

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7299889号

(P7299889)

(45)発行日 令和5年6月28日(2023.6.28)

(24)登録日 令和5年6月20日(2023.6.20)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

D

A 6 1 K 9/06 (2006.01)

A 6 1 K

9/06

A 6 1 K 9/08 (2006.01)

A 6 1 K

9/08

A 6 1 K 9/10 (2006.01)

A 6 1 K

9/10

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K

39/395

N

請求項の数 6 (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-531558(P2020-531558)

(86)(22)出願日 平成30年8月14日(2018.8.14)

(65)公表番号 特表2020-531581(P2020-531581
A)

(43)公表日 令和2年11月5日(2020.11.5)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/046578

(87)国際公開番号 WO2019/040311

(87)国際公開日 平成31年2月28日(2019.2.28)

審査請求日 令和3年5月24日(2021.5.24)

(31)優先権主張番号 62/547,854

(32)優先日 平成29年8月20日(2017.8.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 504256408

ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシ
ティ オブ カリフォルニアTHE REGENTS OF THE U
NIVERSITY OF CALIFO
RNIAアメリカ合衆国 9 4 6 0 7 カリフォル
ニア州, オークランド, フランクリン
ストリート 1 1 1 1 1 2 階1 1 1 1 Franklin Stree
t, 1 2 t h Floor, Oakla
nd, California 9 4 6 0 7
U . S . A .

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 緑内障を治療するためのW n t 5 a の調節

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

W n t 5 a 特異的阻害薬を含み、単位剤形の形態である、緑内障を治療するための眼科用製剤であって、該W n t 5 a 特異的阻害薬が、抗W n t 5 a 特異的抗体、またはW n t 5 a 特異的 s i R N Aである、眼科用製剤。

【請求項 2】

外用眼科用のゲル剤、軟膏剤、懸濁剤または液剤の形態である、請求項 1 の製剤。

【請求項 3】

前記剤形が、前記阻害薬を含有するコンタクトレンズ、点眼剤、デポ剤またはボーラス剤である、請求項 1 または 2 の製剤。

【請求項 4】

点眼剤ディスペンサーに充填されている、請求項 1、2 または 3 の製剤。

【請求項 5】

前房内注射用、結膜下注射用または硝子体内注射用のシリンジに充填されている、請求項 1、2、3 または 4 の製剤。

【請求項 6】

眼への直接的な外用による送達に適した添加剤および特性をさらに含み、該添加剤および該特性が、眼科用に適した透明性、p H 緩衝性、等張性、粘性、安定性および無菌性からなる群から選択される、請求項 1、2、3、4 または 5 の製剤。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本発明は、米国国立衛生研究所より交付された助成番号E Y 0 1 7 3 9 2およびE Y 0 2 8 9 9 5の助成に基づき、米国政府の支援を受けてなされたものである。米国政府は、本発明に関し一定の権利を有する。

【0002】

序論

緑内障は、米国国内で300万人を超える人々、世界全体では6000万人が罹患している大きな健康問題の1つである。2040年には、世界全体で1億1180万人が緑内障に罹患すると推定されている。緑内障の主要な危険因子の1つとして、眼圧上昇（IOP）が挙げられる。眼圧上昇は視神経に障害を与える可能性があり、治療を行わなければ、永久的に失明することもある。現在、緑内障を治癒させる方法はない。既存の点眼薬または経口薬は、効果が限られており、多くの副作用を伴う。また、手術は、瘢痕化や線維化が生じて奏功しないことも多い。

10

【0003】

房水は、前眼房および後眼房を満たす無色透明の液体である。房水は、後眼房の毛様体で産生され、前房隅角から線維柱帯とシュレム管を通る通常の経路で流出するとともに、ぶどう膜強膜流出路という副経路でも流出する。正常な眼では、房水の産生と流出の動的平衡が保たれ、IOPが正常範囲に維持されている。

【0004】

20

シュレム管（SC）は、前眼房の虹彩角膜角に存在する輪状の管である。シュレム管は、通常の房水流出システムの一部をなしており、ヒトでは眼から流出する房水の70～90%がシュレム管を通して流出する。シュレム管の内皮細胞からなる内層は、房水流出抵抗を示す主要な部位の1つで、IOPの主要な決定因子である。年齢とともに、あるいは病的な状況下でシュレム管の抵抗が増大すると、IOPが上昇し、不可逆的な視神経障害や視力喪失を伴う緑内障へと至る。したがって、シュレム管は緑内障治療の重要なターゲットである。我々は、最近、シュレム管が、リンパ管形成の主たる制御遺伝子であるProx-1を発現していることを初めて証明した（Truong TN, Li H, Hong YK, Chen L. Novel characterization and live imaging of Schlemm's canal expressing Prox-1. PLoS One. 2014; 9(5):e98245）。

30

【0005】

Wnt5aはWntファミリーに属しており、Wntファミリーには、哺乳動物で同定されている複数のリガンドや複数の受容体が含まれる。

【0006】

本明細書にて、我々は、Wnt5aがシュレム管で発現していること、そしてその発現量がずり応力の変化に応じて制御されることを開示する。

【0007】

さらに、Wnt5aを阻害することで、in vivoで効果的にIOPを低下させることが可能であることも開示する。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、緑内障または病因性眼圧を局所的に治療する方法および組成物を提供する。

【0009】

一態様において、本発明は、緑内障または病因性眼圧を治療する方法であって、治療を必要とする眼にWnt5a阻害薬を局所投与する工程を含む方法を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態において、

【0011】

50

- 前記投与工程は、点眼剤による送達、または前房内注射、結膜下注射もしくは硝子体内注射による送達を含み、

【0012】

- 前記阻害薬は、抗体、s i R N A、低分子干渉ペプチドおよび低分子阻害剤から選択され、

【0013】

- 前記阻害薬は、アデノ随伴ウイルス（A A V）またはレンチウイルスなどのウイルスベクターで送達され、かつ／または

【0014】

- 前記投与は外用であり、前記阻害薬は、外用眼科用のゲル剤、軟膏剤、懸濁剤または液剤の形態で投与される。

10

【0015】

別の一態様において、本発明は、緑内障または病因性眼圧を治療するための、単位剤形の形態であるW n t 5 a特異的阻害薬の眼科用製剤であって、該W n t 5 a特異的阻害薬が抗体、s i R N A、低分子干渉ペプチドおよび低分子阻害剤から選択される眼科用製剤を提供する。

【0016】

いくつかの実施形態において、

【0017】

- 前記製剤は、眼科用潤滑剤などの外用眼科用のゲル剤、軟膏剤、懸濁剤または液剤の形態であり、

20

【0018】

- 前記剤形は、前記阻害薬を含有するコンタクトレンズ、点眼剤、デポ剤またはポーラス剤であり、

【0019】

- 前記製剤は、点眼剤ディスペンサーに充填されており、

【0020】

- 前記製剤は、前房内注射用、結膜下注射用または硝子体内注射用のシリンジに充填されており、かつ／または

【0021】

30

- 前記製剤は、眼への直接的な外用による送達に適した添加剤および／または特性をさらに含み、該添加剤および／または該特性は、眼科用に適した透明性、p H緩衝性、等張性、粘性、安定性および無菌性からなる群から選択される。

【0022】

本発明には、本明細書に記載の個々の実施形態のすべての組み合わせが包含される。本発明の方法は、特定の実施形態を含む、開示されたあらゆる組成物を用いて実施してもよい。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書に記載されている実施例および実施形態は、単に本発明を説明するためのものであり、これらの実施例および実施形態に基づいて、様々な改変または変更が可能であることは当業者には明らかであり、またそのような改変または変更は本発明に含まれるものである。当業者であれば、種々の重要でないパラメータについては、変更または改変しても本質的に同様の結果が得られることは理解できるであろう。本発明は、本明細書において必須の構成要素としては開示されていない化合物、成分、要素または工程を含まなくてもよく、また、これらが存在しない状態で実施されてもよい。以下の記載および本明細書全体を通して、別異に解される場合または別段の記載がある場合を除き、「a」および「a n」という用語は、1以上を意味する。本明細書に引用されたすべての出版物、特許および特許出願、またこれらに記載の引用文献は、あらゆる目的のために、その全体が参照により本明細書に援用される。

40

50

【0024】

本開示のWnt5a阻害方法は、遺伝子操作、および/または低分子干渉RNA (siRNA)、抗体、低分子などの投与でありうる。低分子干渉RNA (siRNA)、抗体、低分子などの多くは、Applied Biological Materials社 (ABM、プリティッシュコロンビア州リッチモンド)、Life Technologies社 (ThermoFisher Scientific社)、Sigma-Aldrich社などの供給者から市販されている。上記方法は、眼圧の降下および緑内障の予防もしくは治療を目的として単独で使用してもよく、かつ/または緑内障の予防もしくは治療を目的として、点眼剤、投薬、レーザー、移植デバイスおよび手術などの他の治療法などと組み合わせて使用してもよい。

10

【0025】

典型的な実施例

【0026】

Wnt5aは、培養したヒト初代SC細胞での発現、またin vivoでもマウスのSC細胞での発現が確認されている。Wnt5aの発現は、ずり応力の変化に応じて制御されていることが、定量的リアルタイムPCRアッセイによる解析で明らかになっている。また、我々は、Wnt5aに特異的なsiRNAが、ヒトSC細胞のWnt5a発現をダウンレギュレートする作用を有するとともに、SC細胞の機能にも影響を与えることを確認している。SC特異的にWnt5a遺伝子を欠損させた条件付ノックアウトマウスでは、その同腹子であるコントロールマウスと比べて、緑内障モデルで誘導されるIOPの上昇が有意に抑制される。このノックアウトマウスと同腹子コントロールマウスとの間でベースラインのIOPに有意差はなかった。同腹子コントロールマウスでは、すべての測定時点でIOPの上昇が認められたが、Wnt5aノックアウトマウスでIOPの上昇が認められたのは初期の時点(24時間以内)のみであり、それ以降の時点ではIOPの上昇は認められなかった。このことから、Wnt5a介入により、IOPの上昇が持続できなくなることが示唆される。また、我々は、高眼圧症の制御において、wnt5a介入が、網膜神経線維層の保護およびSC透過性(上述した通常の流出システムによる水分移動を促進させるためのターゲット)の増加に有効であることも確認している(例えば、Tamら, Scientific Reports 7:40717, DOI: 10.1038/srep40717)。これらの実験は、Wnt5aが緑内障を制御するための有効な治療標的であることを示している。さらに、このような結果は、Huangら(Nature Communications, 2017; 8(1) DOI: 10.1038/s41467-017-00140-3)の方法を用いて行ったCRISPR遺伝子編集によるWnt5aの選択的阻害によっても示されている。

20

30

【0027】

次に、我々は、Wnt5a阻害薬としてのWnt5a siRNAの投与によるIOP降下効果を確認するための実験プロトコルを開発した。このプロトコルの実施に際して、Wnt5a特異的なsiRNAは市販のもの(ヒトWNT5A siRNA, Life Technologies社; Anastasら, J. Clin. Invest. 2014, 124, 2877-2890)を入手した。1つのプロトコルでは、Yuenら(2014, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014; 55:3320-3327)に記載の方法に従って、siRNAを結膜下注射する。siRNAまたはコントロールを投与するマウスをランダムに選択し、5 μ L (0.21 g/ μ L)の用量を、週2回、2週間結膜下注射する。別のプロトコルでは、Tamら(2017, Scientific Reports 7, 40717)に記載の方法に従って、siRNAを前房内注射する。マウスを腹腔内注射で麻酔して、瞳孔を拡大させる。まず、先端が平坦な引き伸ばしたガラス製マイクロ針で角膜に穴をあけて房水を抜く。穿孔後直ちに、先端が平坦な引き伸ばしたガラス製マイクロ針を10 μ L シリンジに取り付けて、穿孔した穴に挿入し、1 μ gのsiRNAを含むPBSを前眼房に1.5 μ L 注入する。反対側の眼には、同じ濃度のスクランブルsiRNAを含むPBSを同様に1.5

40

50

μL 注入する。これらの実験から、Wnt5a 阻害薬として結膜下注射または前房内注射により局所的に送達された Wnt5a 特異的 siRNA が、病因性 IOP の治療に有効であることが確認された。

【0028】

点眼剤として送達された siRNA が IOP に与える効果を評価するために、我々は、Martinez ら (Mol Ther. 2014 Jan; 22(1): 81-91) の方法に準じて、さらなるプロトコルを開発した。ニュージーランド白ウサギに、20 nmol/日の siRNA またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 4 日間連続で外用投与する。siRNA を投与した眼では、ビヒクル投与群と比較して IOP の有意な降下が認められる。IOP に対する siRNA の効果は、初回投与から 2 日後の時点で確認することができ、最終投与から 2 日後程度までベースラインレベルを下回る IOP 値が維持される。また、我々は、緑内障で観察されるような病態における Wnt5a siRNA の IOP 降下効果を評価するために、ニュージーランド白ウサギで経口水過負荷モデルを作製した。まず、4 種類の用量の siRNA (10 nmol、20 nmol、40 nmol および 60 nmol/片眼/日) を、高眼圧を誘導する 48 時間前、24 時間前および 2 時間前の合計 3 回投与する。いずれの投与も両眼に対して行い、IOP の測定は、高眼圧誘導前と経口過負荷後に行い、経口過負荷後の測定は 20 分毎に 120 分後まで行う。結果を解析したところ、Wnt5a siRNA は、投与したいずれの用量においても IOP の上昇を顕著に抑えることが示された。

【0029】

IOP に対する Wnt5a siRNA の効果および特異性を確認するために、1 群の動物数を増やし、用量を 40 nmol/片眼/日として 4 日間連続で投与する。投与 4 日目に水負荷により高眼圧を誘導する。コントロールの結果から、PBS を投与した動物では、高眼圧誘導から初めの 1 時間の間に水負荷によって IOP が上昇することが確認された。各測定時点での IOP 値を比較して解析したところ、siRNA の投与により、初めの 1 時間の間に、PBS を投与した動物と比較して ΔIOP 値が有意に低下した。スクランブル配列 siRNA の投与は IOP に何ら影響を与えなかったことから、この効果は特異的な効果である。

【0030】

次に、我々は、Wnt5a 阻害薬としての Wnt5a 特異的抗体の投与による IOP 降下効果を確認するための実験プロトコルを開発した。このプロトコルでは、ウサギ精製免疫グロブリンとして得られた抗ヒト WNT5A 抗体 (緩衝水溶液) (Sigma-Aldrich SAB1411396) と、マウスクローン 6F2 で産生された抗ヒト WNT5A モノクローナル抗体 (腹水) (Sigma-Aldrich SAB5300183) の 2 種類の抗体を使用するが、その他の Wnt5a 抗体、例えば Hanakira, Mol Cancer Ther 11(2) Feb 2012; および He ら, Oncogene. 2005, 24(18): 3054-3058 に記載されている抗体も使用可能である。上記のマウスとウサギのモデルの両方を使用して行った実験から、Wnt5a 阻害薬として点眼剤の形態で局所的に送達された Wnt5a 特異的抗体が、病因性 IOP の治療に有効であることが確認された。

【0031】

IOP および緑内障のその他のパラメータ、例えば、角膜浮腫、網膜神経節細胞 (RGC) 死、RNFL (網膜神経線維層) の菲薄化などに対する Wnt5a 中和抗体の治療効果を評価するために、例示的なモデルシステムにおいて、野生型正常マウスの右眼 (OD) で高眼圧を誘導し、Wnt5a 中和抗体を投与した。コントロール群では各マウスの右眼の IOP が有意に上昇したが、Wnt5a 抗体を投与した眼の IOP はそれより有意に低く、ベースラインレベルに維持されていた。また、光干渉断層計 (OCT) を用いて in vivo で中心角膜厚を測定したところ、Wnt5a 介入により、角膜浮腫が抑制されていた。IOP が上昇した後、コントロール群では角膜厚が増大したが、Wnt5a 抗体を投与した眼では角膜厚の増大は認められなかった。また、Wnt5a 抗体を投与した

眼では、W n t 5 a 介入により、R G C 死とともに R N F L 菲薄化も抑制された。R G C 死と R N F L 菲薄化の抑制は、それぞれ免疫染色と O C T によって確認した。これらの結果から、緑内障マウスモデルにおいて、外用による W n t 5 a 抗体介入により、I O P が有意に低下し、角膜と網膜が保護されることが確認された。

【 0 0 3 2 】

次に、我々は、W n t 5 a 特異的なアンタゴニストペプチドと低分子阻害剤との投与による I O P 低下効果を確認するための実験プロトコルをデザインした。このプロトコルでは、W n t 5 a の強力なアンタゴニストとして作用する、t - ブチルオキシカルボニル修飾 W n t 5 a 由来ヘキサペプチド (B o x 5) (J e n e i ら , P N A S U S A , 1 0 6 (4 6) , 1 9 4 7 3 - 8) と、比較的毒性が低く、安定性に優れた強力な W N T - 5 A 発現阻害剤である、6 , 7 - ジヒドロ - 1 0 α - ヒドロキシラジシコール (S h i n o n a g a ら , B i o o r g M e d C h e m . 2 0 0 9 J u l 1 ; 1 7 (1 3) : 4 6 2 2 - 3 5) とを使用する。この場合も、上記のマウスとウサギのモデルの両方を使用して行った実験から、W n t 5 a 阻害薬として点眼剤の形態で局所的に送達された、W n t 5 a 特異的な修飾ペプチドと W n t 5 a 発現の低分子阻害剤が、病因性 I O P の治療に有効であることが確認された。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 27/06 (2006.01)

F I

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 27/06

(72)発明者 チェン, ルー

アメリカ合衆国 9 4 7 0 4 カリフォルニア州, バークレイ, シャタック アヴェニュー 2 1 5 0
スイート 5 1 0

審査官 菊池 美香

(56)参考文献

国際公開第 2 0 0 3 / 0 8 6 3 3 4 (W O , A 1)

Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, Vol. 54, pp. 6502-9509

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 9 / 0 6

A 6 1 K 9 / 0 8

A 6 1 K 9 / 1 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 2 7 / 0 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)