダストリー コオペレーション グループ オブ キョンヒ ユニバーシティ) 05.10.2017 (2017-10-05) [0063], 実験実施例<2-2>-<2-4>	8
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.05.2022		国際調査報告の発送日 31.05.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 長谷川 茜 4C 2563 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	YAO, J et al., Protective effect of shifting protein degradation from autophagy to proteasome on retinal degeneration in P23H mice, Investigative Ophthalmology & Visual Science , 2019.07, Vol.60, No.9, 288 Abstract	1-7
X	LI, S et al., Pharmacological Amelioration of Cone Survival and Vision in a Mouse Model for Leber Congenital Amaurosis, The Journal of Neuroscience, 2016.05.25, Vol.36, No.21, p.5808-5819 「Materials and Methods」の「Animals.」, 「Results」の「PBA reduced cone degeneration in the KI mice」, 「PBA improved cone visual function in the KI mice but not in rd12 mice」, 図6～8	1-6
A	WO 2018/164113 A1 (学校法人 慶應義塾) 13.09.2018 (2018 - 09 - 13) 実施例1-4	1-8
A	JP 2013-525451 A (ザ・チャイニーズ・ユニバーシティ・オブ・ホンコン) 20.06.2013 (2013 - 06 - 20) 図1-12	1-8
A	HUGO, F et al., Pharmacological manipulation of gain-of-function and dominant-negative mechanisms in rhodopsin retinitis pigmentosa, Human Molecular Genetics, 2008.07.17, Vol.17, No.19, p.3043-3054 図2, 表1	1-8

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/011209

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2019-112338	A	11.07.2019	(ファミリーなし)	
WO	2015/064768	A1	07.05.2015	US 2016/0296505	A1
				[0081], [0199]	
				EP 3064222	A1
JP	2017-529344	A	05.10.2017	US 2017/0224754	A1
				[0070], experimental	
				example<2-2>-<2-4>	
				EP 3199171	A1
				CN 108064160	A
WO	2018/164113	A1	13.09.2018	US 2020/0150457	A1
				Example 1-4	
				EP 3593817	A1
				CN 110392579	A
JP	2013-525451	A	20.06.2013	WO 2011/137173	A1
				Figures 1-12	
				US 2012/0101074	A1
				EP 2563119	A1
				CN 103037691	A