(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
2025年4月17日(17.04.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/079538 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/02 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *C07K 7/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/035711

(22) 国際出願日： 2024年10月4日(04.10.2024)

(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 2023-175613 2023年10月11日(11.10.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人岩手大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION, IWATE UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目１８番８号 (JP).

(72) 発明者: 尾▲崎▼ 拓(**OZAKI Taku**); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目１８番８号 国立大学法人岩手大学内 (JP). 山下 哲郎(**YAMASHITA Tetsuro**); 〒0208550 岩手県盛岡市上田三丁目１８番８号 国立大学法人岩手大学内 (JP).

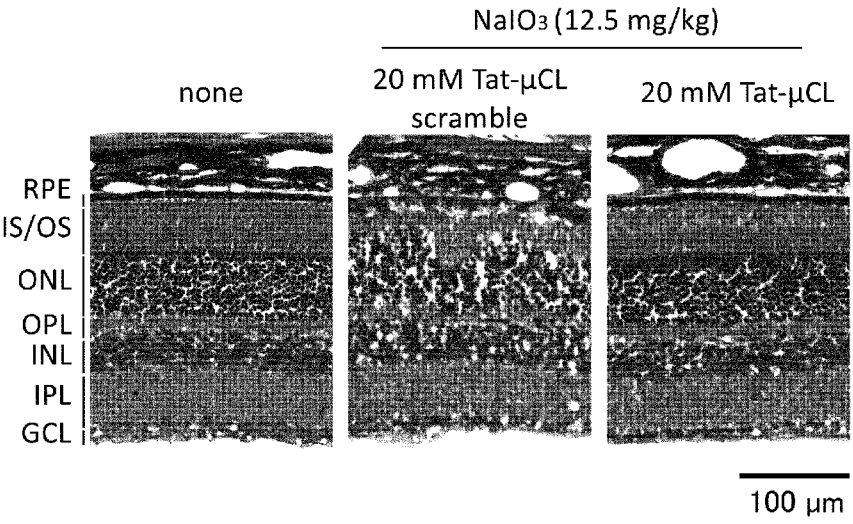
(74) 代理人: 辻田 幸史 (**TSUJITA Takashi**); 〒5900079 大阪府堺市堺区新町４－２２ 工電舎ビル４階Ａ号 (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

WO 2025/079538 A1

(54) **Title:** PROTECTIVE AGENT FOR RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS

(54) 発明の名称： 網膜色素上皮細胞の保護剤



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a protective agent for retinal pigment epithelial cells, which is useful for the prevention or treatment of age-related macular degeneration. A protective agent for retinal pigment epithelial cells according to the present invention, which is a solution for the problem, contains, as an active ingredient, a peptide in which a protein transduction domain is attached to the N-terminus of a peptide having an inhibitory effect on mitochondrial calpains. A specific example of the peptide having an inhibitory effect on mitochondrial calpains is a peptide comprising the amino acid sequence (PDALKSRTJR) represented by SEQ ID NO: 1 (wherein J represents L or I). A specific example of the protein transduction domain is a peptide comprising an amino acid sequence that is at least a part of the amino acid sequence for the transduction domain of HIV-1 Tat.

［続葉有］

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))

(57) 要約:本発明の課題は、加齢黄斑変性の予防や治療に有用な、網膜色素上皮細胞の保護剤を提供することである。その解決手段としての本発明の網膜色素上皮細胞の保護剤は、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのN末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とする。ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドの具体例としては、配列番号１に示すアミノ酸配列(ＰＤＡＬＫＳＲＴＪＲ)からなるペプチド(ＪはＬまたはＩである)が挙げられる。タンパク質伝達ドメインの具体例としては、ＨＩＶ－１ Ｔａｔの形質導入部位のアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

明　細　書

発明の名称 ： 網膜色素上皮細胞の保護剤

技術分野

[0001] 本発明は、網膜色素上皮細胞の保護剤に関する。

背景技術

[0002] 我々はモノを見る時、目の中に入ってきた光を網膜で光刺激として受け取り、その信号を脳へ送るために視神経に伝達する。こうしてモノを見るための重要な役割を担っている網膜の中心部に位置する黄斑が、加齢とともに障害を受けて視力の低下を引き起こす加齢黄斑変性（Ａｇｅ－ｒｅｌａｔｅｄ Ｍａｃｕｌａｒ Ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ：ＡＭＤ）は、加齢に伴う眼疾患の代表例の１つであり、全世界の患者数は約１億７０００万人にも上り、今後も患者数が上昇することが予測されている。加齢黄斑変性には、滲出型（ウエット型）加齢黄斑変性と萎縮型（ドライ型）加齢黄斑変性の２種類があり、両者は発症のメカニズムが異なるが、いずれも黄斑の下部に存在する網膜色素上皮細胞（Ｒｅｔｉｎａｌ Ｐｉｇｍｅｎｔ Ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ（ＲＰＥ）細胞）の機能損傷が視力の低下の要因となる。今日、加齢黄斑変性に対する治療は、滲出型加齢黄斑変性に対しては、網膜色素上皮細胞の機能損傷を招く脈絡膜からの新生血管の発生を抑制するための抗ＶＥＧＦ薬を眼球の中の硝子体内に注射する方法や光線力学的療法によって行われている。しかしながら、萎縮型加齢黄斑変性を治療するための有効な方法は存在しないのが現状である。こうした臨床的背景から、加齢黄斑変性を予防や治療する方法として、網膜色素上皮細胞を保護することによる方法が着目されており、例えば特許文献１では、（Ｓ）－４－フルオロ－５－（２－メチル－１，４－ジアゼパン－１－イルスルホニル）イソキノリンが、網膜色素上皮細胞に対する保護作用を有することが報告されている。けれども、網膜色素上皮細胞を保護することによって加齢黄斑変性を予防や治療する方法は確立されるには至っておらず、網膜色素上皮細胞に対する保護作用を有する

新たな成分の探索は、今なお意義深い状況にある。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１５－２２９６７１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] そこで本発明は、加齢黄斑変性の予防や治療に有用な、網膜色素上皮細胞の保護剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは上記の点に鑑みて鋭意検討を行った結果、本発明者らの研究グループが、特許第６１８３８７９号において網膜視細胞に対する保護作用を有することを報告した、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドが、網膜色素上皮細胞に対する優れた保護作用を有することを見出した。

[0006] 上記の知見に基づいてなされた本発明の網膜色素上皮細胞の保護剤は、請求項１記載の通り、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とする。

また、請求項２記載の網膜色素上皮細胞の保護剤は、請求項１記載の網膜色素上皮細胞の保護剤において、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドが、

（ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列（ＰＤＡＬＫＳＲＴＪＲ）からなるペプチド（ＪはＬまたはＩである）

（ｂ）配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端に最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチド

（ｃ）配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端の最大

で２個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換または欠失されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチド

のいずれかである。

また、請求項３記載の網膜色素上皮細胞の保護剤は、請求項１記載の網膜色素上皮細胞の保護剤において、タンパク質伝達ドメインが、ＨＩＶ－１Ｔａｔの形質導入部位のアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列からなるペプチドである。

また、本発明の加齢黄斑変性の予防および／または治療剤は、請求項４記載の通り、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とする。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、加齢黄斑変性の予防や治療に有用な、網膜色素上皮細胞の保護剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実施例１における加齢黄斑変性モデルマウスを用いた実験において、２０ｍＭのＴａｔ－μＣＬペプチドを点眼することで網膜色素上皮細胞層が保護されることを示す網膜切片の組織写真である。

[図2]同、網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の増加が抑制されることを示すグラフである。

[図3]同、網膜視細胞層の菲薄化が抑制されることを示すグラフである。

[図4]実施例２における加齢黄斑変性モデルマウスを用いた実験において、２ｍＭのＴａｔ－μＣＬペプチドを点眼することで網膜色素上皮細胞層が保護されることを示す網膜切片の組織写真である。

[図5]同、網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の増加が抑制されることを示すグラフである。

[図6]同、網膜視細胞層の菲薄化が抑制されることを示すグラフである。

[図7]実施例３における加齢黄斑変性モデルマウスを用いた実験において、２００μMのＴａｔ－μＣＬペプチドを点眼することで網膜色素上皮細胞層が保護されることを示す網膜切片の組織写真である。

[図8]同、網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の増加が抑制されることを示すグラフである。

[図9]同、網膜視細胞層の菲薄化が抑制されることを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明の網膜色素上皮細胞の保護剤は、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とするものである。ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドは、本発明者らの研究グループが、特許第６１８３８７９号において網膜視細胞に対する保護作用を有することを報告したペプチドである。

[0010] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドにおけるミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドとしては、配列番号１に示すアミノ酸配列（ＰＤＡＬＫＳＲＴＪＲ）からなるペプチド（ＪはＬまたはＩである）が挙げられる。ＪがＬであるアミノ酸配列からなるペプチドは、アクセッション番号：ＮＰ＿０６２０２５．１で特定されるラットのμ－カルパインの活性サブユニット（ＣＡＰＮ１やμＣＬとも呼ばれる）のドメインＩＩＩのアミノ酸配列に含まれるものである。μ－カルパインの活性サブユニットのドメインＩＩＩはＣ２Ｌ（Ｃ２様）ドメインとも呼ばれる機能ドメインである。ＪがＩであるアミノ酸配列からなるペプチドは、アクセッション番号：ＮＰ＿００５１７７で特定されるヒトのμ－カルパインの活性サブユニットのドメインＩＩＩのアミノ酸配列に含まれるものである。ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドにおけるミトコンドリアカルパイン

に対して阻害作用を有するペプチドは、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端に最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドであってもよい。その具体例としては、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端に最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するペプチド（例えば配列番号２に示すアミノ酸配列からなるペプチド）、配列番号１に示すアミノ酸配列のＣ末端に最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するペプチド（例えば配列番号３に記示すアミノ酸配列からなるペプチド）、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端とＣ末端にそれぞれ最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するペプチド（例えば配列番号４に示すアミノ酸配列からなるペプチド）などが挙げられる。また、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドにおけるミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドは、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端の最大で２個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換または欠失されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドであってもよい。

[0011] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端に付加されるタンパク質伝達ドメイン（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ Ｄｏｍａｉｎ，ＰＴＤ）は、それ自身のみならず自身に結合した他のオリゴヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、オリゴ糖などの化合物を細胞膜燐脂質の二重層を通過させる作用を有する細胞浸透性ペプチドとして公知のものを用いることができる。その具体例としては、ＨＩＶ－１ Ｔａｔの形質導入部位のアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列からなるペプチド、３～１２個のアルギニンからなるペプチド、３～１２個のリシンからなるペプチド、３～１６個のヒスチジンからなるペプチド、ＰＥＰ－１ペプチド、ＡＮＴＰ、ＶＰ２２タンパク質などが挙げられる（必要であればＭｏｒｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１９：１１

７３－１１７５，２００１、Ｓｃｈｗａｒｚｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１０：２９０－２９５，２０００、Ｖｉｖｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：１６０１０－１６０１７，１９９７などを参照のこと）。ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端に付加することが望ましいタンパク質伝達ドメインとしては、ＨＩＶ－１ Ｔａｔの形質導入部位のアミノ酸配列の４９～５７番に該当する配列番号５に示すアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号５に示すアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されたアミノ酸配列からなり（置換の個数と欠失の個数は最大で５個、付加の個数は最大で１０個）、かつ、それ自身のみならず自身に結合した他のオリゴヌクレオチド、ペプチド、タンパク質、オリゴ糖などの化合物を細胞膜燐脂質の二重層を通過させる作用を有するペプチド、３～１６個のヒスチジンからなるペプチドが挙げられる。Ｎ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されたミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドの具体例としては、配列番号６に示すアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。

[0012] なお、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドは、自体公知の方法、例えばペプチド合成装置を用いた化学合成によって調製することができる他、遺伝子工学的手法などによって調製することもできる。

[0013] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドは、網膜色素上皮細胞に対する優れた保護作用を有するので、網膜色素上皮細胞の機能損傷が視力の低下の要因となる加齢黄斑変性の予防や治療に有用である。ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドをヒトやヒト以外の動物に投与する場合の投与方法は、特段制限されるものではなく、投与方法に適した形態に自体公知の方法で製剤化して行うことができるが、製剤形態は侵襲性がない点眼剤

であることが望ましい。

[0014] 点眼剤は、有効成分であるミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドとともに、緩衝剤、溶解補助剤、等張化剤、安定化剤、保存剤、粘稠剤、キレート剤、ｐＨ調整剤、清涼化剤などの各種の添加剤を、溶剤に配合し、無菌環境下で無菌ろ過して適当な滅菌容器に充填することで調製することができる。緩衝剤の具体例としては、ホウ酸やその塩（ホウ砂など）、クエン酸やその塩（クエン酸ナトリウムなど）、リン酸やその塩（リン酸一水素ナトリウムなど）、酒石酸やその塩（酒石酸ナトリウムなど）、グルコン酸やその塩（グルコン酸ナトリウムなど）、酢酸やその塩（酢酸ナトリウムなど）、各種のアミノ酸、これらの組み合わせが挙げられる。溶解補助剤の具体例としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油６０など）、ポリエチレングリコール（マクロゴール４０００など）、ポリオキシエチレンソルビタン高級脂肪酸エステル（ポリソルベート８０など）、ポリオキシエチレン（ＰＯＥ）－ポリオキシプロピレン（ＰＯＰ）ブロックコポリマー（ポロクサマー４０７など）、プロピレングリコールが挙げられる。等張化剤の具体例としては、無機塩類（塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなど）、糖類（マンニトール、グルコースなど）、多価アルコール（グリセリン、プロピレングリコールなど）が挙げられる。安定化剤の具体例としては、エデト酸ナトリウム、シクロデキストリン、亜硫酸塩、クエン酸やその塩、ブチルヒドロキシトルエンが挙げられる。保存剤の具体例としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クロロブタノール、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、ｐｏｌｙｑｕａｒｔｅｎｉｕｍ－１、ｐｏｌｙａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌｂｉｇｕａｎｉｄｅ、塩酸アルキルアミノエチルグリシン、塩化セチルピリジニウム、チメロサールが挙げられる。粘稠剤の具体例としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルア

ルコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、カルボキシビニルポリマーが挙げられる。キレート剤の具体例としては、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムが挙げられる。ｐＨ調整剤の具体例としては、塩酸、クエン酸やその塩、ホウ酸やその塩、リン酸やその塩、酢酸やその塩、酒石酸やその塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムが挙げられる。清涼化剤の具体例としては、メントール、ボルネオール、カンフル、ゲラニオール、リモネン、オイゲノール、ハッカ油、ユーカリ油、ウイキョウ油、ベルガモット油が挙げられる。溶剤の具体例としては、滅菌精製水、精製水、生理食塩液が挙げられる。点眼剤のｐＨは眼科的に許容される範囲であれば特に制限はなく、通常ｐＨ４～９の範囲であり、望ましくはｐＨ５～８の範囲である。

[0015] 有効成分であるミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドは、点眼剤１ｍＬあたり０．００００１～１００ｍｇ配合され、１回あたり１～数滴を１日あたり１～数回点眼することで、網膜色素上皮細胞を保護することにより、加齢黄斑変性に対する予防効果や治療効果を発揮する。

実施例

[0016] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明は以下の記載に限定して解釈されるものではない。

[0017] 実施例１：ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドの網膜色素上皮細胞に対する保護作用（加齢黄斑変性モデルマウスに点眼することによる効果）その１

（実験方法）

萎縮型加齢黄斑変性のモデル実験系として広く用いられているヨウ素酸ナトリウム（ＳＩ）投与マウス（Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ　Ｏｐｈｔｈａ

Ｉｍｏｌｏｇｙ　＆　Ｖｉｓｕａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，５８，２２３９－２２４９，２０１７）を用いて、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドの点眼効果を評価した。具体的には、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドとして、配列番号６に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＰＰＱＰＤＡＬＫＳＲＴＬＲ）からなるペプチド（以下「Ｔａｔ－μＣＬペプチド」と略称する。特許第６１８３８７９号に記載のμ－Ｎ２－１０－２（ＨＩＶ－Ｎμ）ペプチドと同じ）を、２０ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を、マウス（Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ，８週齢）の両眼に、１日３回、２μＬずつ７日間前点眼した。前点眼後、生理食塩水にＳＩを溶解してろ過滅菌した溶液を腹腔内に投与することで、ＳＩを１２．５ｍｇ／ｋｇ投与し、さらに、Ｔａｔ－μＣＬペプチドを２０ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を、両眼に、１日３回、２μＬずつ７日間点眼した。７日後、マウスを安楽死させ、両眼球を摘出し、４％パラホルムアルデヒドで固定し、前眼部および水晶体を切除した。次いで、組織の凍結切片スライドを作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い、位相差顕微鏡にて観察し、網膜色素上皮細胞層（ＲＰＥ）由来の沈着物（変性した網膜色素上皮細胞が集まって色素沈着として現れるもの）数の計測を行った。さらに、視神経乳頭中心部から鼻側および耳側それぞれ約３００，６００，９００，１２００，１５００μｍの位置における画像を取得し、網膜視細胞層（ＯＳ＋ＩＳ）の厚さの測定を行った。

[0018]（実験結果）

図１に網膜切片の組織写真を、図２に網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の計測結果を、図３に視神経乳頭中心部から鼻側および耳側それぞれ約３００，６００，９００，１２００，１５００μｍの位置における網膜視細胞層の厚さの測定結果を示す（２０ｍＭ　Ｔａｔ－μＣＬ、図２の計測結果と図３の測定結果は３匹のマウスの両眼からの検体（ｎ＝６）の平均値）。なお

、図１～３には、Ｔａｔ－μＣＬペプチドを２０ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液のかわりに、Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列をランダムに並び替えた配列番号７に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＡＳＬＲＬＤＲＰＴＫ）からなるペプチド（以下「Ｔａｔ－μＣＬスクランブルペプチド」と略称する）を２０ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を用いて同様の実験を行った場合の結果（２０ｍＭ　Ｔａｔ－μＣＬ　ｓｃｒａｍｂｌｅ）と、眼球にいかなる投与も行っていない健常マウスの結果（ｎｏｎｅ）をあわせて示す。図１と図２から明らかなように、Ｔａｔ－μＣＬペプチドは、２０ｍＭの点眼によって、網膜色素上皮細胞層を効果的に保護した。図３から明らかであるＴａｔ－μＣＬペプチドの投与による網膜視細胞層の菲薄化の抑制は、Ｔａｔ－μＣＬペプチドが網膜色素上皮細胞層を保護したことによる２次的な効果であると考察された。

[0019] 実施例２：ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドの網膜色素上皮細胞に対する保護作用（加齢黄斑変性モデルマウスに点眼することによる効果）その２

Ｔａｔ－μＣＬペプチドを２ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液と、Ｔａｔ－μＣＬスクランブルペプチドを２ｍＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を用いて実施例１と同様の実験を行った。図４に網膜切片の組織写真を、図５に網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の計測結果を、図６に視神経乳頭中心部から鼻側および耳側それぞれ約３００，６００，９００，１２００，１５００μｍの位置における網膜視細胞層の厚さの測定結果を示す（ｎｏｎｅは眼球にいかなる投与も行っていない健常マウスの結果）。図４～図６から明らかなように、Ｔａｔ－μＣＬペプチドは、２ｍＭの点眼によっても、網膜色素上皮細胞層を効果的に保護し、網膜視細胞層の菲薄化を抑制した。

[0020] 実施例３：ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドの

Ｎ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドの網膜色素上皮細胞に対する保護作用（加齢黄斑変性モデルマウスに点眼することによる効果）その３

Ｔａｔ－μＣＬペプチドを２００μＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液と、Ｔａｔ－μＣＬスクランブルペプチドを２００μＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を用いて実施例１と同様の実験を行った。図７に網膜切片の組織写真を、図８に網膜色素上皮細胞層由来の沈着物数の計測結果を、図９に視神経乳頭中心部から鼻側および耳側それぞれ約３００，６００，９００，１２００，１５００μｍの位置における網膜視細胞層の厚さの測定結果を示す（ｎｏｎｅは眼球にいかなる投与も行っていない健常マウスの結果）。図７～図９から明らかなように、Ｔａｔ－μＣＬペプチドは、２００μＭの点眼によっても、網膜色素上皮細胞層を効果的に保護し、網膜視細胞層の菲薄化を抑制した。

[0021]（実施例１～３の実験結果のまとめ）

特許第６１８３８７９号において、本発明者らの研究グループは、Ｔａｔ－μＣＬペプチドが網膜視細胞に対する保護作用を有することを報告したが、点眼によって作用を確認することができた濃度は４０ｍＭであった。この点に鑑みれば、Ｔａｔ－μＣＬペプチドが、点眼によって網膜視細胞に対する保護作用を有することを確認することができた濃度の１／１００を下回る濃度で、点眼によって網膜色素上皮細胞に対する保護作用を有することを確認することができたことは、本発明者らにとって予測していなかった驚くべき結果であり、Ｔａｔ－μＣＬペプチドに例示されるミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドは、加齢黄斑変性を侵襲性がない方法で予防や治療するために有用であることを示すことができた。

[0022] 実施例４：様々なミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドの網膜色素上皮細胞に対する保護作用（加齢黄斑変性モデルマウスに点眼することに

よる効果）

ペプチド合成装置を用いた化学合成によって調製した以下の９種類のペプチドを、それぞれ２００μＭになるように生理食塩水に溶解してろ過滅菌した溶液を用いて実施例１と同様の実験を行った。その結果、いずれのペプチドも、Ｔａｔ－μＣＬペプチドと同様に、２００μＭの点眼によって網膜色素上皮細胞に対する保護作用を有することを確認することができた。

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列のＮ末端に５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列（配列番号２に示すアミノ酸配列）に変更した配列番号８に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＩＣＮＬＴＰＤＡＬＫＳＲＴＬＲ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列のＣ末端に５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列（配列番号３に示すアミノ酸配列）に変更した配列番号９に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＰＤＡＬＫＳＲＴＬＲＮＷＮＴＴ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列のＮ末端とＣ末端にそれぞれ５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列（配列番号４に示すアミノ酸配列）に変更した配列番号１０に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＩＣＮＬＴＰＤＡＬＫＳＲＴＬＲＮＷＮＴＴ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列のＮ末端の２個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列に変更した配列番号１１に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＡＬＫＳＲＴＬＲ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸配列のＣ末端の２個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列に変更した配列番号１２に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＰＤＡＬＫＳＲＴ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのμＣＬの部分のアミノ酸配列を、そのアミノ酸

配列のＮ末端とＣ末端のそれぞれ２個のアミノ酸が欠失されたアミノ酸配列に変更した配列番号１３に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＡＬＫＳＲＴ）からなるペプチド

・配列番号１２に示すアミノ酸配列のＣ末端にアラニンが付加された配列番号１４に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＰＤＡＬＫＳＲＴＡ）からなるペプチド

・配列番号１に示すアミノ酸配列のＣ末端側から数えて２個目のロイシンがイソロイシンに置換された配列番号１５に示すアミノ酸配列（ＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲＰＰＱＰＤＡＬＫＳＲＴＩＲ）からなるペプチド

・Ｔａｔ－μＣＬペプチドのＴａｔの部分のアミノ酸配列を、６個のヒスチジンからなるアミノ酸配列に変更した配列番号１６に示すアミノ酸配列（ＨＨＨＨＨＨＰＤＡＬＫＳＲＴＬＲ）からなるペプチド

産業上の利用可能性

[0023] 本発明は、加齢黄斑変性の予防や治療に有用な、網膜色素上皮細胞の保護剤を提供することができる点において産業上の利用可能性を有する。

請求の範囲

[請求項1] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とする、網膜色素上皮細胞の保護剤。

[請求項2] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドが、

（ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列（ＰＤＡＬＫＳＲＴＪＲ）からなるペプチド（ＪはＬまたはＩである）

（ｂ）配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端に最大で５個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチド

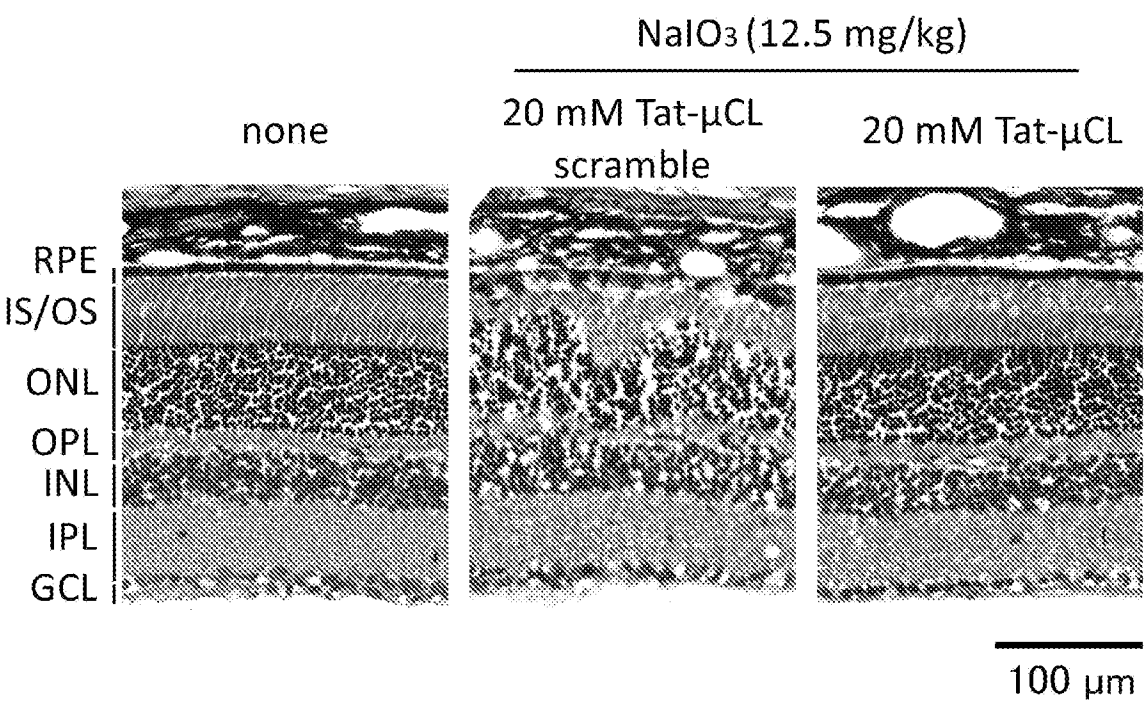
（ｃ）配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端および／またはＣ末端の最大で２個のアミノ酸が、他のアミノ酸に置換または欠失されたアミノ酸配列からなり、かつ、ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチド

のいずれかである、請求項１記載の網膜色素上皮細胞の保護剤。

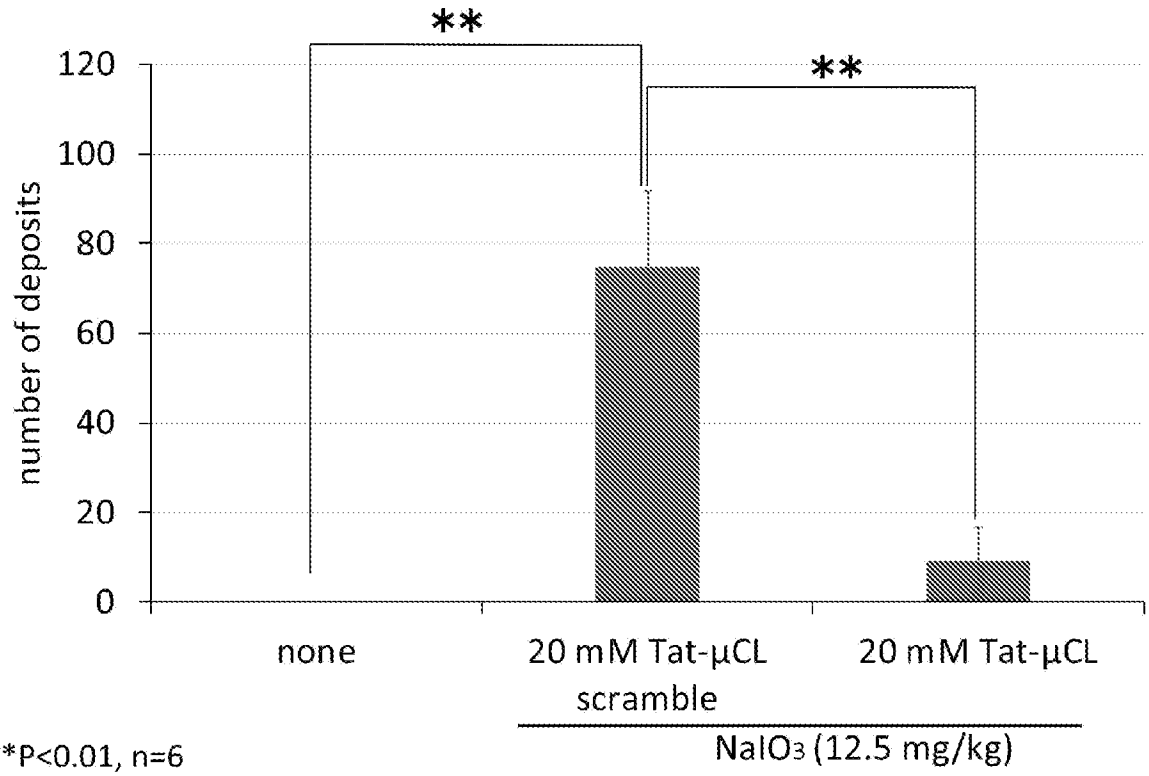
[請求項3] タンパク質伝達ドメインが、ＨＩＶ－１　Ｔａｔの形質導入部位のアミノ酸配列の少なくとも一部のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項１記載の網膜色素上皮細胞の保護剤。

[請求項4] ミトコンドリアカルパインに対して阻害作用を有するペプチドのＮ末端にタンパク質伝達ドメインが付加されてなるペプチドを有効成分とする、加齢黄斑変性の予防および／または治療剤。

[図1]

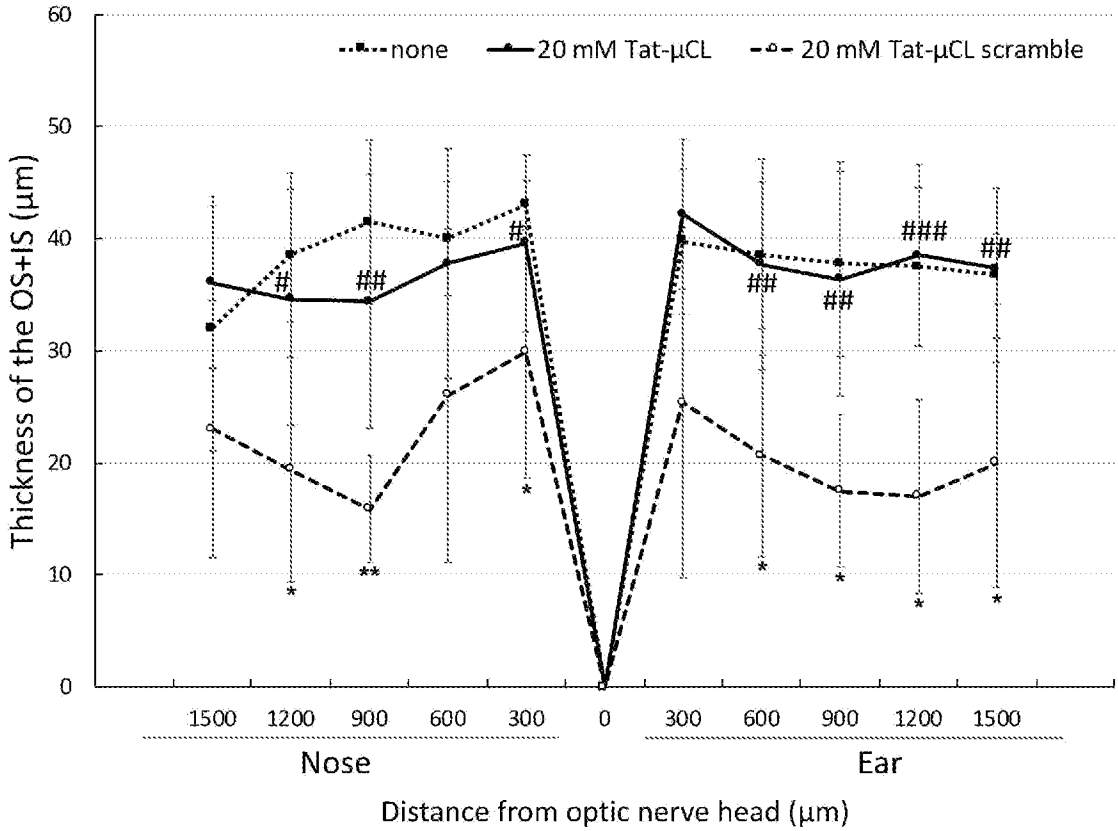

NaIO3 (12.5 mg/kg)
none
20 mM Tat-μCL scramble
20 mM Tat-μCL
RPE
IS/OS
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
100 μm

[図2]


**
**
120
100
80
60
40
20
0
number of deposits
none
20 mM Tat-μCL scramble
20 mM Tat-μCL
NaIO3 (12.5 mg/kg)

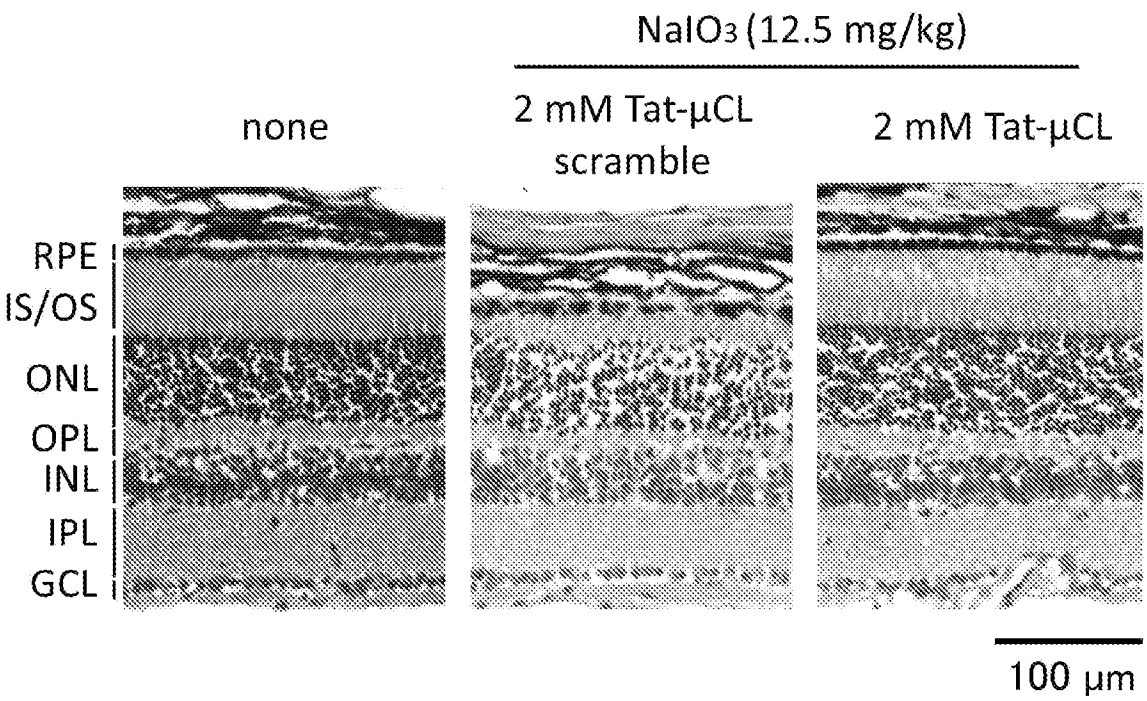
**P<0.01, n=6

[図3]

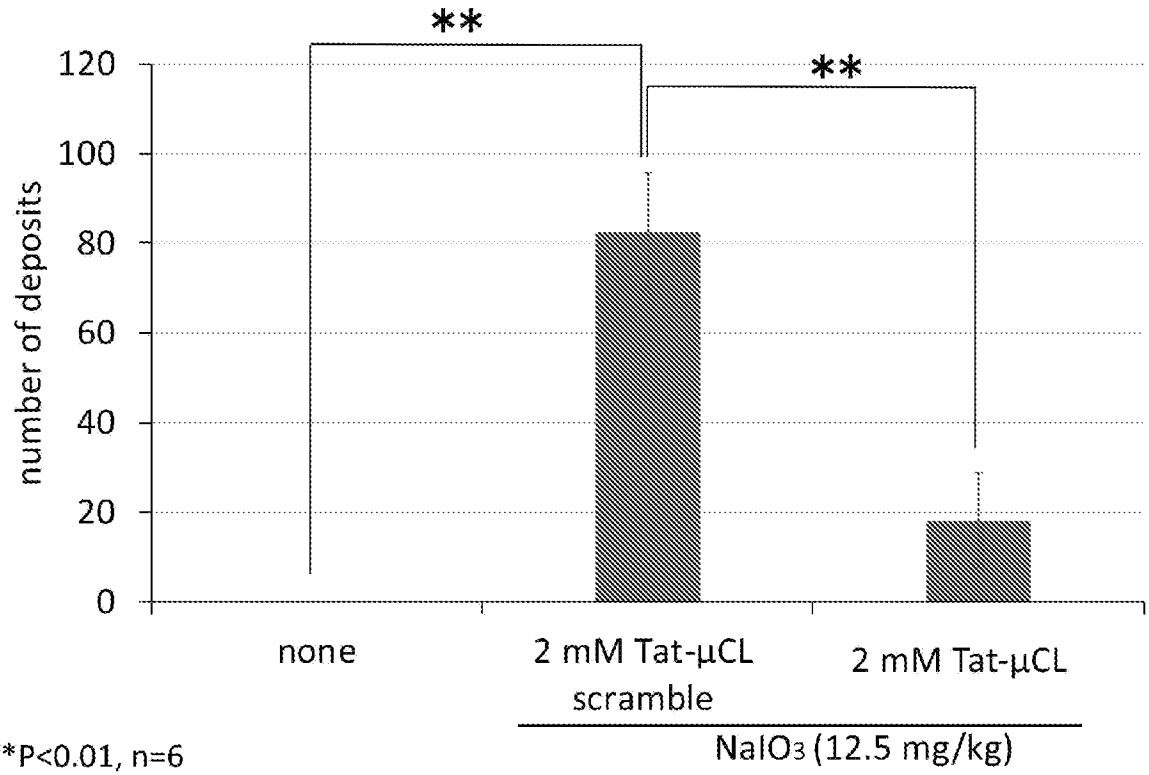


*<0.05, **P<0.01 versus none; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 versus Tat-μCL scramble

[図4]

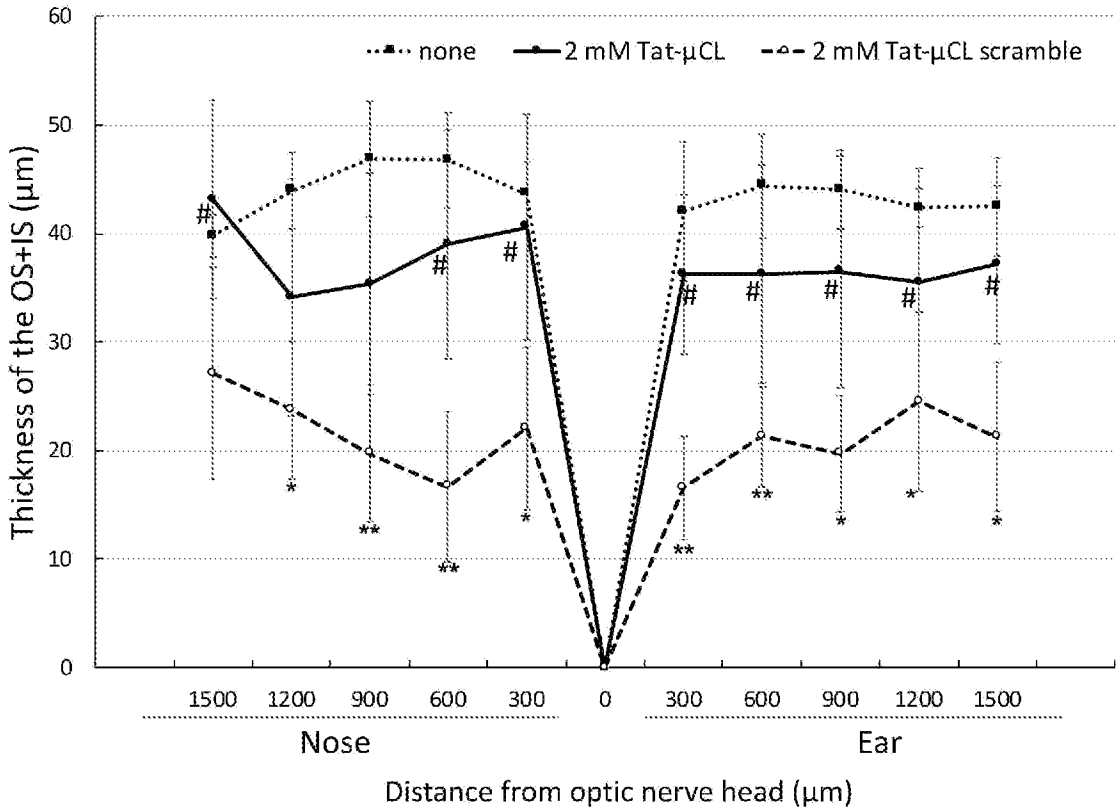


[図5]



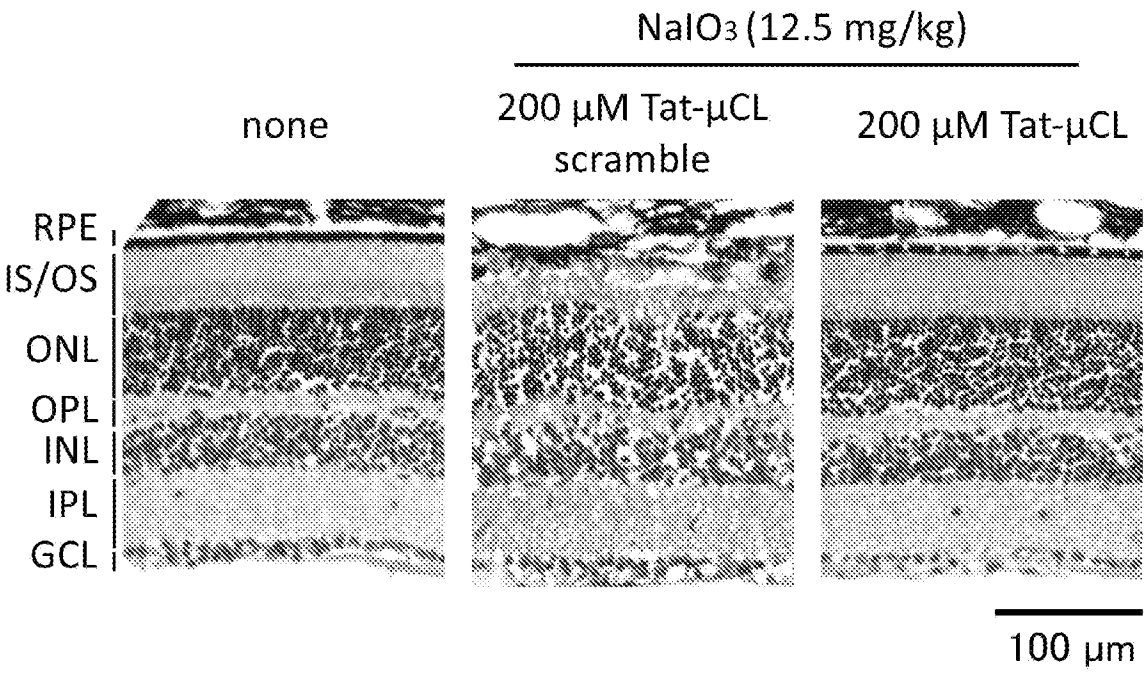
**P<0.01, n=6

[図6]

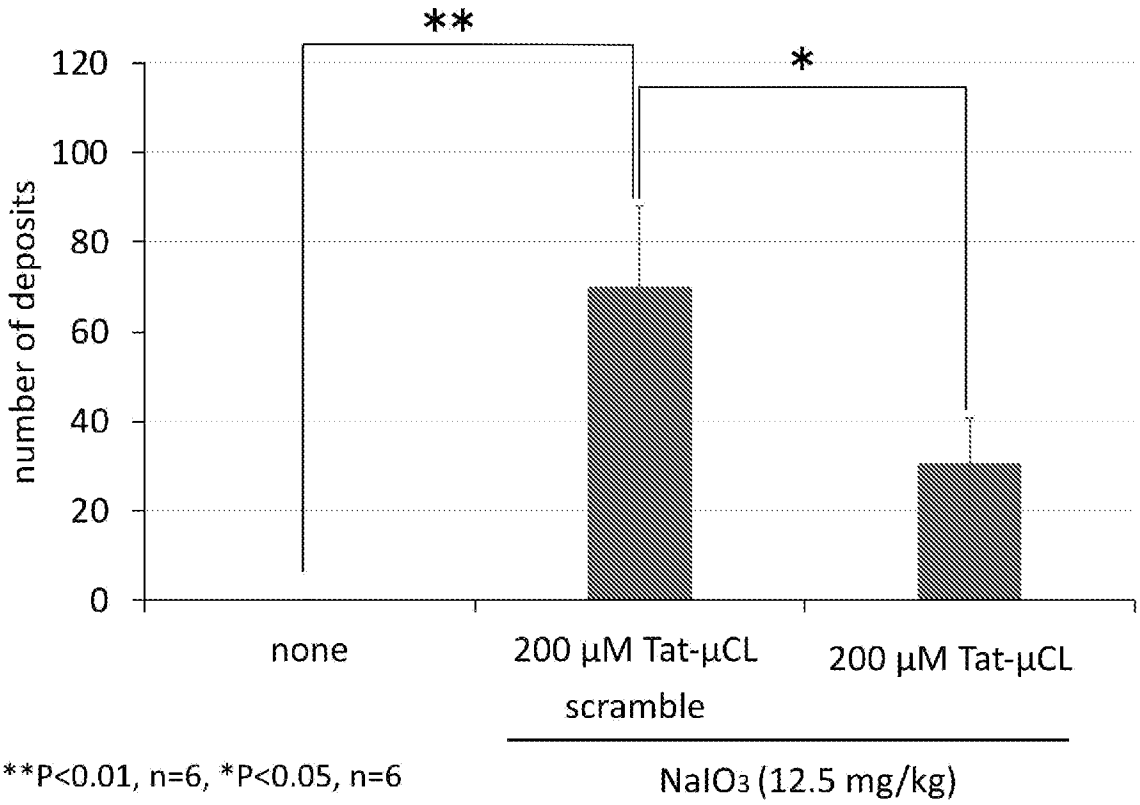


*<0.05, **P<0.01 versus none; #P<0.05, versus Tat-μCL scramble

[図7]

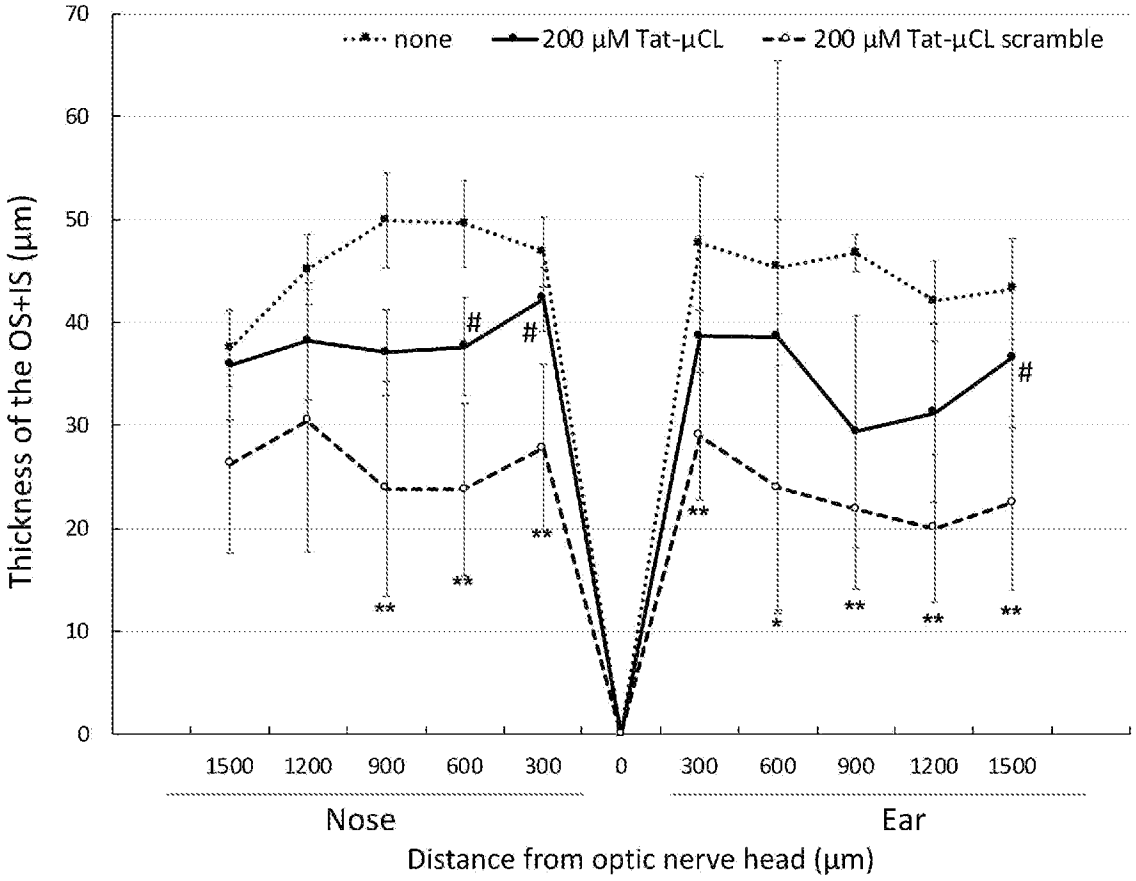


[図8]



**P<0.01, n=6, *P<0.05, n=6

[図9]



*<0.05, **P<0.01 versus none; #P<0.05 versus Tat-μCL scramble

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/02(2006.01)i; ***A61K 9/08***(2006.01)i; ***A61K 47/64***(2017.01)i; ***A61P 27/02***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C07K 7/00***(2006.01)i
FI: A61K38/02; A61P27/02; A61P43/00 111; A61K47/64; A61K9/08; C07K7/00

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)

A61K38/02; A61K9/08; A61K47/64; A61P27/02; A61P43/00; C07K7/00

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/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.
Y	JP 2014-47164 A (HIROSAKI UNIVERSITY) 17 March 2014 (2014-03-17) claims 1, 2, 5, paragraphs [0012], [0014]-[0025], [0034]-[0036], tables 1, 2, fig. 5, 7, example 1, comparative example 1	1-4
Y	尾崎拓, ミトコンドリアカルパインの生理機能の解明と加齢に伴う神経変性疾患に対する治療薬の創出, Ｈｉ！ こちら岩手大学, 2021, vol. 47, p. 1, non-official translation (OZAKI, Taku, Elucidation of the physiological functions of mitochondrial calpain and development of therapeutic agents for age-related neurodegenerative diseases, Hi! Iwate University.) p. 1, right column	1-4

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
12 November 2024	**26 November 2024**
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.
Y	ZHANG Shuaishuai et al., Calpain-2 Facilitates Autophagic/Lysosomal Defects and Apoptosis in ARPE-19 Cells and Rats Induced by Exosomes from RPE Cells under NaIO3 Stimulation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, January 2023, vol. 2023, Article ID: 3310621, pp. 1-18, DOI: 10.1155/2023/3310621 Abstract, p. 8, right column, paragraph 2 to p. 10, left column, paragraph 1, p. 10, left column, paragraph 2 to p. 14, right column, paragraph 1, Figure 5(e), 6(e), 7(b)	1-3
Y	DENG, Yanhui et al., Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy, Genes & Diseases, 2022, vol. 9, no. 1, pp. 62-79, DOI: 10.1016/j.gendis.2021.02.009 p. 65, right column, paragraph 3 to p. 67, left column, paragraph 1, Figure 4	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/035711

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/035711

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-47164 A	17 March 2014	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035711

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 38/02(2006.01)i; A61K 9/08(2006.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 7/00(2006.01)i
FI: A61K38/02; A61P27/02; A61P43/00 111; A61K47/64; A61K9/08; C07K7/00

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））

A61K38/02; A61K9/08; A61K47/64; A61P27/02; A61P43/00; C07K7/00

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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); CAplus/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
Y	JP 2014-47164 A (国立大学法人弘前大学) 17.03.2014 (2014-03-17) 請求項1, 2, 5, 段落0012, 0014-0025, 0034-0036, 表1, 2, 図5, 7, 実施例1, 比較例1	1-4
Y	尾崎拓, ミトコンドリアカルパインの生理機能の解明と加齢に伴う神経変性疾患に対する治療薬の創出, Ｈｉ！こちら岩手大学, 2021, Vol.47, p. 1 p. 1右欄	1-4
Y	ZHANG Shuaishuai et al., Calpain-2 Facilitates Autophagic/Lysosomal Defects and Apoptosis in ARPE-19 Cells and Rats Induced by Exosomes from RPE Cells under NaIO3 Stimulation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2023.01, Vol. 2023, Article ID: 3310621, p. 1-18, DOI: 10.1155/2023/3310621 Abstract, p. 8右欄2段落-p. 10左欄1段落, p. 10左欄2段落-p. 14右欄1段落, Figure 5(e), 6(e), 7(b)	1-3

☑ 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、一般的技術水準を示すもの
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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	国際調査報告の発送日
12.11.2024	26.11.2024

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）
川合　理恵 4U 2381

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
Y	DENG Yanhui et al., Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy, Genes & Diseases, 2022, Vol. 9, No. 1, p. 62-79, DOI: 10.1016/j.gendis.2021.02.009 p. 65右欄3段落-p. 67左欄1段落, Figure 4	1-3

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/035711

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
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

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/JP2024/035711

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2014-47164 A	17.03.2014	（ファミリーなし）	