

(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  
2023年8月3日(03.08.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/145831 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/47 (2006.01)  
A61K 9/10 (2006.01) A61K 47/34 (2017.01)  
A61K 9/14 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/002470
- (22) 国際出願日: 2023年1月26日(26.01.2023)
- (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 2022-012146 2022年1月28日(28.01.2022) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 Fukuoka (JP). 株式会社 SENTAN PHARMA (SENTAN PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒8120027 福岡県福岡市博多区下川端町2番1号 博多座・西銀再開発ビル9階 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 村上 祐介 (MURAKAMI, Yusuke); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 園田 康平 (SONODA, Koh-Hei); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 池田 康博 (IKEDA, Yasuhiro); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 古賀 恒行 (KOGA, Tsuneyuki); 〒8390864 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオイノベーションセンター株式会社 SENTAN PHARMA 内 Fukuoka (JP). 松尾 タケル (MATSUO, Takeru); 〒8390864 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオイノベーションセンター株式会社 SENTAN PHARMA 内 Fukuoka (JP). 江口 暢次朗 (EGUCHI, Yojiro); 〒8390864 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオイノベーションセンター株式会社 SENTAN PHARMA 内 Fukuoka (JP). 古家 博信 (FURUIE, Hironobu); 〒8390864 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオ
- イノベーションセンター株式会社 SENTAN PHARMA 内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAOKA, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース青山特許事務所 Osaka (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, 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, CV, 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, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING RETINITIS PIGMENTOSA

(54) 発明の名称: 網膜色素変性症を治療するための医薬組成物

(57) Abstract: This invention includes, e.g., a pharmaceutical composition serving to treat retinitis pigmentosa and containing nanoparticles in which statin is encapsulated.

(57) 要約: 本開示は、網膜色素変性症を治療するためのスタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物などを含む。



WO 2023/145831 A1

## 明 細 書

発明の名称：網膜色素変性症を治療するための医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本出願は、特願2022-012146号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、網膜色素変性症の治療に関する。

### 背景技術

[0002] 網膜色素変性症は、遺伝子変異が原因で網膜の視細胞や色素上皮細胞が変性する疾患であり、代表的症状として視細胞の障害に伴う夜盲や視野狭窄がみられる。網膜色素変性症の頻度は4000人～8000人に1人と言われているが、現在のところ網膜の機能を回復したり疾患の進行を抑制したりする確立された治療法は存在せず、対症療法にとどまっている。

[0003] スタチンはHMG-CoA還元酵素阻害により血中コレステロールを低下させる働きを持ち、高コレステロール血症の治療薬として広く使用されている。スタチンはまた、血管新生促進効果を有することが知られている。この効果は当初モデル動物において臨床用量を大きく上回る高用量でのみ観察される効果であったが、ピタバスタチンを封入したPLGAナノ粒子が下肢虚血モデルにおいて血管内皮細胞に選択的に送達され低用量で血管新生を誘導すること、肺高血圧症モデルにおいて低用量で肺高血圧症の症状を改善することが報告され、重症虚血肢および肺高血圧症をそれぞれ対象とした臨床試験が行われるに至っている。ピタバスタチン封入PLGAナノ粒子はまた、アテローム性動脈硬化モデルにおいて組織障害を抑制することも報告されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献1：国際出願公開第2008/026702号

## 非特許文献

- [0005] 非特許文献1 : K. Ichimura et al., Int Heart J 59, 1432-1444 (2018).  
非特許文献2 : S. Katsuki et al., Circulation 129, 896-906 (2014).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本開示は、網膜色素変性症を治療するための医薬組成物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

- [0007] 本発明者らは、網膜色素変性症において末梢血の炎症性単球および網膜の末梢由来マクロファージが増加すること、スタチン封入ナノ粒子が網膜色素変性症モデル動物において末梢血炎症性単球および末梢由来網膜マクロファージを減少させ、錐体細胞死を抑制することを見出し、本発明を完成した。
- [0008] 本開示は、一態様において、網膜色素変性症を治療するためのスタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物を提供する。

## 発明の効果

- [0009] 本開示により、網膜色素変性症を治療するためのスタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物が提供される。

## 図面の簡単な説明

- [0010] [図1]図1は、野生型 (WT) および rd10 マウスにおける炎症性単球 (IMo) の比率を示す (生後21日目 (P21) : WT n=7、rd10 n=7 ; P31 : WT n=8、rd10 n=6 ; P42 : WT n=5、rd10 n=5)。中央の水平バーは中央値を示し、ボックスは25~75パーセントイルを示し、ひげはボックスの下部と上部からの四分位範囲の1.5倍を示す。外れ値はドットで表示される。Wilcoxon 順位和検定により、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01。(以下の図において同じ。)

- [図2]図2は、網膜色素変性症 (RP) 患者 (n=31) および対照 (n=1

6) における単球サブセットの割合を示す。

[図3]図3は、網膜色素変性症 (RP) 患者における単球サブセットの割合と網膜感度の低下速度 (MD勾配) との相関を示す。

[図4]図4は、WTおよびrd10マウス網膜の生存細胞におけるミクログリアの割合 (P21: WT n=8、rd10 n=8; P31: WT n=9、rd10 n=6; P42: WT n=7、rd10 n=9) (左) およびマクロファージの割合 (P21: WT n=8、rd10 n=8; P31: WT n=9、rd10 n=6; P42: WT n=7、rd10 n=9) (右) を示す。

[図5]図5は、rd10マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスにおける末梢血中のIMoの割合を示す (P21: rd10 n=6, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=5; P31: rd10 n=7, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=7; P42: rd10 n=5, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=7)。

[図6]図6は、rd10マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスにおける網膜の生存細胞中の常在性ミクログリア (左) およびマクロファージ (右) の割合を示す (P21: rd10 n=6, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=6; P31: rd10 n=5, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=5; P42: rd10 n=5, rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=5)。

[図7]図7は、rd10 (rd10; Ccl2<sup>+/+</sup>) マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウス (P21) の網膜のTUNEL染色 (左)、および鼻側 (nasal) および側頭 (temporal) 半球の網膜の中央領域 (central)、中間周辺領域 (mid) および周辺領域 (peripheral) のTUNEL陽性細胞数 (rd10 n=8; rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=8) (右) を示す。スケールバー: 50 μm。

[図8]図8は、rd10 (rd10; Ccl2<sup>+/+</sup>) マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウス (P26) の網膜のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色 (左)、および鼻側 (nasal) および側頭 (temporal) 半球の網膜の中央領域 (central)、中間周辺領域 (mid) および周辺領域 (peripheral) の光受

容細胞数 (rd10 n=20; rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=10) (右) を示す。スケールバー: 50 μm。

[図9]図9は、rd10 (rd10; Ccl2<sup>+/+</sup>) マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウス (P42) の網膜のピーナッツ凝集素 (PNA) 染色 (左)、および視神経乳頭から200 μmおよび500 μmの領域のPNA陽性錐体細胞数 (rd10 n=21; rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=15) (右) を示す。スケールバー: 50 μm。

[図10]図10は、rd10 (rd10; Ccl2<sup>+/+</sup>) マウスおよびrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウス (P35) の明所視網膜電図 (ERG) (左)、および ERG b波振幅 (rd10 n=6; rd10; Ccl2<sup>-/-</sup> n=8) (右) を示す。

[図11]図11は、PBSまたはFITCをロードしたナノ粒子 (FITC-NP) を静脈内投与したrd10マウス (P17) における末梢血IMoへのFITCの取り込みを示す (PBS n=4; FITC-NP n=4)。左は代表的データであり、右は定量化の結果 (しきい値を超える割合) を示す。

[図12]図12は、PBSまたはFITC-NPを静脈内投与したrd10マウス (P17) の網膜サンプルにおけるFITCの取り込みを示す (PBS n=4; FITC-NP n=4)。左はミクログリアおよびマクロファージの代表的データであり、右は定量化の結果 (しきい値を超える割合) を示す。

[図13]図13は、PBS、FITC-NP、またはピタバスタチンを封入したナノ粒子 (PVS-NP) を静脈内投与したrd10マウス (P31) の末梢血IMoの割合 (PBS n=10; FITC-NP n=11; PVS-NP n=14) (上)、および網膜の生存細胞中のマクロファージおよびミクログリアの割合 (PBS n=14; FITC-NP n=12; PVS-NP n=14) (下) を示す。

[図14]図14は、PBS、FITC-NP、またはPVS-NPを静脈内投

与した rd10 マウス (P52) の網膜の PNA 染色 (左)、および視神経乳頭から 200  $\mu\text{m}$  および 500  $\mu\text{m}$  の領域の PNA 陽性錐体細胞数 (PBS  $n=9$ ; FITC-NP  $n=10$ ; PVS-NP  $n=9$ ) (右) を示す。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。

[図15] 図15は、PBS または PVS-NP を静脈内投与した rd10 マウス (P35) の明所視 ERG (左) および ERG b 波振幅 (PBS  $n=6$ ; PVS-NP  $n=8$ ) (右) を示す。

[図16] 図16は、PBS (100  $\mu\text{l}$  PBS)、PVS-NP low (0.1 mg PVS/kg)、PVS-NP middle (0.3 mg PVS/kg)、PVS-NP high (1.0 mg PVS/kg) を静脈内投与した rd10 マウス (P49) の明所視 ERG b 波振幅 (PBS  $n=8$ ; PVS-NP low  $n=10$ ; PVS-NP middle  $n=20$ ; PVS-NP high  $n=20$ ) を示す。

[図17] 図17は、PBS (100  $\mu\text{l}$  PBS)、PVS-NP low (0.1 mg PVS/kg)、PVS-NP middle (0.3 mg PVS/kg)、PVS-NP high (1.0 mg PVS/kg) を静脈内投与した rd10 マウス (P49) の PNA 陽性錐体細胞数 (PBS  $n=5$ ; PVS-NP low  $n=6$ ; PVS-NP middle  $n=7$ ; PVS-NP high  $n=8$ ) を示す。左は視神経乳頭から 250  $\mu\text{m}$ 、右は視神経乳頭から 750  $\mu\text{m}$  の測定結果を示す。

[図18] 図18は、各マウスについて図17の2つの測定点の PNA 陽性錐体細胞数の平均値をとった結果を示す。

[図19] 図19は、PBS (100  $\mu\text{l}$  PBS) を2週毎 (PBS 2/M)、PVS-NP (0.75 mg PVS/kg) を4週毎 (PVS-NP 1/M)、または PVS-NP (0.5 mg PVS/kg) を2週毎 (PVS-NP 2/M) に静脈内投与した rd10 マウス (P49) の PNA 陽性錐体細胞数 (PBS 2/M  $n=15$ ; PVS-NP 1/M  $n=14$ ; PVS-NP 2/M  $n=16$ ) (左) および明所視 ERG b 波振幅 (PB

S 2 / M n = 2 4 ; P V S - N P 1 / M n = 1 4 ; P V S - N P 2 / M n = 1 6 ) ( 右 ) を 示 す。

### 発明を実施するための形態

- [0011] 特に具体的な定めのない限り、本明細書で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されるとおりの意味を有する。以下にいくつかの本明細書で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本明細書において、一般的な理解に優先する。
- [0012] 一態様において、本開示は、網膜色素変性症を治療するためのスタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物に関する。
- [0013] 本明細書において、スタチンなる用語は、HMG-C o A ( 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - コエンザイム A ) 還元酵素阻害活性を有する化合物を意味する。スタチンとしては、例えば、ピタバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチンおよびロスバスタチンが挙げられる。一実施形態において、スタチンは、ピタバスタチンである。本明細書において、スタチンに言及する場合、その用語はフリー体およびその医薬上許容される塩並びにこれらの溶媒和物を包含する意味で用いられる。医薬上許容される塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、フェネチルアミン塩等の有機アミン塩、アンモニウム塩などが挙げられ、溶媒和物としては、水またはアルコールとの溶媒和物が挙げられる。例えば、ピタバスタチンの医薬上許容される塩としては、ピタバスタチンカルシウムが挙げられ、ピタバスタチンまたはその医薬上許容される塩の溶媒和物としては、ピタバスタチンカルシウム水和物 ( 例えば 5 水和物 ) が挙げられる。スタチン封入ナノ粒子には、1 種またはそれ以上のスタチンを封入してもよく、スタチンに加えて他の薬物を封入してもよい。
- [0014] 本開示のスタチン封入ナノ粒子は、生体適合性ポリマーにより構成されるナノ粒子の内部にスタチンを含む。生体適合性ポリマーは、例えば、D, L

ーラクチド、D-ラクチド、L-ラクチド、D、L-乳酸、D-乳酸、L-乳酸、グリコリド、グリコール酸、 $\epsilon$ -カプロラクトン、 $\epsilon$ -ヒドロキシヘキサン酸、 $\gamma$ -ブチロラクトン、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸、 $\delta$ -バレロラクトン、 $\delta$ -ヒドロキシ吉草酸、ヒドロキシ酪酸、およびリンゴ酸から選択される1種またはそれ以上のモノマーを重合したポリマーでありうる。生体適合性ポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸・グリコール酸共重合体 (poly lactide-co-glycolide、PLGAともいう)、および乳酸・アスパラギン酸共重合体が挙げられる。一実施形態において、生体適合性ポリマーは、PLGAである。

[0015] PLGAなる用語には、様々な割合で乳酸またはラクチドとグリコール酸またはグリコライドとを含むポリマーが含まれる。乳酸またはラクチドとグリコール酸またはグリコライドとの割合は、例えば1:99~99:1であってよく、好ましくは3:1である。PLGAの重量平均分子量は、例えば、5,000~200,000、または15,000~25,000でありうる。PLGAは、公知の方法で合成することができる。また、市販のPLGAを使用してもよい。

[0016] スタチン封入ナノ粒子の粒子径は、例えば、1~1000nm、2~500nm、3~300nm、10~300nm、または50~300nmでありうる。粒子径は、100~300nmまたは200~300nmであってもよい。一実施形態において、粒子径は、50~300nmである。本明細書における粒子径は、動的光散乱法により測定される球相当径を意味し、メジアン径 ( $D_{50}$ ) で表される。メジアン径 ( $D_{50}$ ) とは、粒子の集団の全体積を100%とした累積カーブにおける50%となる点の粒径 (50%径) である。累積カーブおよび  $D_{50}$  は、Nanotrac Wave-EX150 (MictotracBEL Corp社製) などの粒度分布計を用いて求めることができる。

[0017] スタチン封入ナノ粒子は、表面がポリエチレングリコール (PEG) で修飾されていてもよい。例えば、ナノ粒子の製造に生体適合性ポリマーのPE

G修飾体を用いることで、表面がPEGで修飾されたナノ粒子を得ることができる。粒子表面をPEGで修飾することでナノ粒子の血中安定性を向上させることができる。

[0018] スタチン封入ナノ粒子は、いずれの製造方法により製造してもよい。スタチン封入ナノ粒子は、例えば、水中エマルジョン法により製造することができる。水中エマルジョン法では、生体適合性ポリマーが溶解する良溶媒と、生体適合性ポリマーが溶解しない貧溶媒の2種類の溶媒を用いる。良溶媒および貧溶媒は、製造するナノ粒子に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0019] 貧溶媒としては、水が挙げられる。貧溶媒として水を用いる場合、水に界面活性剤を添加してもよい。界面活性剤としては、例えば、ポリビニルアルコール（PVA）、レシチン、ヒドロキシメチルセルロース、およびヒドロキシプロピルセルロースが挙げられる。一実施形態において、貧溶媒は水であり、界面活性剤はPVAである。

[0020] 良溶媒としては、低沸点かつ難水溶性の有機溶媒であるハロゲン化アルカン類、アセトン、メタノール、エタノール、エチルアセテート、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエンまたはこれらの混合物が挙げられる。一実施形態において、良溶媒は、アセトンまたはアセトンとエタノールを2：1になるように合わせた混合物である。

[0021] 水中エマルジョン法では、まず、良溶媒中に生体適合性ポリマーを溶解し、これに薬物溶解液を添加混合する。このポリマーと薬物とを含む良溶媒を攪拌下で貧溶媒中に滴下すると、良溶媒が貧溶媒中へ急速に拡散移行する。その結果、貧溶媒中で良溶媒の乳化が起き、良溶媒のエマルジョン滴が形成される。次いで、良溶媒と貧溶媒の相互拡散により、エマルジョン内から有機溶媒が貧溶媒へと継続的に拡散し、エマルジョン滴内の生体適合性ポリマーおよび薬物の溶解度が低下し、薬物を内包する球形結晶粒子のナノ粒子が生成する。その後、良溶媒である有機溶媒を遠心分離または減圧留去する。得られたナノ粒子は、そのまま、または凍結乾燥等の操作により粉末化した

後に、用いることができる。

[0022] スタチン封入ナノ粒子は、強制薄膜式マイクロリアクターを用いて製造してもよい。強制薄膜式マイクロリアクターを用いる場合、まず、互いに対向して配設され、少なくとも一方が他方に対して相対的に回転する処理用面間に、ポリマーと薬物とを含む良溶媒と、貧溶媒とを導入する。これにより形成される薄膜流体中で、良溶媒と貧溶媒とを混合し、薬物を内包するナノ粒子を薄膜流体中に析出させる。強制薄膜式マイクロリアクターとしては、例えば、ULREA SS-11 (M Technique Co. Ltd.) を用いることができる。

[0023] スタチン封入ナノ粒子は、例えば、0.01～99重量%、0.1～30重量%、0.5～20重量%、または1～15重量%のスタチンを含みうる。一実施形態において、スタチン封入ナノ粒子は、1～15重量%のスタチンを含む。本明細書において、スタチンの含有率は、スタチン封入ナノ粒子の重量に対するスタチンの重量の割合で表される。スタチンの含有率は、所定重量のスタチン封入ナノ粒子から抽出されたスタチンの重量を測定し、スタチン封入ナノ粒子の重量に対するスタチンの重量の割合を算出することで求めることができる。

[0024] スタチン封入ナノ粒子は、凍結乾燥等の操作によりにより粉末化させる際に、再分散可能な凝集粒子（ナノコンポジット）に複合化することができる。例えば、ナノ粒子を有機または無機の物質と共に乾燥させることで、再分散可能に複合化することができる。この複合化により、ナノ粒子は集合して取り扱いやすい凝集粒子となり、使用時に水分に触れると、分散してその特性を発揮することができる。一実施形態において、スタチン封入ナノ粒子は糖アルコールまたはショ糖と複合化される。糖アルコールなどの物質を用いることにより、封入率のばらつきを低減することができ、また、この物質が賦形剤となり、ナノ粒子の取り扱い性を高めることができる。糖アルコールとしては、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、エリスリトール、マルチトース、キシリトースなどが挙げられる。一実施形態において、糖アルコールはトレハロースである。凍結乾燥法に代えて流動層乾燥造粒法によ

り複合化することもできる。

[0025] 本明細書の実施例において、網膜色素変性症において末梢血の炎症性単球および網膜の末梢由来マクロファージが増加すること、スタチン封入ナノ粒子は網膜色素変性症モデル動物において末梢血炎症性単球および末梢由来網膜マクロファージを減少させ、錐体細胞死を抑制することが示された。それゆえ、スタチン封入ナノ粒子は、網膜色素変性症の治療に用いることができる。

[0026] 網膜色素変性症は、遺伝子変異が原因で網膜の視細胞および／または色素上皮細胞が変性する疾患である。網膜色素変性症には、杆体細胞、錐体細胞、および色素上皮細胞のいずれか、またはこれら細胞から選択される2種以上の細胞が変性した病態が含まれる。網膜色素変性症では、多くの場合、杆体細胞の変性が先行し、徐々に錐体細胞の変性が生じる。杆体細胞のみが変性した病態は杆体ジストロフィ、杆体細胞と錐体細胞の両方が変性した病態は杆体錐体ジストロフィと称され、いずれも本開示の網膜色素変性症に含まれる。網膜色素変性症は、いずれの遺伝子変異を原因とするものであってもよく、原因となる遺伝子変異は1つであっても複数であってもよい。

[0027] 本明細書において、網膜色素変性症の治療には、網膜色素変性症の1以上の症状または所見の改善、増悪抑制および遅延、並びに疾患の進行抑制および遅延が含まれる。網膜色素変性症の症状としては、夜盲、視野狭窄、視力低下、羞明、昼盲、色覚異常、および光視症が挙げられる。網膜色素変性症の所見としては、(1)眼底所見(網膜血管狭小、粗造な網膜色調、骨小体様色素沈着、多発する白点、視神経萎縮、黄斑変性)、(2)網膜電図の異常(減弱型、陰性型、消失型)、(3)眼底自発蛍光所見で網膜色素上皮萎縮による過蛍光または低蛍光、(4)光干渉断層計で中心窩におけるエリプソイドゾーン(IS/O S)の異常(不連続または消失)が挙げられる。

[0028] スタチン封入ナノ粒子は医薬組成物に含めることができる。医薬組成物は、例えば、0.000001~99.9重量%、0.00001~99.8重量%、0.0001~99.7重量%、0.001~99.6重量%、0

、0.1～99.5重量%、0.1～99重量%、1～50重量%、1～40重量%、1～30重量%、1～20重量%、または1～15重量%のスタチン封入ナノ粒子を含みうる。医薬組成物は、必要に応じて医薬上許容される添加物をさらに含んでもよい。医薬上許容される添加物としては、例えば、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤が挙げられる。

[0029] 医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤、乳濁液、吸入剤、注射剤、点眼剤、眼軟膏などの剤型でありうる。注射剤には、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、および用時調製型注射剤が含まれる。一実施形態において、医薬組成物は、注射剤である。これらの製剤は常法により調製することができる。

[0030] スタチン封入ナノ粒子またはこれを含む医薬組成物は、所望の効果を発揮しうる量（本明細書において、有効量という）で対象に投与される。投与量および投与期間は、対象の年齢、体重、健康状態等の条件に応じて当業者が適宜決定しうる。スタチン封入ナノ粒子またはこれを含む医薬組成物は、例えば、1日あたり、スタチンの量として、0.001mg/kg～100mg/kg、0.003mg/kg～10mg/kg、0.005mg/kg～5mg/kg、0.01mg/kg～3mg/kg、0.01mg/kg～1mg/kg、0.01mg/kg～0.75mg/kg、0.01mg/kg～0.5mg/kg、0.01mg/kg～0.3mg、0.01mg/kg～0.25mg、0.01mg/kg～0.1mg、0.01mg/kg～0.09mg、0.01mg/kg～0.08mg、0.01mg/kg～0.07mg、0.01mg/kg～0.06mg、0.01mg/kg～0.05mg、0.01mg/kg～0.04mg、0.01mg/kg～0.03mg、0.03mg/kg～1mg/kg、0.03mg/kg～0.75mg/kg、0.03mg/kg～0.5mg/kg、0.03mg/kg～0.3mg、0.03mg/kg～0.25mg、0.03mg/kg～0.1mg、0.03mg/kg～0.09mg、0.0

3 mg/kg ~ 0.08 mg、0.03 mg/kg ~ 0.07 mg、0.03 mg/kg ~ 0.06 mg、0.03 mg/kg ~ 0.05 mg、0.1 mg/kg ~ 1 mg/kg、0.1 mg/kg ~ 0.75 mg/kg、0.1 mg/kg ~ 0.5 mg/kg、0.1 mg/kg ~ 0.3 mg/kg、0.3 mg/kg ~ 1 mg/kg、0.3 mg/kg ~ 0.75 mg/kg、または0.3 mg/kg ~ 0.5 mg/kgで投与することができ、これを1日に1回、または複数回（例えば、2、3または4回）に分割して、投与することができる。一実施形態において、スタチン封入ナノ粒子またはこれを含む医薬組成物は、1日あたり、スタチン（例えば、ピタバスタチンカルシウム）の量として、0.01 mg/kg ~ 0.3 mg/kg または 0.03 mg/kg ~ 0.1 mg/kg で投与される。スタチン封入ナノ粒子またはこれを含む医薬組成物は、成人1日あたり、スタチン（例えば、ピタバスタチンカルシウム）の量として、1 ~ 10 mg/body（例えば、1、2、4、8、または10 mg/body）または1 ~ 8 mg/body（例えば、1、2、4、または8 mg/body）で投与されてもよい。投与は、単回投与であっても複数回投与であってもよい。複数回投与の場合、投与は、連日であっても、数日（例えば2、3、4、5または6日）、1週間または数週間（例えば2、3、4、5または6週間）、1ヶ月または数ヶ月（例えば2、3、4、5または6ヶ月）に1回であってもよい。一実施形態において、投与は、1週間に2回（例えば、3または4日に1回）、または1 ~ 4週間（例えば、1、2、3、または4週間）に1回である。投与期間は、例えば、1日または数日（例えば2、3、4、5または6日）、1週間または数週間（例えば2、3、4、5または6週間）、1ヶ月または数ヶ月（例えば2、3、4、5または6ヶ月）、またはそれ以上でありうる。投与は、全身投与であっても局所投与であってもよく、また、経口投与であっても非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、気管支内、鼻腔内、眼内）であってもよい。一実施形態において、スタチン封入ナノ粒子またはこれを含む医薬組成物は、静脈内投与される。

[0031] 本開示において、対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等）であり、好ましくはヒトである。一実施形態において、対象は、網膜色素変性症を患うヒト対象（網膜色素変性症患者ともいう）である。

[0032] 本開示は、一態様において、網膜色素変性症を治療する方法であって、治療を必要とする対象に有効量のスタチン封入ナノ粒子を投与することを含む方法を提供する。

本開示は、一態様において、網膜色素変性症を治療するための、スタチン封入ナノ粒子を提供する。

本開示は、一態様において、網膜色素変性症を治療するための医薬の製造のための、スタチン封入ナノ粒子の使用を提供する。

本開示は、一態様において、網膜色素変性症を治療するための、スタチン封入ナノ粒子の使用を提供する。

[0033] 本開示の例示的な実施形態を以下に記載する。

[1]

網膜色素変性症を治療するための、スタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物。

[2]

スタチンが、ピタバスタチンまたはその医薬上許容される塩である、前記1に記載の医薬組成物。

[3]

スタチンが、ピタバスタチンカルシウムである、前記1または2に記載の医薬組成物。

[4]

スタチン封入ナノ粒子が1～15重量%のスタチンを含む、前記1～3のいずれかに記載の医薬組成物。

[5]

スタチン封入ナノ粒子がPLGAを含む、前記1～4のいずれかに記載の

医薬組成物。

[6]

スタチン封入ナノ粒子の粒子径が、50～300nmである、前記1～5のいずれかに記載の医薬組成物。

[7]

1～15重量%のスタチン封入ナノ粒子を含む、前記1～6のいずれかに記載の医薬組成物。

[8]

1日あたり、スタチンの量として、0.01mg/kg～0.5mg/kgで投与される、前記1～7のいずれかに記載の医薬組成物。

[9]

静脈内投与される、前記1～8のいずれかに記載の医薬組成物。

[10]

1週間に2回または1～4週間に1回投与される、前記1～9のいずれかに記載の医薬組成物。

[0034] [11]

網膜色素変性症を治療する方法であって、治療を必要とする対象に有効量のスタチン封入ナノ粒子を投与することを含む方法。

[12]

網膜色素変性症を治療するための医薬の製造のための、スタチン封入ナノ粒子の使用。

[13]

網膜色素変性症を治療するための、スタチン封入ナノ粒子の使用。

[0035] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は如何なる意味においてもこれら実施例に限定されない。

## 実施例

[0036] 1. 材料および方法

動物

WT (C57BL/6J) マウス、B6. CXB1-Pde6 $\beta^{rd10}$ /J (rd10) マウス、およびB6. 129S4-Cc12<sup>tm1Roi</sup>/J (Cc12<sup>-/-</sup>) マウスは、Jackson Laboratory (West Grove, PA) から購入した。Rd10マウスをCc12<sup>-/-</sup>マウスと交配してrd10; Cc12<sup>-/-</sup>を製作した。

[0037] 患者および対照被験者

血中単球は心血管疾患、高血圧、糖尿病などの全身性疾患の影響を受ける可能性があるため、全身的に健康で比較的若い45歳未満の被験者とした。網膜色素変性症 (RP) 患者は、患者の夜盲症の病歴、特徴的な眼底所見 (例えば、中間周辺 (mid-peripheral) 網膜および周辺 (peripheral) 網膜における骨小体様色素沈着)、視野狭窄および/または輪状暗点、および網膜電図における減少した、または消失した a 波と b 波の振幅に基づき診断した。錐体ジストロフィ、錐体杆体ジストロフィ、ビエッティクリスタリン網膜症、ぶどう膜炎、または全身性疾患の患者は除外した。参加者は2017年と2018年に連続して募集し、31人のRP患者と、年齢および性別が一致する16人の健康な被験者から血液サンプルを収集した。RP患者は、1年以上追跡され、平均偏差 (MD) 勾配を得るために少なくとも3回のHFA10-2テストを受けた。分析には、採血時の被験者の視力、採血に最も近い時点でのHFA10-2検査結果、およびMD勾配を使用した。各被験者の右眼の検査結果を分析に使用した。

[0038] 臨床検査

被験者の最良矯正視力 (BCVA) は、5mのランドルト10進VAチャート (CV-6000; Tomey, Nagoya, Japan) または字一つランドルトテストカード (HP-1258; Handaya, Tokyo) で測定した。値は、最小分離閾角度の対数 (logMAR) に変換した。屈折異常は、訪問ごとに異なる視度の複数のレンズを使用して矯正し、視力が最もよく矯正されていることを確認した。視力は、被験者が60%以上の回数 (3/5) を正しく答えることができた最小のランドルトCレターに基づいた。自動静的視野検査は、ハンフリーフィ

ールドアナライザー (HFA; Humphrey Instruments, San Leandro, CA) で、central 10-2 Swedish Interactive Thresholding Algorithm Standard Programを使用して実行した。レンズは、テスト距離に応じて修正した。試験の信頼性が不十分な場合 (すなわち、固視不良 > 20%、偽陽性 > 15%、または偽陰性 > 33%)、視野検査を繰り返した。

[0039] フローサイトメトリー

免疫標識した細胞は、FlowJoソフトウェアを使用してBD FACSVerserシステム (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) により分析した。サンプルは以下のように調製し、分析した。

[0040] マウス血液単球

マウスから心臓穿刺により末梢血を採取し、赤血球をVersaLyse Lysing solution (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) により室温で10分間溶解した。細胞を氷冷したFACSバッファー (2%ウシ胎児血清 (FBS) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) で2回洗浄した。Fc受容体を抗マウスCD16/CD32 (eBioscience) により4℃で5分間ブロッキングした後、以下に対する抗体とともに氷上で20分間インキュベートした: マウスCD192 (CCR2) (Alexa Fluor 647-conjugated, clone SA203G11; Biolegend, San Diego, CA)、CD11b (BV421-conjugated, clone M1/70; Biolegend)、Ly-6C (Alexa fluor 488-conjugated, clone HK1.4; Biolegend)、Ly-6G (allophycocyanin [APC]-cy7-conjugated, clone 1A8; Biolegend) およびCX3CR1 (phycoerythrin [PE]-conjugated, clone SA011F11, Biolegend)。死細胞は蛍光マーカーである7-AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA) により除外した。炎症性単球はCD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>low-neg</sup>細胞として同定した。

[0041] マウスミクログリアおよびマクロファージ

マウスの網膜を摘出した眼球から採取し、細かく刻み、水浴中で37℃にて30分間消化した (1.2 mg/ml コラゲナーゼD [Roche Diagnostics, Indianapolis, IN] および40 μg/ml DNase I [Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO] )。消化後、ピペッティングにより組織を分離し単細胞懸濁液とした。細胞を氷冷FACSバッファー(2%FBSを含むPBS)で2回洗浄した。Fc受容体を抗マウスCD16/CD32(eBioscience)により4℃で10分間ブロッキングした後、以下に対する抗体とともに氷上で20分間インキュベートした:マウスCD11c(PE-Cy7-conjugated, clone N418; Biolegend)、CD45(APC-conjugated, clone 30-F11; Biolegend)、Ly-6C(APC-cy7-conjugated, clone HK1.4; Biolegend)、Ly-6G(APC-cy7-conjugated, clone 1A8; Biolegend)、CD11b(PE-conjugated, clone M1/70; Biolegend)、CD192(CCR2)(FITC-conjugated, clone SA203G11; Biolegend)およびCX3CR1(BV421-conjugated, clone SA011F11; Biolegend)。死細胞は7-AAD(BD Pharmingen)により除外した。ミクログリアはCD11b<sup>hi</sup>CD11c<sup>mid</sup>CD45<sup>mid</sup>Ly-6G<sup>lo</sup>Ly-6C<sup>lo</sup>細胞と定義し、マクロファージはCD11b<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD45<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>lo</sup>Ly-6C<sup>lo</sup>細胞と定義した。各実験で野生型の網膜をミクログリアとマクロファージをゲーティングするためのコントロールとして使用した。

#### [0042] ヒト血液単球

全血(8ml)を、ヘパリンナトリウムを含むBD Vacutainer CPT細胞調製チューブ(BD Biosciences)を使用して、各被験者の肘前静脈から採取した。得られたサンプルは直ちに(30分以内)単核細胞の密度勾配分離に供した。次に、分離した単核細胞を低速遠心分離(200g)でペレット化し、2%FBSを含むPBS中、5mlチューブに分注した。サンプルは分析するまで-80℃で冷凍庫に保存し、分析の30分前に解凍した。免疫標識のために、細胞を氷冷FACSバッファー(2%FBSを含むPBS)で2回洗浄した。Fc受容体を抗マウスCD16/CD32(eBioscience)で4℃で5分間ブロッキングした後、以下に対する抗体とともに氷上で20分間インキュベートした:ヒトCD56(NCAM)(PerCP/Cy5.5-conjugated, clone HCD56; Biolegend)、CD19(PerCP/Cy5.5-conjugated, clone HIB1

9; Biolegend)、HLA-DR (APC-conjugated, clone L243; Biolegend)、CD14 (PE-conjugated, clone M5E2; Biolegend)、CD16 (BV421-conjugated, clone 3G8; Biolegend)、CD192 (CCR2) (FITC-conjugated, clone K036C2; Biolegend) およびCX3CR1 (PEcy7-conjugated, clone 2A9-1, Biolegend)。死細胞は7-AAD (BD Pharmingen) により除外した。単球はHLA-DR<sup>+</sup>CD2<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>細胞として同定した。この細胞をCD14およびCD16の発現レベルにしたがって3つのサブセットに分類した。

#### [0043] 網膜ホルマウント染色

マウスの眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて4℃で1時間固定した。角膜と水晶体を取り除いた後、網膜を後眼杯から分離した。各網膜を10%スキムミルクと0.3%Triton-X 100 (9002-93-1; Wako) とを含むPBSで1時間ブロッキングし、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合ピーナッツ凝集素 (PNA) (1:100, L7381; Sigma-Aldrich) と4℃で一晩インキュベートした。蛍光画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, Osaka, Japan) を使用して取得した。PNA陽性錐体細胞の数は、Image J ver. 1.52a ソフトウェア ((U.S. National Institutes of Health [NIH]) を使用して、視神経乳頭から200 μm、250 μm、500 μm、または750 μmに位置する、上、下、側頭、および鼻側の0.015625 mm<sup>2</sup>の網膜領域でカウントし、各領域の数値を平均化した。観察者にはサンプルの名称と条件は伝えずに盲検的に解析を行った。

#### [0044] 組織学的検査

マウスの眼球を摘出し、4%パラホルムアルデヒド (PBS中) にて24時間固定し、パラフィンにマウントした。水平経線に沿って切片 (厚さ5 μm) を作成し、ヘマトキシリンおよびエオジン (H&E) にて染色した。5つのセクションを各眼からランダムに選択した。外顆粒層 (ONL) の細胞数は、鼻側および側頭半球の網膜の中央 (central) 領域 (視神経乳頭から200 μm)、中間周辺 (mid-peripheral) 領域 (視神経乳頭から500 μm

）、および周辺（peripheral）領域（視神経乳頭から $1000\mu\text{m}$ ）の $100\mu\text{m}^2$ の正方形の領域でカウントした。組織サンプルには数字と文字を割りあて、観察者には条件は伝えずに盲検的に解析を行った。

#### [0045] TUNEL染色

TUNEL染色はApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を製造元の指示に従って使用して実施した。免疫蛍光画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700; Keyence) を使用して取得した。鼻側および側頭半球の網膜の中央領域（視神経から $200\mu\text{m}$ ）、中間周辺領域（視神経から $500\mu\text{m}$ ）および周辺領域（視神経から $1000\mu\text{m}$ ）の $10,000\mu\text{m}^2$ の領域のTUNEL陽性細胞の数をImage Jソフトウェア、ver. 1.52 aを用いて取得した。各正方形領域のONL領域を測定し、ONL内のTUNEL陽性細胞の密度を計算し、細胞/ $\text{mm}^2$ として表した。観察者にはサンプルの名称と条件は伝えずに盲検的に解析を行った。

#### [0046] 網膜電図 (ERG)

明所視ERGは、PuRECシステム (PC-100; Mayo Corporation, Aichi, Japan) を使用してLEDコンタクトレンズを通して記録された。ケタミン ( $100\text{mg}/\text{kg}$ ) とキシラジン ( $10\text{mg}/\text{kg}$ ) の腹腔内注射でマウスを麻酔し、加熱パッドで体温を $37^\circ\text{C}$ に維持した。瞳孔は $0.5\%$ トロピカミドおよび $0.5\%$ フェニレフリン塩酸塩で拡張させた。オクスプロカインの局所塗布後、LEDコンタクトレンズをマウスの角膜に取り付けた。参照電極を舌に配置し、接地電極を尾にクリップで留めた。マウスを $30\text{cd}/\text{m}^2$ の強度の白色光の背景に10分間適応させた。 $3.0\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ で16回の明所視フラッシュを撮影し、平均した。

#### [0047] PLGAナノ粒子の調製

ナノ粒子 (NP) の調製には、平均分子量が $20,000$ 、ラクチドとグリコライドとの比率が $75:25$ のPLGAポリマー (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を使用した。FITC (D Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) またはピタバスタチンカルシウム (Wako, Osaka, Japa

n) (以下、単にピタバスタチン (PVS) と記載) を PLGA ナノ粒子に組み込んだ。ナノ粒子は、ULREA SS-11 (M Technique Co. Ltd., Osaka, Japan) を使用して作製した。FITC-NP についてまず、液体 A (2.0% ポリビニルアルコール (PVA) を含む水溶液) を入れたタンクを 0.3 MPa に加圧し、設定値 43°C (測定値約 40°C)、速度 120 ml/min で移動させた。次に、液体 B (4.04 : 0.20 : 63.84 : 31.92 の重量比で PLGA、FITC、アセトン、およびエタノールを含む溶液) を、設定値 41°C (測定値 : 約 30°C) で 100 ml/min で移動させた。液体 A および B を、0.02 MPa の背圧で 1000 rpm で回転する回転ディスク上で反応させた。得られた混合物中の溶媒を、エバポレーターを用いて蒸留により除去した。次に、得られた懸濁液を精製して余分な PVA と未封入の試薬を除去し、凍結乾燥法によって粉末化した。PVS-NP では、液体 A (0.17% PVA を含む水溶液) を入れたタンクを 0.3 MPa に加圧し、設定値 25°C (測定値約 24°C)、速度 156 mL/min で移動させた。次に、液体 B (0.7 : 0.15 : 66.10 : 33.05 の重量比で PLGA、PVS、アセトン、およびエタノールを含む溶液) を、設定値 25°C (測定値 : 約 24°C) で 100 ml/min で移動させた。液体 A および B を、0.02 MPa の背圧で 400 rpm で回転する回転ディスク上で反応させた。得られた混合物中の溶媒を、エバポレーターを用いて蒸留により除去し、凍結乾燥法によって粉末化した。FITC-NP および PVS-NP には、それぞれ  $6.8 \pm 0.4\%$  (w/v) の FITC および  $2.79 \pm 0.05\%$  (w/v) の PVS が含まれた。粒子径は、Nanotrac Wave-EX150 (MicrotracBEL Corp 社製) により測定した。粒子径は、FITC-NP は 252 nm、PVS-NP は 202 nm であった。

[0048] ナノ粒子の *in vivo* 生体内分布

生後 17 日 (P17) の rd10 マウスに FITC-NP (0.5 mg FITC-NP / 100  $\mu$ l PBS) を単回静脈内注射し、2 時間後に血液サ

ンプルを採取し、IM<sub>o</sub>へのFITCの取り込みをフローサイトメトリーにより分析した。また、FITC-NPの静脈内注射の24時間後に網膜を採取し、マクロファージおよびミクログリアへのFITCの取り込みを分析した。血液細胞は、マウスLy-6C (APC-cy7-conjugated, clone HK1.4; Biolegend) およびLy-6G (PerCP/Cy5.5-conjugated, clone 1A8; Biolegend) と、以下の抗体で標識した：CD192 (CCR2) (Alexa Fluor 647-conjugated, clone SA203G11; Biolegend)、CD11b (BV421-conjugated, clone M1/70; Biolegend)、およびCX3CR1 (PE-conjugated, clone SA011F11, Biolegend)。FITCの発現は、CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>lo-neg</sup>IM<sub>o</sub>において評価した。FITC-NPの細胞取り込みの評価には、CD192 (CCR2) (FITC-conjugated, clone SA203G11; Biolegend) は使用しなかった。網膜細胞は、以下の抗体で染色した：CD11c (PE-Cy7-conjugated, clone N418; Biolegend)、CD45 (APC-conjugated, clone 30-F11; Biolegend)、Ly-6C (APC-cy7-conjugated, clone HK1.4; Biolegend)、Ly-6G (APC-cy7-conjugated, clone 1A8; Biolegend)、CD11b (PE-conjugated, clone M1/70, Biolegend)、およびCX3CR1 (BV421-conjugated, clone SA011F11; Biolegend)。次いで、ミクログリアおよびマクロファージにおけるFITCの蛍光を測定した。

[0049] rd10マウスのNP処置

rd10マウスをP21で3つの群に分けた：PBS群 (100  $\mu$ l PBS)、FITC-NP群 (0.5 mg FITC-NP / 100  $\mu$ l PBS)、およびPVS-NP群 (0.0065 mg PVS / 0.5 mg PVS-NP / 100  $\mu$ l PBS; 体重換算で0.325 mg PVS / kg)。PBS、FITC-NP、またはPVS-NPは、P21から各実験の終了まで週2回 (3日または4日に1回)、尾静脈を介して静脈内投与した。

[0050] 用量設定試験

PVS-NPの至適投与量を決定するため、rd10マウスをP21で4つの群に分けて用量設定試験を行なった：PBS群 (100  $\mu$ l PBS)、

PVS-NP low群 (0.1 mg PVS/kg)、PVS-NP middle群 (0.3 mg PVS/kg)、PVS-NP high群 (1.0 mg PVS/kg)。P21から各実験の終了まで週1回、尾静脈を介して静脈内投与した。P49で明所視ERGならびにPNA陽性錐体細胞数の解析を行なった。

#### [0051] 用法設定試験

PVS-NPの至適投与法を決定するため、rd10マウスをP21で3つの群に分けて用量設定試験を行なった：PBS (100 µl PBS) 2週毎投与群、PVS-NP (0.75 mg PVS/kg) 4週毎投与群、PVS-NP (0.5 mg PVS/kg) 2週毎投与群。P21から各実験の終了まで、それぞれの投与間隔で尾静脈を介して静脈内投与した。P49で明所視ERGならびにPNA陽性錐体細胞数の解析を行なった。

#### [0052] 統計分析

RP患者のHFA10-2テストにおけるMD勾配と患者の単球サブセットの割合との間の相関係数をスピアマンの順位相関テストによって分析した。群のペア間のデータの比較はWilcoxon順位和検定により行った。0.05以下のp値を有意とした。データの統計分析は、JMP Pro 13.0.0ソフトウェア (SAS, Cary, NC) を用いて行った。

#### [0053] 2. 結果

rd10マウスおよびRP患者の末梢血における炎症性単球の増加

RPが循環単球数の増加と関連するかを調べるため、Pde6b変異を伴うRPの臨床的関連モデルであるrd10マウスの血液中の炎症性単球 (IMo) 数を分析した。rd10マウスでは、杆体細胞死はP18頃に始まり、ほとんどの杆体細胞はP30までに消失する。これに続いて、徐々に錐体に変性する。野生型 (WT) およびrd10マウスの末梢血を、P21、P31、およびP42でフローサイトメトリーによって分析した。その結果、WTマウスと比較して、rd10マウスのCD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>hi</sup>Ly-6G<sup>lo</sup> IMo数は、P21 (p<0.01)、P31 (p<0.01)、お

よびP42 ( $p < 0.05$ )において有意な増加を示した(図1)。これらの細胞はCCR2およびCX3CR1も高発現していた(データ提示せず)。

[0054] 次に、RP患者の単球の変化を評価した。被験者の末梢血サンプルをフローサイトメトリーで分析し、単球をCD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>非古典的(non-classical)、CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>中間(intermediate)、およびCD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>古典的(classical)単球に分類した。その結果、RP患者と対照の間で総単球の割合には有意差がなかったが、サブセット分析では、RP患者のCD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>中間単球サブセットの割合の有意な増加が示され( $p = 0.0098$ 、図2)、これらの細胞はCCR2およびCX3CR1も高発現していた(データ提示せず)。またRP患者において、CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>中間単球サブセットの割合が高いと、MD勾配(網膜感度の低下速度)が大きい相関を認めた( $\rho = -0.4933$ 、 $p = 0.0042$ ) (図3)。これらの結果は、ヒトおよび動物モデルのいずれにおいてもRPが末梢血IMoの増加と関連することを示唆する。

[0055] rd10マウスにおける網膜ミクログリアおよびマクロファージの変化

rd10マウスの網膜へのIMoの動員について調べるため、網膜骨髄系細胞のフローサイトメトリー分析を行った。網膜ミクログリアとマクロファージは表面マーカーのCD45およびCD11cを用いて区別できることから、網膜細胞をCD11b、CD11c、CD45、Ly6C、Ly6G、CCR2、およびCX3CR1について染色した。WTマウスの網膜にはCD11b<sup>hi</sup>CD11c<sup>mid</sup>CD45<sup>mid</sup>Ly6G<sup>lo</sup>Ly6C<sup>lo</sup>ミクログリアが存在したが、CD11b<sup>hi</sup>CD11c<sup>hi</sup>CD45<sup>hi</sup>Ly6G<sup>lo</sup>Ly6C<sup>lo</sup>マクロファージは存在しなかった。一方、rd10マウスの網膜では、P21、P31、およびP42において、これら細胞集団の増加が観察された( $p < 0.01$ 、図4)。

[0056] rd10マウスの錐体細胞死へのCCL2/CCR2軸の関与

I Moと末梢由来のマクロファージの役割を調べるため、骨髓系細胞の血液または病巣への動員に不可欠なCCL2/CCR2軸がブロックされたCcl2欠損rd10マウス (rd10; Ccl2<sup>-/-</sup>) を作成した。Ccl2欠損により、P21、P31、およびP42のいずれにおいても末梢血I Moが減少した (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、および $p < 0.01$ ; 図5)。rd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスの網膜において、マクロファージはP21およびP31において有意に減少し (いずれも $p < 0.05$ )、P42ではわずかに減少したが ( $p = 0.06$ )、常在性ミクログリアの割合はrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスとrd10; Ccl2<sup>+/+</sup>マウスとの間で有意な差はなかった (図6)。これらのデータは、CCL2/CCR2軸がrd10マウスのI Mo/マクロファージ動員に重要であることを示す。

[0057] 次に、rd10マウスの杆体および錐体変性に対するCcl2欠損の影響を評価した。杆体細胞死がピークに達したP21でのTUNEL染色では、rd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスとrd10; Ccl2<sup>+/+</sup>マウスとの間で外顆粒層 (ONL) のTUNEL陽性細胞の数に有意な差はみられなかった (図7)。これと一致して、P26でのHE染色は、Ccl2の存在下または非存在下でONLの厚さに有意差がないことを示し (図8)、Ccl2の欠損がrd10マウスの杆体変性に影響しない可能性が示唆された。対照的に、PNA標識で評価した錐体細胞密度は、P52においてrd10; Ccl2<sup>+/+</sup>マウスと比較してrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスで有意に高かった (図9)。さらに、明所視ERGによって錐体機能を分析した。明所視のERGb波は、rd10; Ccl2<sup>+/+</sup>マウスと比較してrd10; Ccl2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に維持された (図10)。これらの結果は、CCL2/CCR2軸が末梢由来マクロファージの網膜への動員と生着を促進し、これがrd10マウスの錐体変性に寄与することを示唆している。

[0058] 末梢血I Moおよび網膜マクロファージへの薬物送達

末梢血I Moおよび末梢から移行したマクロファージへのPLGAナノ粒子による薬物送達を検討した。FITCを封入したナノ粒子をP17のrd

10マウスの尾静脈に注射し、注射の2時間後にLy-6Ch1MoへのFITCの送達を分析することにより、薬物送達の特異性を評価した。FITC-NPは、多数のIMoに効率的にFITCを導入した ( $p < 0.05$ 、図11)。網膜ミクログリアおよびマクロファージへの薬物送達効率は、ナノ粒子の静脈内注射の24時間後に分析した。FITC-NP投与により、マクロファージの $3.1 \pm 1.7\%$ でFITCの導入が観察された。これに対して、ミクログリアではFITC-NPを投与してもFITCは検出されなかった (図12)。これらの結果は、ナノ粒子がIMoおよび末梢由来のマクロファージを標的とし、ミクログリアを標的としない、有望な薬物送達システムであることを示す。

[0059] この薬物送達システムを用いて、ピタバスタチンを封入したナノ粒子 (PVS-NP) の有効性をrd10マウスにおいて評価した。rd10マウスに、PBS、FITC-NP、またはPVS-NPを、P21から週2回静脈内投与した。P31では、PVS-NP群でPBS群と比較して血中IMoおよび網膜マクロファージが有意に減少した (図13)。ミクログリアの割合には3つの治療群間で有意な差はみられなかった (図13)。P52における錐体密度は、PBS群およびFITC-NP群と比較してPVS-NP群で有意に維持された (図14)。また、P35における明所視ERG波は、PBS群と比較してPVS-NP群で有意に維持された (図15)。

[0060] PVS-NPの至適投与量を決定するため、rd10マウスをP21で4つの群に分けて用量設定試験を行なった：PBS群 ( $100 \mu\text{l PBS}$ )、PVS-NP low群 ( $0.1 \text{ mg PVS/kg}$ )、PVS-NP middle群 ( $0.3 \text{ mg PVS/kg}$ )、PVS-NP high群 ( $1.0 \text{ mg PVS/kg}$ )。P21から各実験の終了まで週1回、尾静脈を介して静脈内投与した。P49で明所視ERGならびにPNA陽性錐体細胞数の解析を行なった。明所視ERGb波は、PBS群と比較してPVS-NP middle群およびPVS-NP high群で有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (図16)。PNA陽性錐体細胞数についても同様に、PBS群と

比較してPVS-NP middle群およびPVS-NP high群で錐体変性が有意に抑制された ( $p < 0.01$ ) (図17、18)。

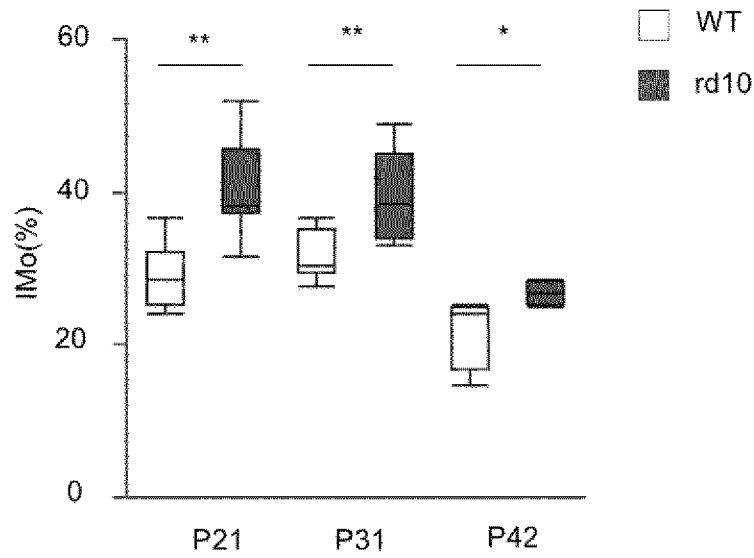
[0061] PVS-NPの至適投与法を決定するため、PVS-NP middle群 ( $0.3 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) の濃度から計算して、次の3つの群に分けて用法設定試験を行った：PBS ( $100 \mu \text{ l PBS}$ ) 2週毎投与群、PVS-NP ( $0.75 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) 4週毎投与群、PVS-NP ( $0.5 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) 2週毎投与群。P21から各実験の終了まで、それぞれの投与間隔で尾静脈を介して静脈内投与した。P49で明所視ERGならばにPNA陽性錐体細胞数の解析を行なった。明所視ERG b波は、PBS群と比較してPVS-NP ( $0.75 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) 4週毎投与群で有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (図19)。PNA陽性錐体細胞数については、PBS群と比較してPVS-NP ( $0.75 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) 4週毎投与群およびPVS-NP ( $0.5 \text{ mg PVS} / \text{kg}$ ) 2週毎投与群で錐体変性が有意に抑制された ( $p < 0.05$ ) (図20)。

[0062] 以上の結果は、スタチン封入ナノ粒子が網膜色素変性症の有望な治療選択肢であることを示す。

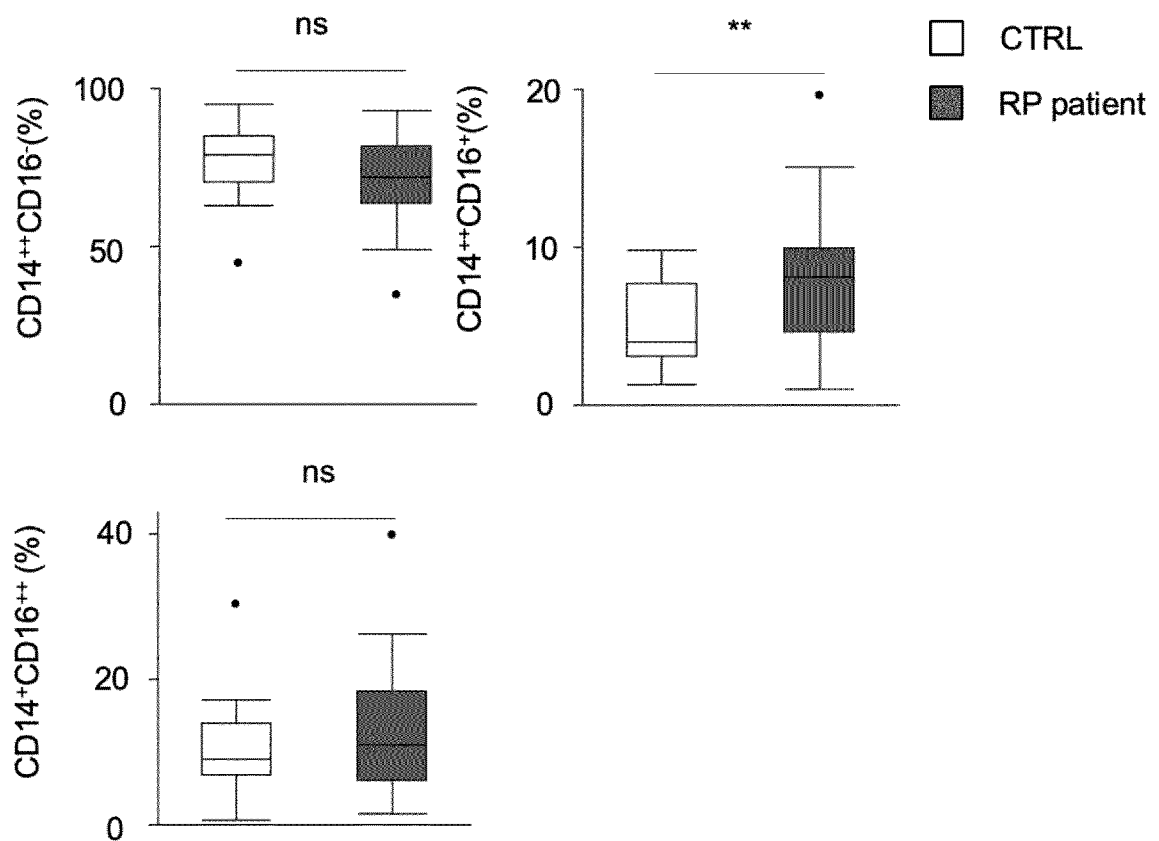
## 請求の範囲

- [請求項1] 網膜色素変性症を治療するための、スタチン封入ナノ粒子を含む医薬組成物。
- [請求項2] スタチンが、ピタバスタチンまたはその医薬上許容される塩である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] スタチンが、ピタバスタチンカルシウムである、請求項1または2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] スタチン封入ナノ粒子が1～15重量%のスタチンを含む、請求項1～3のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項5] スタチン封入ナノ粒子がPLGAを含む、請求項1～4のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項6] スタチン封入ナノ粒子の粒子径が、50～300nmである、請求項1～5のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項7] 1～15重量%のスタチン封入ナノ粒子を含む、請求項1～6のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項8] 1日あたり、スタチンの量として、0.01mg/kg～0.5mg/kgで投与される、請求項1～7のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項9] 静脈内投与される、請求項1～8のいずれかに記載の医薬組成物。

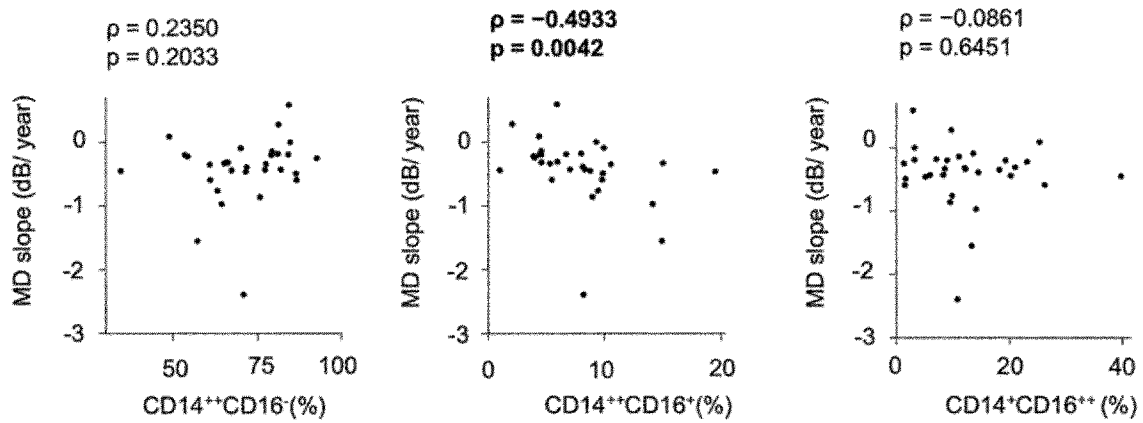
[図1]



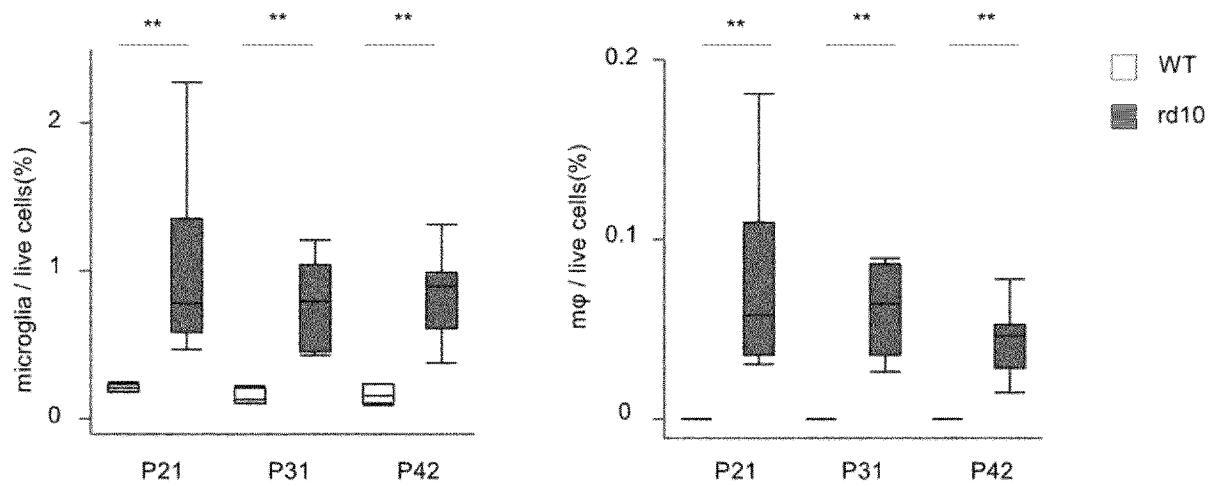
[図2]



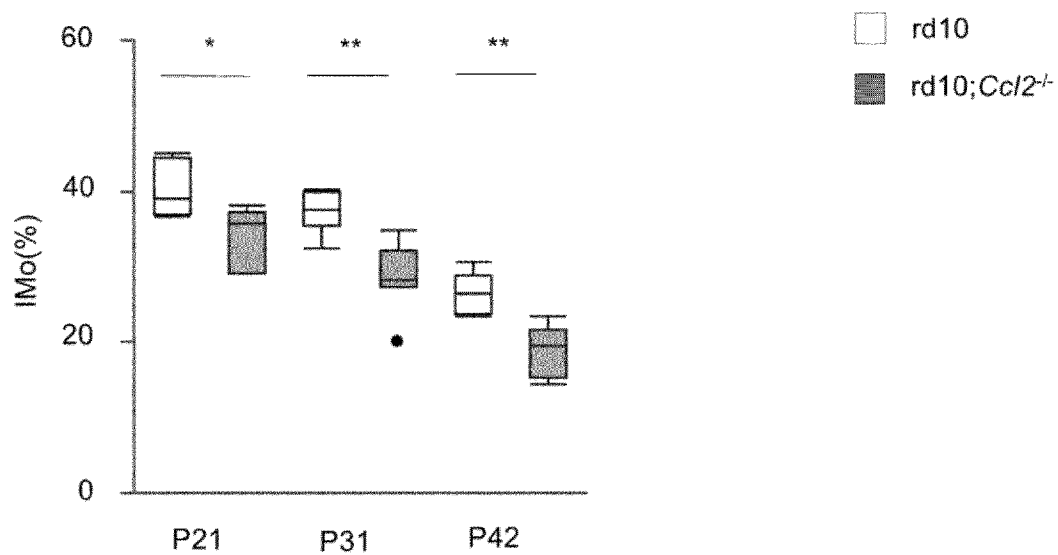
[Fig 3]



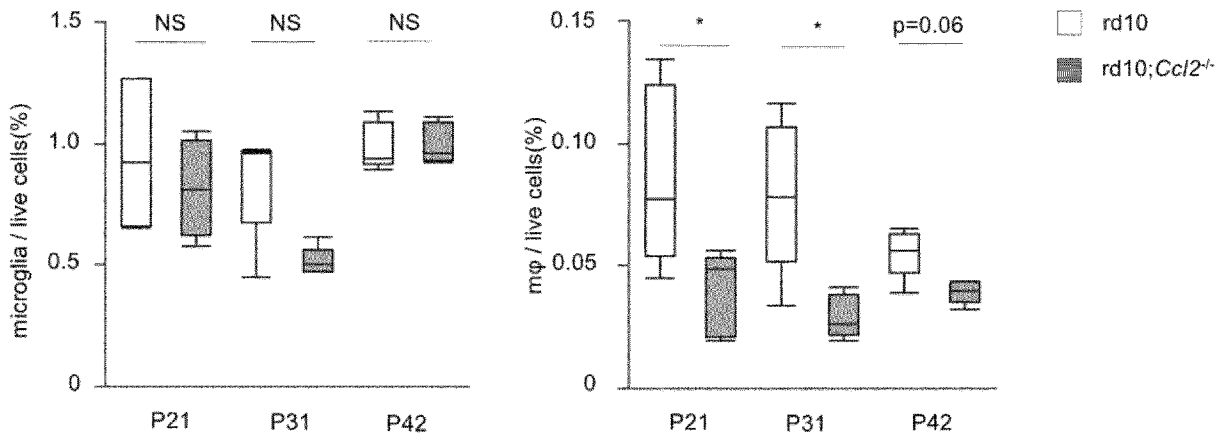
[Fig 4]



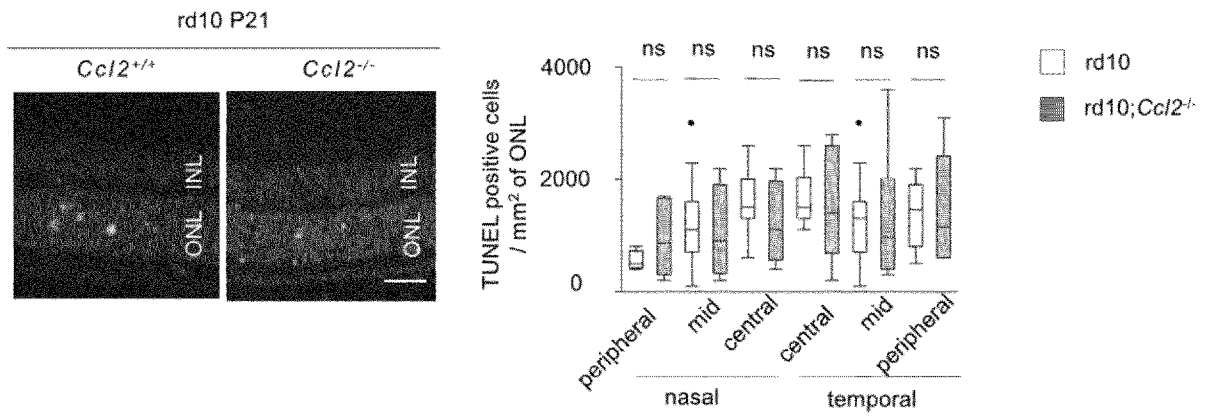
[Fig 5]



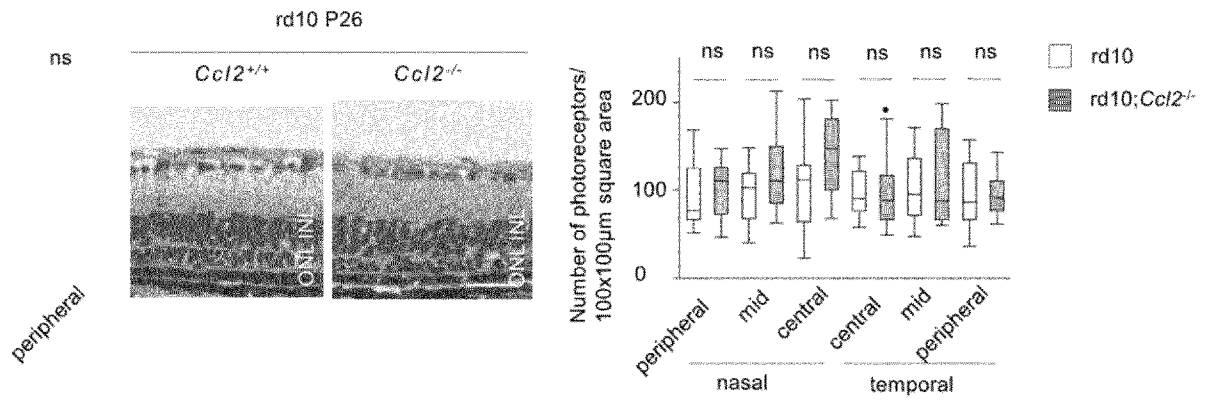
[Figure 6]



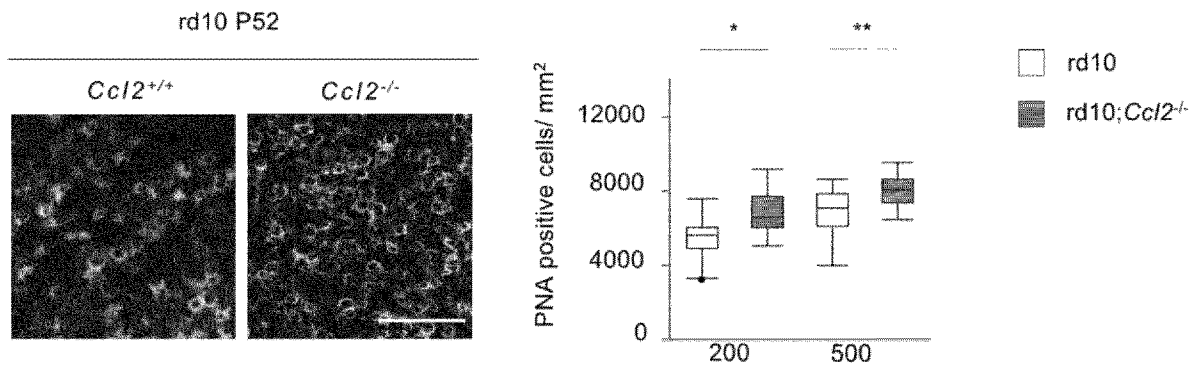
[Figure 7]



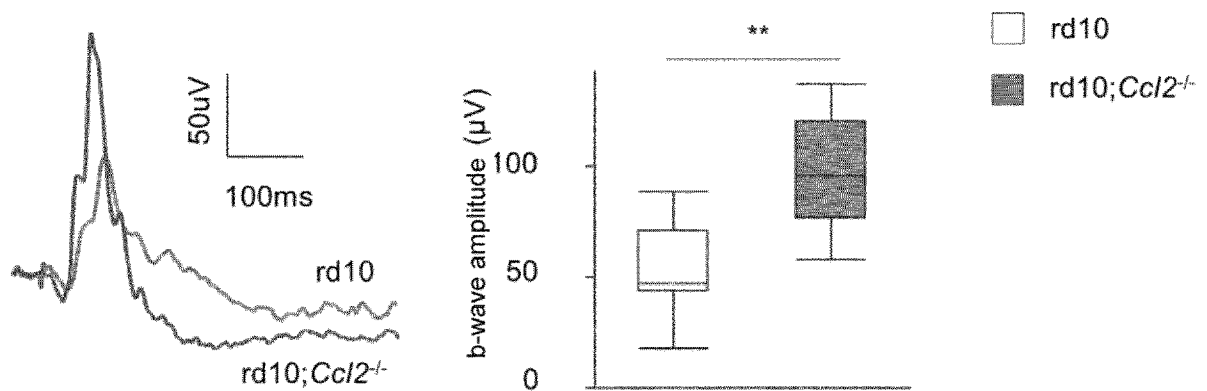
[Figure 8]



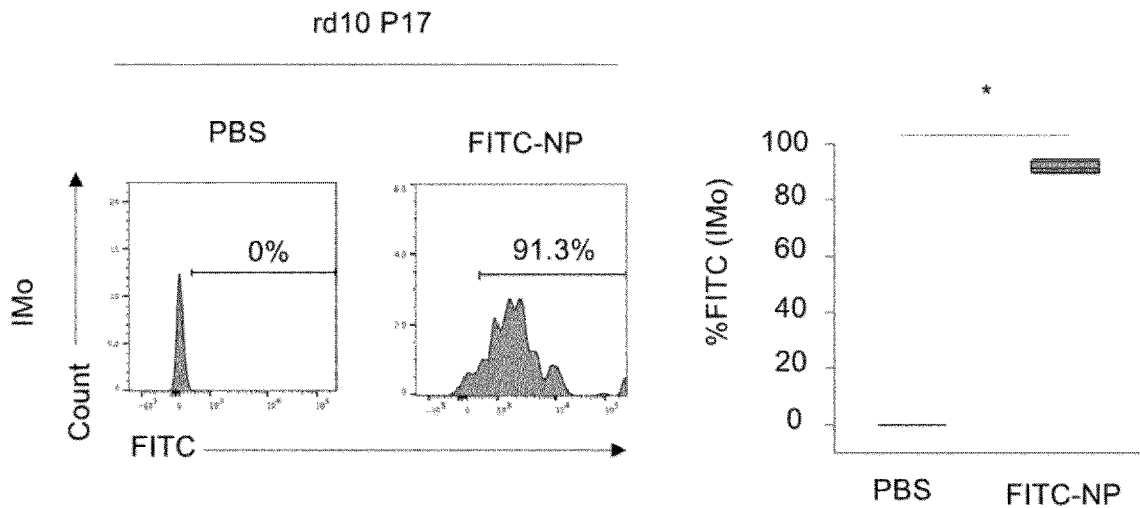
[図9]



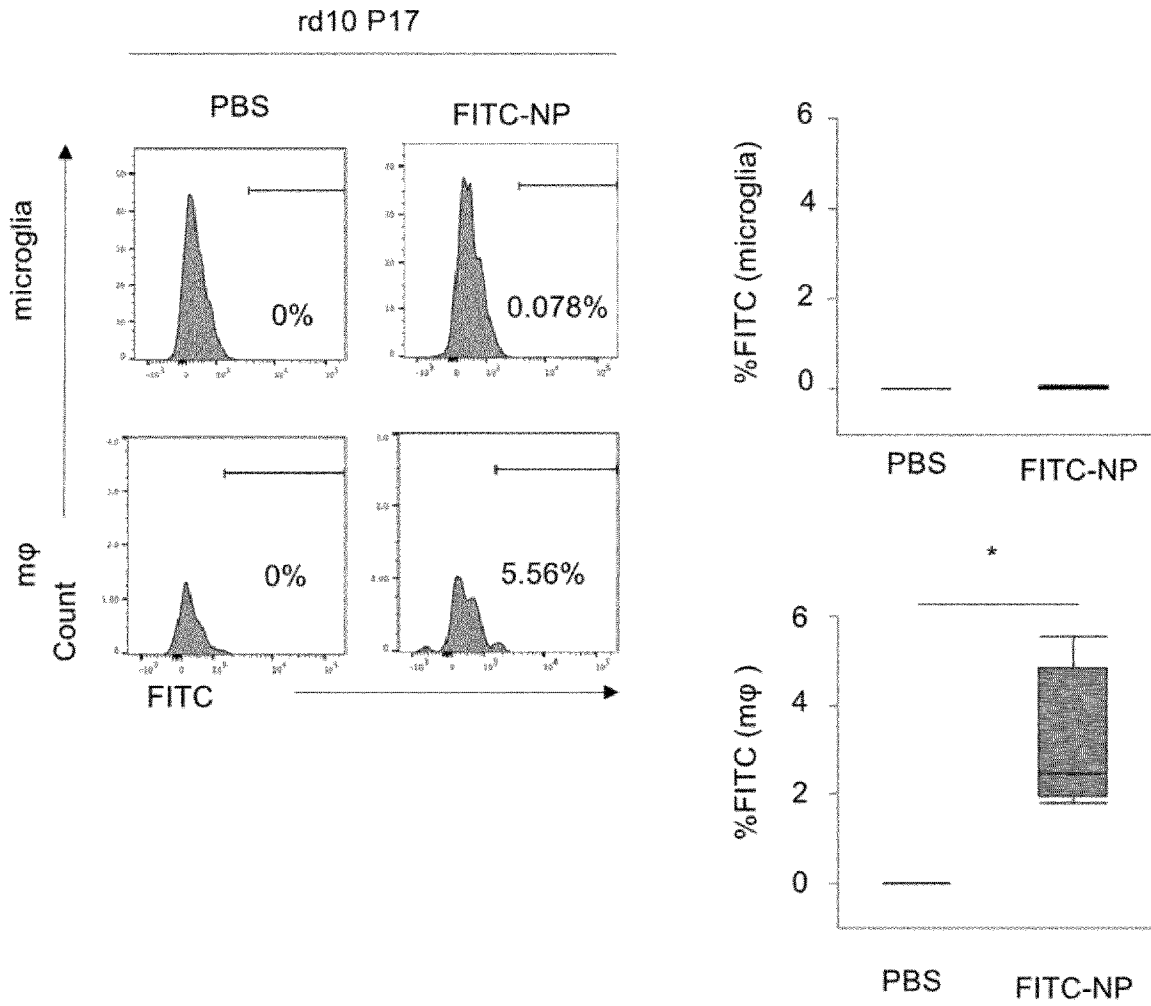
[図10]



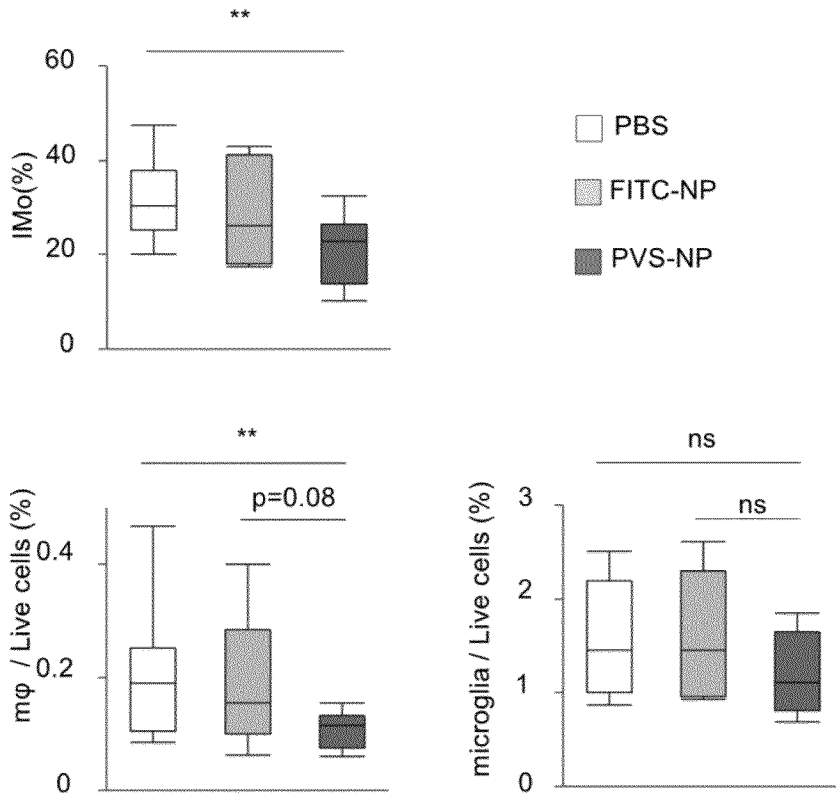
[図11]



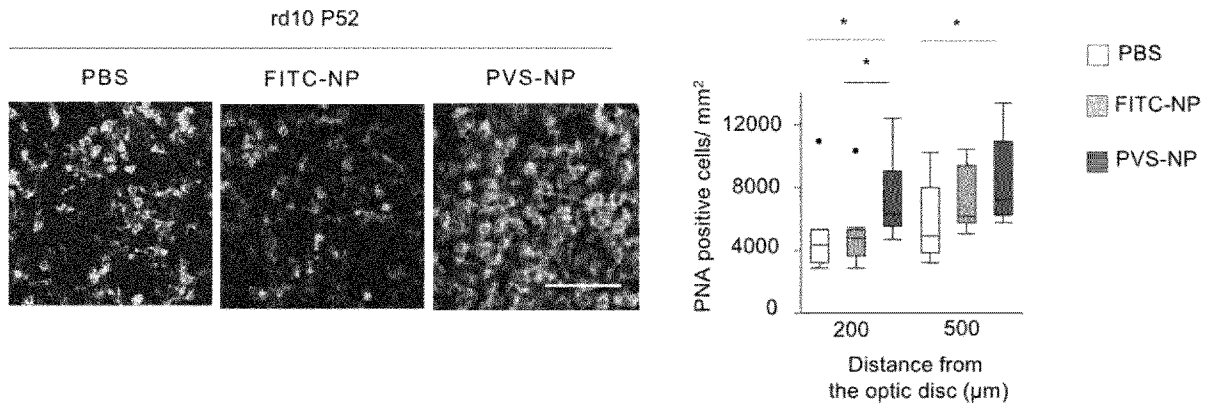
[Figure 12]



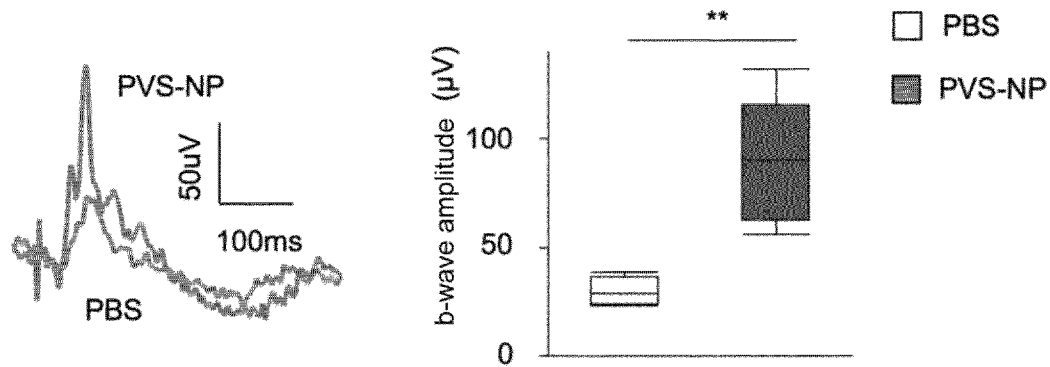
[Figure 13]



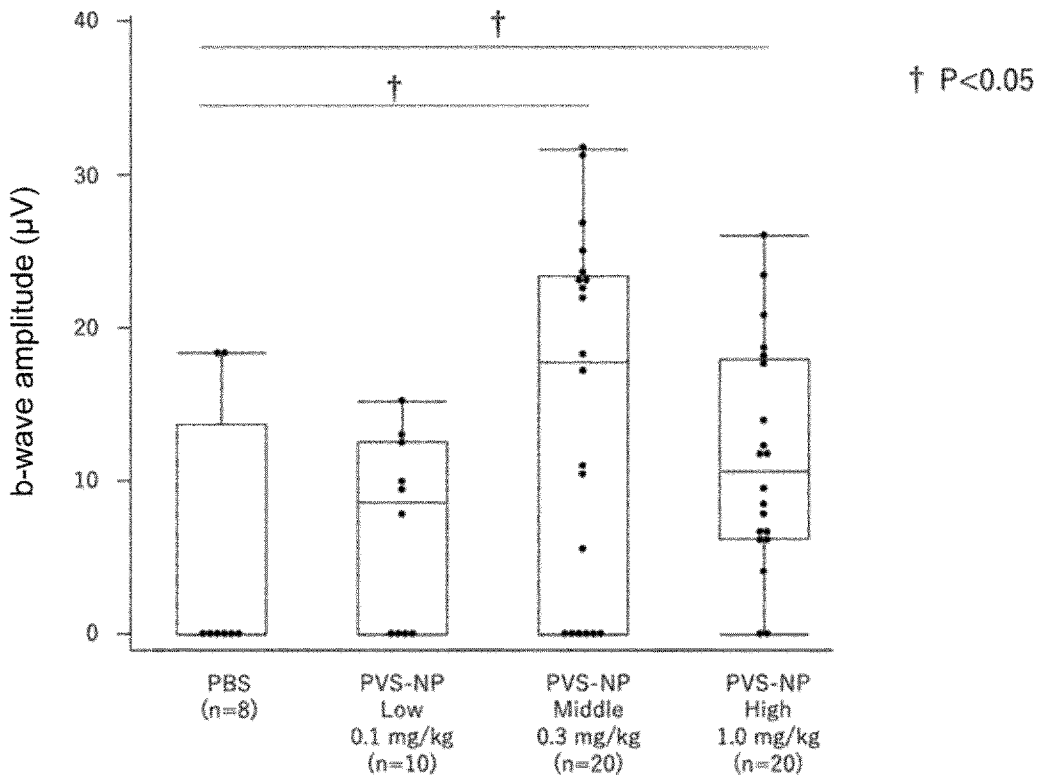
[Figure 14]



[Figure 15]



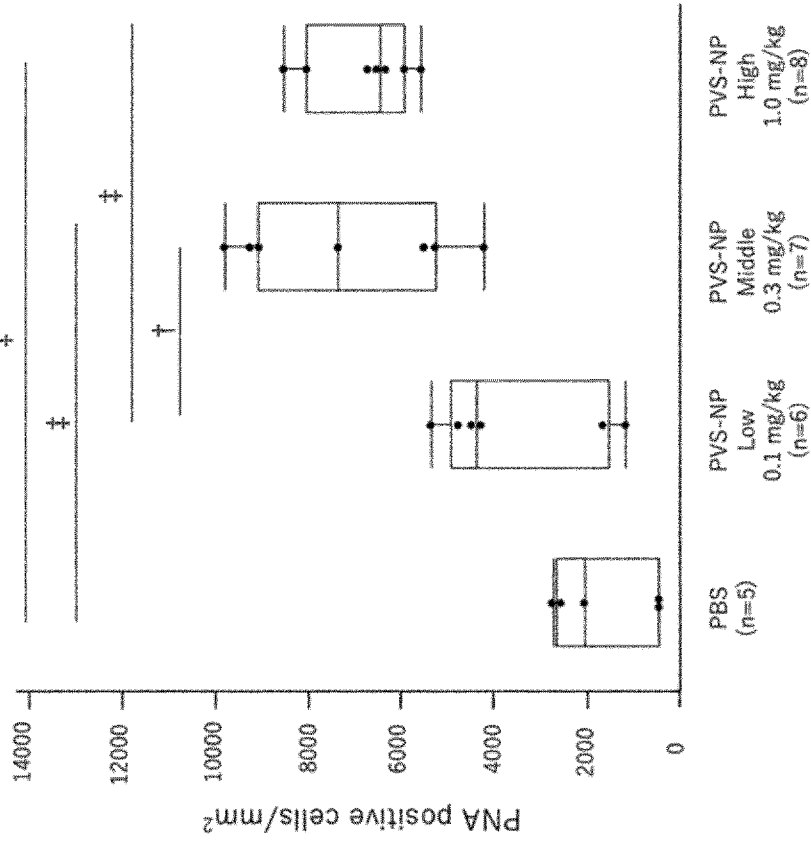
[Figure 16]



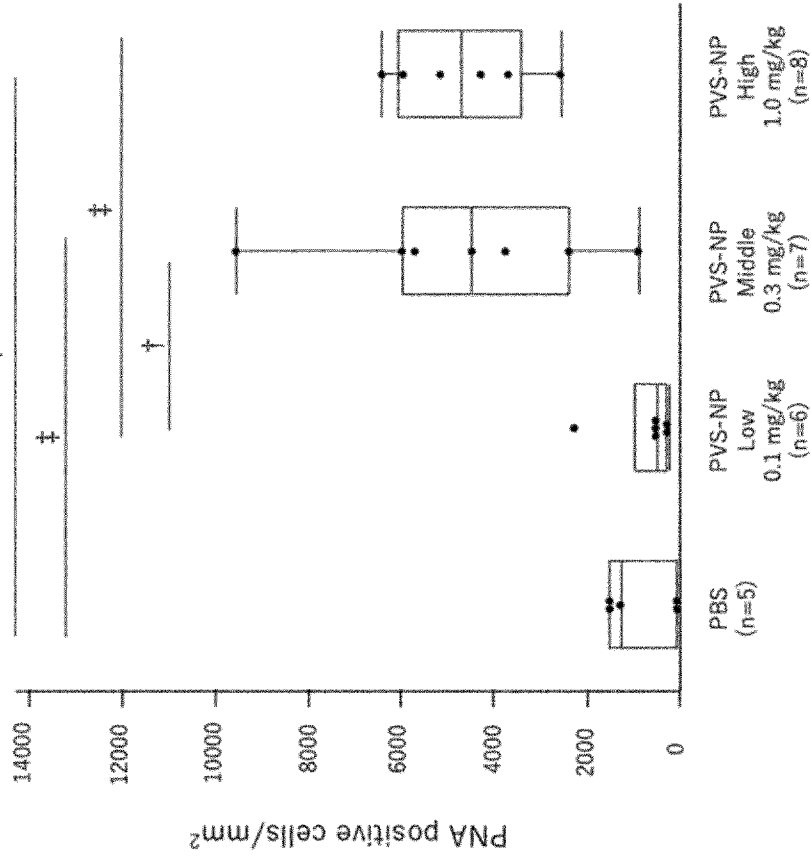
[17]

750µm from disc

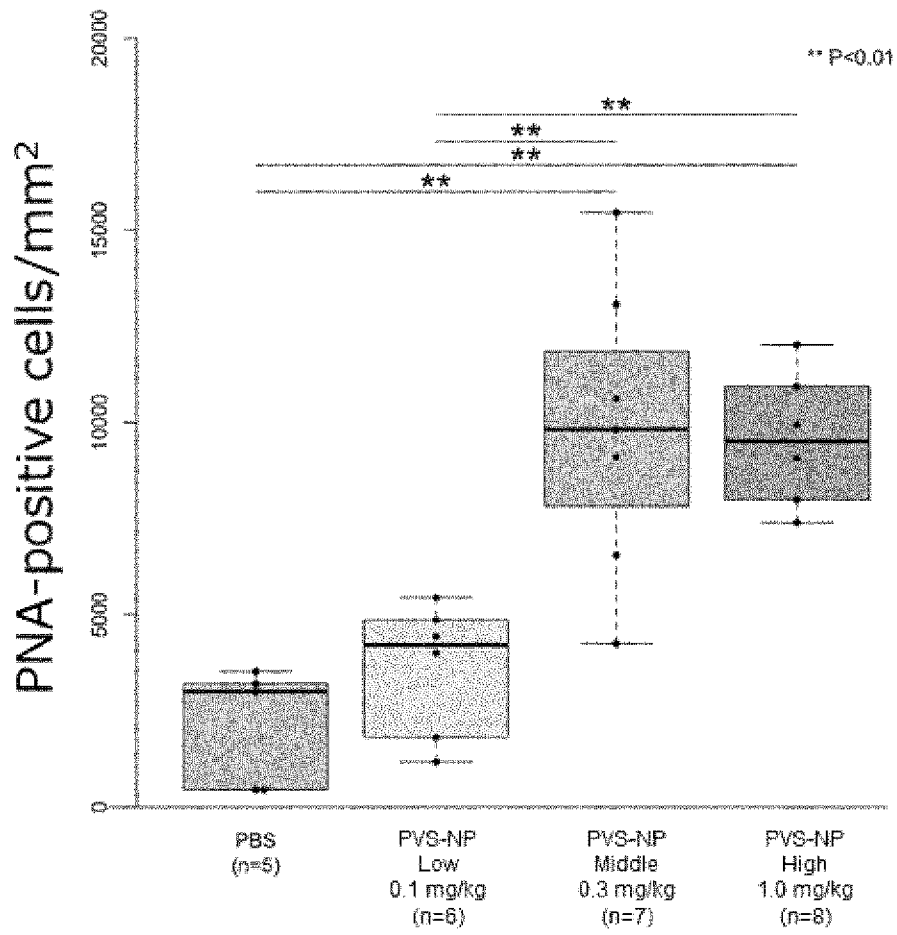
‡ P<0.01  
† P<0.05



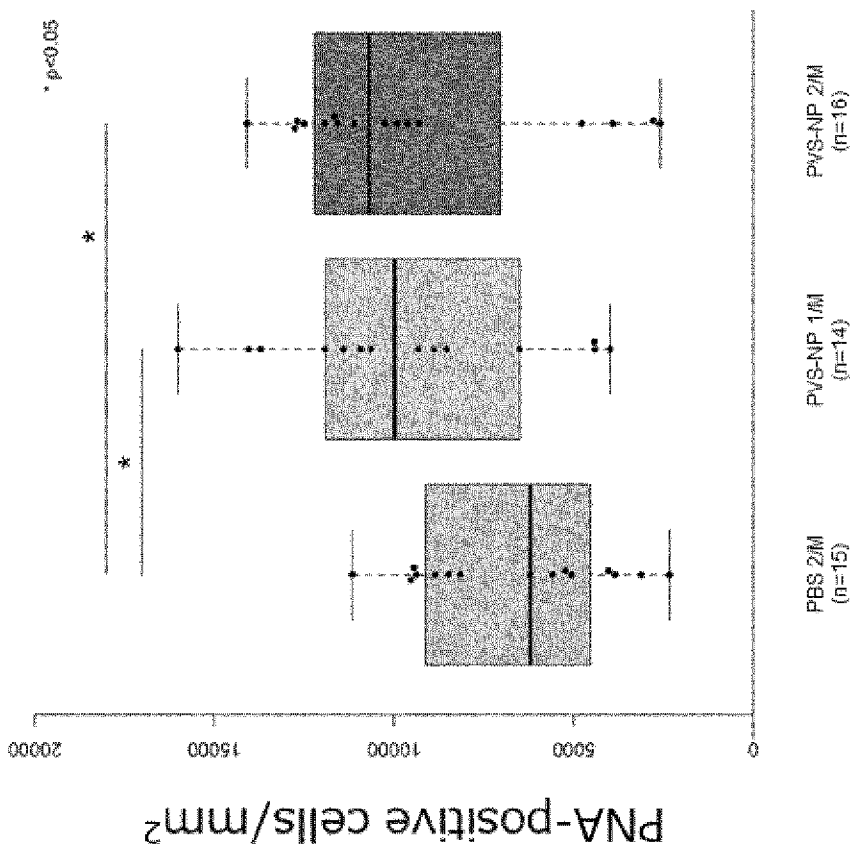
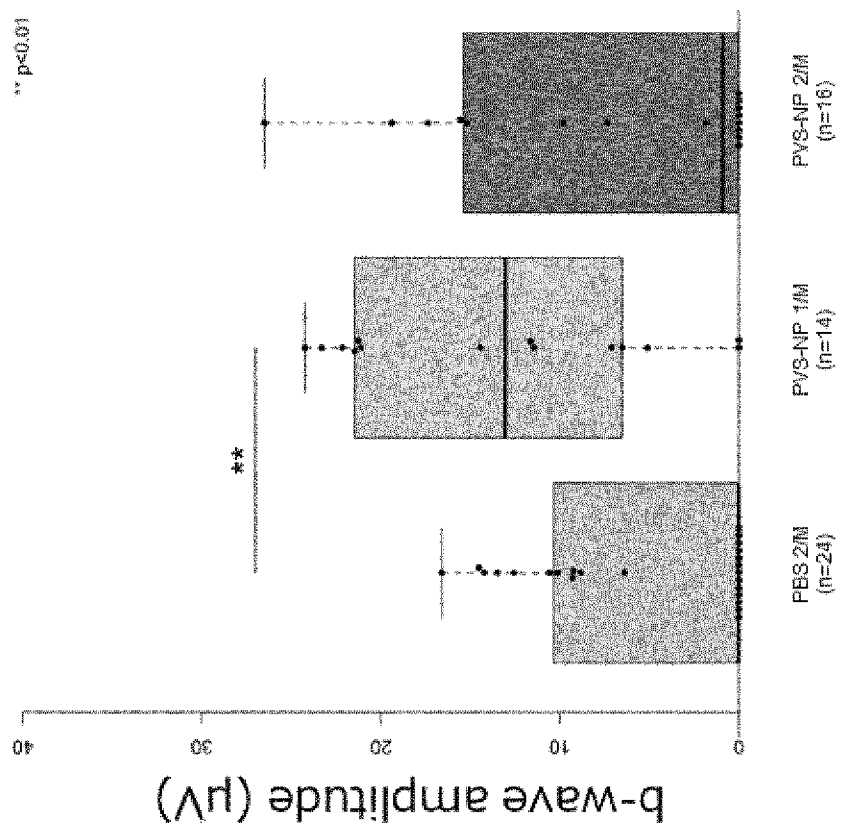
250µm from disc



[圖18]



[19]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002470

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61K 9/51(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/47(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61P 27/02(2006.01)i FI: A61K9/51; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/47; A61K47/34; A61P27/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K9/51; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/47; A61K47/34; A61P27/02		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/026702 A1 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) 06 March 2008 (2008-03-06) claims, examples	1-9
A	小野 眞弓 ほか, 血管新生と血管新生病, 化学と生物, 1999, vol. 37, no. 1, pp. 14-19 pp. 18-19, (ONO, Mayumi et al. Mechanism of Angiogenesis and Angiogenic Diseases. KAGAKU TO SEIBUTSU.)	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>06 April 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>25 April 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/002470**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2008/026702	A1	06 March 2008	US	2010/0086602	A1	
				EP	2057987	A1	
				KR	10-2009-0048478	A	
				CN	101511348	A	
<hr/>							

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 9/51(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 31/47(2006.01)i;                  A61K 47/34(2017.01)i; A61P 27/02(2006.01)i                  FI: A61K9/51; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/47; A61K47/34; A61P27/02</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  A61K9/51; A61K9/10; A61K9/14; A61K31/47; A61K47/34; A61P27/02</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年	
日本国実用新案公報	1922 - 1996年										
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年										
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年										
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年										
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008/026702 A1 (国立大学法人九州大学) 06.03.2008 (2008 - 03 - 06) 請求の範囲、実施例</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>小野 眞弓 ほか, 血管新生と血管新生病, 化学と生物, 1999, Vol. 37, No. 1, pp. 14-19 pp. 18-19</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			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	A	WO 2008/026702 A1 (国立大学法人九州大学) 06.03.2008 (2008 - 03 - 06) 請求の範囲、実施例	1-9	A	小野 眞弓 ほか, 血管新生と血管新生病, 化学と生物, 1999, Vol. 37, No. 1, pp. 14-19 pp. 18-19	1-9
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									
A	WO 2008/026702 A1 (国立大学法人九州大学) 06.03.2008 (2008 - 03 - 06) 請求の範囲、実施例	1-9									
A	小野 眞弓 ほか, 血管新生と血管新生病, 化学と生物, 1999, Vol. 37, No. 1, pp. 14-19 pp. 18-19	1-9									
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.04.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>25.04.2023</p>										
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>福山 則明 4C 4870</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>										

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/JP2023/002470

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2008/026702	A1	06.03.2008	US	2010/0086602	A1	
				EP	2057987	A1	
				KR	10-2009-0048478	A	
				CN	101511348	A	
.....							