



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116801864 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 22

(21) 申请号 202180082955.4

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2021.09.01

专利代理师 田川婷

(30) 优先权数据

2020-205490 2020.12.11 JP

(51) Int.Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/032068 2021.09.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/123837 JA 2022.06.16

(71) 申请人 坪田实验室股份有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 坪田一男 栗原俊英 池田真一

森纪和子 姜效炎

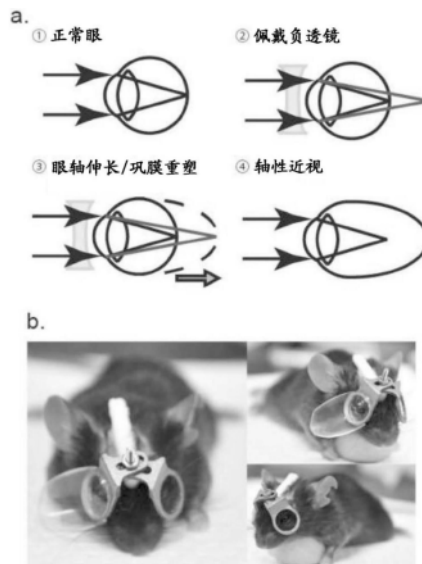
权利要求书1页 说明书18页 附图11页

(54) 发明名称

巩膜变薄治疗用滴眼剂及巩膜变薄治疗剂的筛选方法

(57) 摘要

本发明的课题为提供探索抑制或治疗巩膜变薄的成分的筛选方法、及滴眼剂,该滴眼剂通过含有该有效成分从而能抑制巩膜过度变薄,其结果可治疗巩膜变薄所伴随的眼后节疾病。本发明的解决手段是通过含有可同时抑制PERK通路及/或ATF6通路的成分作为有效成分的滴眼剂来解决上述课题。通过可同时抑制PERK通路及/或ATF6通路的成分的筛选方法来解决上述课题,该筛选方法包括:使候选物质接触源自眼的细胞的工序;和以前述细胞中对巩膜变薄造成的影响为指标来选择候选物质的工序。



1. 巩膜变薄治疗用滴眼剂,其含有PERK (PKRK-样内质网激酶) 通路及/或ATF6 (转录激活因子6)通路的抑制剂作为有效成分。

2. 如权利要求1所述的滴眼剂,其中,所述抑制剂为选自由苯基丁酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种。

3. 如权利要求1或2所述的滴眼剂,其中,所述抑制剂为苯基丁酸钠。

4. 如权利要求1~3中任一项所述的滴眼剂,其中,所述抑制剂的含量相对于滴眼剂总量而言为0.01~5质量%。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的滴眼剂,其中,所述巩膜变薄治疗是对由巩膜变薄所引起的眼后节疾病进行治疗。

6. 如权利要求5所述的滴眼剂,其中,所述眼后节疾病为近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管或近视性视神经病变。

7. 巩膜变薄治疗剂的筛选方法,所述筛选方法包括:使候选物质接触源自眼的细胞的工序;和以所述细胞中的、PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化为指标来选择候选物质的工序。

## 巩膜变薄治疗用滴眼剂及巩膜变薄治疗剂的筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及针对近视不断进展的成人的眼,含有通过抑制影响眼球形状的巩膜变薄而正常维持眼球形状、能治疗巩膜变薄所伴随的眼疾病的有效成分的巩膜变薄治疗用滴眼剂、及该巩膜变薄治疗剂的筛选方法。

### 背景技术

[0002] 根据近视及重度近视相关的最新研究,预测全球近视人口将会显著增加,预测到2050年,近视将达到约50亿人、重度近视达到约10亿人(参见非专利文献1)。

[0003] 此外,就日本数项流行病学调查的结果,-6D以上的重度近视的患病率为5%左右,且作为以一般居民为对象的流行病学研究的多治见研究(Tajimi Study)中,由重度近视所引起的近视性黄斑变性成为失明的第三大原因(参见非专利文献2)。

[0004] 已知因此种重度近视,为维持眼球形状而担负着决定性作用的巩膜发生变薄,另外已知该巩膜变薄会引起各种眼疾病(参见非专利文献2)。若对这些巩膜变薄伴随眼疾病进行分类,则可举出近视性黄斑变性等眼后节疾病、白内障、眼球运动障碍。在任何巩膜变薄伴随眼疾病中,一旦受损的视神经或晶状体并不易治疗或再生,抑制这些疾病的根本原因即与过度眼轴伸长相伴的巩膜变薄(眼球的变形)是根治疗法。

[0005] 例如,作为巩膜变薄伴随眼疾病之一的近视性脉络膜新生血管(近视性CNV)的情况下,作为抑制新生血管的现有药物,已知有阿柏西普及雷珠单抗。然而,这些抗体医药虽可抑制新生血管,但没有巩膜变薄治疗效果,另外已知有脉络膜瘢痕化等预后不良。因此,亟需该疾病成重症化之前的早期根本治疗(减轻对眼后节的机械压力)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开W02018/164113

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050,Ophthalmology,Vol 123,Number5,May 2016.

[0011] 非专利文献2:增加的近视・重度近视,医学的进程(増加する近視・強度近視、医学のあゆみ),Vol.253,Issue2,159-161,2015.

[0012] 非专利文献3:不二门尚,“日本眼科学会专业医师制度生涯教育讲座总论54防止幼儿近视进展(日本眼科学会専門医制度生涯教育講座総説54小児の近視の進行防止)”,日眼会志,117卷,4号,397页~406页(2013年4月10日)。

[0013] 非专利文献4:Posterior staphyloma in pathological myopia,Progress in Retinal and Eye Research,70(2019)99-100.

[0014] 非专利文献5:Pathogenesis and Prevention of Worsening Axial Elongation in Pathological Myopia,Clinical Ophthalmology 2020:14853-873.

[0015] 非专利文献6:Jiang,X.,等人,A highly efficient murine model of

experimental myopia. Scientific reports 8, 2026, doi:10.1038/s41598-018-20272-w (2018).

[0016] 非专利文献7: Mori, K., 等人, Oral crocetin administration suppressed refractive shift and axial elongation in a murine model of lens-induced myopia. Scientific reports 9, 295, doi:10.1038/s41598-018-36576-w (2019).

## 发明内容

[0017] 发明所要解决的课题

[0018] 近年来,与巩膜变薄(在本说明书中也称为眼球的变形)有关的因子已明确。本申请的发明人对该因子组进行认真研究,结果发现UPR(unfolded protein response)基因组参与眼轴伸长(参见专利文献1)。该因子组已知有PERK(PKR-样内质网激酶)、ATF6(转录激活因子6)、IRE1(Inositol requiring 1)这三种,但尚不清楚如何调控这些因子才能抑制或治疗巩膜变薄。换言之,认为如何控制该基因组在巩膜变薄及伴随眼疾病的治疗策略上是极为决定性且困难的。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 本申请的发明人研究了模拟成人的巩膜变薄(过度的眼轴伸长)的试验体系,并对小鼠的近视诱导结束后的巩膜变薄的机制、与对该巩膜变薄治疗有效的成分进行了研究。若为这样的成分,则可强烈期待能够抑制巩膜变薄、进而治疗巩膜变薄所伴随的眼疾病。

[0021] 本发明的目的在于提供探索可抑制成人的重度近视所引起的巩膜变薄的成分的筛选方法,另外,提供可通过利用该筛选方法而得到的有效成分来治疗巩膜变薄及其伴随眼疾病的滴眼剂。

[0022] 即,本发明为:

[0023] [1] 巩膜变薄治疗用滴眼剂,其含有PERK(PKR-样内质网激酶)通路及/或ATF6(转录激活因子6)通路的抑制剂作为有效成分。

[0024] [2] 如上述[1]所述的滴眼剂,其中,前述抑制剂为选自由苯基丁酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种。

[0025] [3] 如上述[1]或[2]所述的滴眼剂,其中,前述抑制剂为苯基丁酸钠。

[0026] [4] 如上述[1]~[3]中任一项所述的滴眼剂,其中,前述抑制剂的含量相对于滴眼剂总量而言为0.01~5质量%。

[0027] [5] 如上述[1]~[4]中任一项所述的滴眼剂,其中,前述巩膜变薄治疗是对由巩膜变薄所引起的眼后节疾病进行治疗。

[0028] [6] 如上述[5]所述的滴眼剂,其中,前述眼后节疾病为近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管或近视性视神经病变。

[0029] [7] 巩膜变薄治疗剂的筛选方法,前述筛选方法包括:使候选物质接触源自眼的细胞的工序;和以前述细胞中的PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化为指标来选择候选物质的工序。

[0030] 发明效果

[0031] 根据本发明,可提供探索可抑制巩膜变薄的成分的筛选方法。另外,可提供可通过利用该筛选方法而得到的有效成分来治疗巩膜变薄及其伴随眼疾病的滴眼剂。

## 附图说明

[0032] [图1]为小鼠的近视诱导的说明图, (a)为近视诱导的示意性结构图; (b)为近视诱导小鼠的照片。

[0033] [图2]为示出近视诱导在巩膜中诱发眼轴伸长与屈光变化的图表, (a)为小鼠 ( $n=4$ ) 的近视诱导3周的眼轴长度变化 ( $*p<0.05$ ); (b)为小鼠 ( $n=4$ ) 的近视诱导3周的屈光变化 ( $*p<0.05$ )。

[0034] [图3]为近视诱导后的眼科学及细胞学变化的说明图。(a)为对照眼及近视诱导眼的苏木精及伊红染色,黄色长条表示巩膜的厚度(各组 $n=5$ ,比例尺为 $50\mu\text{m}$ )。(b)为针对巩膜厚度的测定的说明图,将视神经盘的位置设为“0”,以距视神经盘上方(+)及下方(-)的距离( $400\mu\text{m}$ 、 $700\mu\text{m}$ 、 $1000\mu\text{m}$ 、 $1300\mu\text{m}$ 、 $1600\mu\text{m}$ 、 $1900\mu\text{m}$ 、 $2200\mu\text{m}$ 及 $2500\mu\text{m}$ )测定巩膜厚度。(c)为该巩膜厚度测定结果的图表。

[0035] [图4]为示出作为UPR基因的PERK通路、ATF6通路、IRE1通路各自的各种抑制剂的说明图。

[0036] [图5]为示出对小鼠滴眼PERK通路、ATF6通路、IRE1通路的各种抑制剂而引起的眼轴伸长及屈光变化(近视化)的图表。(a)为示出单独滴眼STF080310 (STF)、GSK2656157 (GSK)及奈非那韦(NFV)对眼轴伸长造成的影响的图表(各组 $n=5$ ),是与DMSO滴眼NL(=no lens,无透镜)组比较的结果( $*p<0.05$ )及与STF滴眼NL组或-30D透镜佩戴组比较的结果( $\#p<0.05$ )。(b)为示出单独滴眼STF、GSK及NFV对屈光的近视化造成的影响的结果(各组 $n=5$ ),是与DMSO滴眼NL组比较的结果( $*p<0.05$ )及与STF滴眼NL组或-30D透镜佩戴组比较的结果( $\#p<0.05$ )。(c)为示出并用滴眼STF、GSK及NFV对眼轴伸长造成的影响的结果(各组 $n=4$ ),是与DMSO滴眼NL组比较的结果( $*p<0.05$ )。(d)为示出并用滴眼STF、GSK及NFV对屈光的近视化造成的影响的结果(各组 $n=4$ ),是与DMSO滴眼NL组比较的结果( $*p<0.05$ )。

[0037] [图6]为示出与图5不同的抑制剂中的、PERK通路、ATF6通路、IRE1通路的各种抑制剂对小鼠滴眼而引起的眼轴伸长及屈光变化(近视化)的图表。(a)为示出单独滴眼 $4\mu\text{8C}$ 、GSK2606414及Ceapin-A7对眼轴伸长造成的影响的图表(各组 $n=5$ ),是与DMSO滴眼NL(=no lens)组比较的结果( $*p<0.05$ )及与 $4\mu\text{8C}$ 滴眼NL组或-30D透镜佩戴组比较的结果( $\#p<0.05$ )。(b)为示出单独滴眼 $4\mu\text{8C}$ 、GSK2606414及Ceapin-A7对屈光的近视化造成的影响的结果(各组 $n=5$ ),是与DMSO滴眼NL组比较的结果( $*p<0.05$ )及与 $4\mu\text{8C}$ 滴眼NL组或-30D透镜佩戴组比较的结果( $\#p<0.05$ )。

[0038] [图7]为小鼠的近视诱导诱导出巩膜中的UPR基因表达亢进的图表,通过定量PCR测定在PBS的腹腔注射(PBS)及施予苯基丁酸钠(4-PBA;  $200\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ )的巩膜(各组 $n=6$ )中UPR基因的表达,相对于对照眼(白色柱),近视诱导眼(灰色柱)中基因表达亢进,表示由4-PBA造成其抑制的结果( $*p<0.05$ )。

[0039] [图8]为小鼠的近视诱导诱导出眼轴伸长及屈光的近视化的图表, (a)为示出眼轴伸长在近视诱导(LIM)第1周及第3周的被苯基丁酸的腹腔注射(4-PBA;  $200\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ )所抑制的结果(各组 $n=6$ 、 $*p<0.05$ ); (b)为示出屈光的近视化在近视诱导(LIM)第1周及第3周的被4-PBA施予所抑制的结果(各组 $n=6$ 、 $*p<0.05$ )。

[0040] [图9]为小鼠的近视诱导诱导出眼轴伸长及屈光的近视化的图表, (a)为示出屈光的近视化被牛磺熊去氧胆酸的腹腔注射(TUDCA;  $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重)所抑制的图表(各组 $n=4$ 、\*

$p < 0.05$ ) ; (b) 为示出眼轴伸长被TUDCA所抑制的图表(各组 $n=4$ 、 $*p < 0.05$ )。

[0041] [图10] (a) 为对无透镜(NL)及佩戴-30D透镜的C57BL6J小鼠滴眼PBS或4-PBA的情况下的、巩膜胶原纤维的透射型电子显微镜影像(生物学上独立的3个试样的代表性影像)。(b) 为巩膜胶原纤维面积( $n=$ 生物学上独立的3个试样)的结果。就纤维面积而言,使用ImageJ软件测定由1个巩膜所得的5个影像。

[0042] [图11]为滴眼4-PBA对近视进展停止后的成人的近视化有效的说明图,是示出在3周的近视诱导(LIM)期间结束后(模拟成人的近视期间)进行滴眼的实验计划的示意图。

[0043] [图12]为在与成人的近视期间相当的小鼠的近视诱导期间结束后滴眼4-PBA时的抑制近视效果,(a)为空白对照(vehicle)( $n=7$ )及4-PBA( $n=5$ )滴眼组的预处理(Pre-treatment)至1周(1wk)或3周(3wk)的眼轴伸长结果,(b)为同样地滴眼时的屈光变化( $n=5$ )。

[0044] [图13]为试验例7中对滴眼4-PBA或者施予UPR基因抑制剂对主要胶原蛋白成分的减少的影响进行评价的结果。

[0045] [图14]为试验例8中对巩膜变薄及其伴随眼后节疾病的治疗中的ATF6通路的参与进行评价的图表。

[0046] [图15]为示出试验例9中施予形态的不同对近视诱导所致的晶状体肥厚造成的影响的图表。

## 具体实施方式

[0047] 以下详细说明本发明。本发明不限于以下实施方式及实验例,在包含本发明要旨的范围内包含各种的变形例、应用例。

[0048] [巩膜变薄治疗用滴眼剂]

[0049] 本发明的巩膜变薄及其伴随的眼疾病治疗用滴眼剂含有PERK(PKR-样内质网激酶)通路及ATF6(转录激活因子6)通路的抑制剂作为有效成分。

[0050] (巩膜变薄治疗剂)

[0051] 如上所述,过度的眼轴伸长会引起巩膜的变薄(眼球的变形),攸关巩膜变薄及伴随眼疾病的发生及/或恶化。如后述的实验例所示,于近视诱导小鼠模型中,确认到引起巩膜变薄,其是导致眼球的变形的原因,其机制为,UPR基因组的特定基因的表达亢进,其结果暗示了引起巩膜中的胶原纤维的狭窄化,终至巩膜变薄。因此,对巩膜变薄具有抑制效果的物质可作为有效成分。

[0052] 即,能以参与巩膜变薄的基因及/或蛋白质为靶标,将抑制它们的化合物、反义寡核苷酸、siRNA等核酸等作为对巩膜变薄及伴随眼疾病的治疗而言有效的成分而配合于滴眼剂。

[0053] 于本说明书中,PERK通路及ATF6通路的抑制剂是指对PERK的信号转导系统(PERK通路)及ATF6的信号转导系统(ATF6通路)中的任一者均具有抑制效果的物质。对这些信号转导系统的抑制效果可如后述实施例那样通过已知的方法以参与这些信号转导系统的基因及/或蛋白质的变化为指标来进行评价。

[0054] (PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂)

[0055] 如上所述,作为与巩膜变薄(病理性眼轴伸长)有关的因子,对作为内质网中的异

常蛋白质的未折叠蛋白进行应答的基因通路参与病理性眼轴伸长。该基因通路已知有PERK通路、ATF6通路及IRE1通路这三种,如后述实验例所示,新发现了至少抑制ATF6通路对于抑制近视而言是必须的。另外,新发现了这三种通路之中,通过抑制PERK通路及ATF6通路,抑制近视进展的效果进一步提高。还确认到仅抑制PERK通路或ATF6通路中的任一者时,有时会代偿性地激活另一个通路。因此,虽不予限定,于一个实施方式中,对PERK通路及ATF6通路中的任一者均具有抑制效果的物质可成为抑制病理性眼轴伸长(巩膜变薄)的有效成分。

[0056] 即,能以与PERK及/或ATF6的信号转导有关的基因或蛋白质为靶标,将可使它们减少的化合物、可降低PERK通路及/或ATF6通路的蛋白质表达的反义寡核苷酸、siRNA等核酸作为对治疗巩膜变薄而言有效的成分而配合于滴眼剂。

[0057] 于本说明书中,PERK通路或ATF6通路的抑制剂是指对内质网中的PERK的信号转导系统或ATF6的信号转导系统具有抑制效果的物质。对这些信号转导系统的抑制效果可通过后述实验例所记载的方法、或通过已知的方法,以参与这些信号转导系统的基因及/或蛋白质的变化为指标来进行评价。

[0058] 对参与PERK的信号转导系统的因子的基因表达或蛋白质的表达进行评价时,可与未添加候选物质的对照相比较,由候选物质使该因子的表达变动至少1%来进行评价。

[0059] 另外,对与ATF6的信号转导系统有关的因子的基因表达或蛋白质的表达进行评价时,可与未添加候选物质的对照相比较,由候选物质使该因子的表达变动至少1%来进行评价。

[0060] PERK为内质网膜跨膜型激酶,作为与其信号转导有关的因子,可举出例如eIF2 $\alpha$ (真核起始因子2 $\alpha$ )、ATF4(转录激活因子4)、CHOP(C/EBP同源蛋白)、GADD34(生长停滞DNA与损伤诱导蛋白34,growth arrest DNA and damage protein 34)等。

[0061] 另外,ATF6是属于CREB/ATF家族的膜结合型转录因子,作为与其信号转导有关的因子,可举出例如BiP(结合免疫球蛋白,Binding immunoglobulin protein,也称为“GRP78”)、Txn12(thioredoxin domain containing 12,也称为“ERp18”)、S1P(位点1蛋白酶,site-1protease)、S2P(位点2蛋白酶,site-2protease)等。

[0062] 于后述实验例中,通过筛选可抑制PERK通路及ATF6通路这两者的成分,发现了选自自由苯基丁酸、牛磺熊去氧胆酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种。然而,并不限于此,也可使用新鉴定为至少抑制ATF6通路的成分的成分、或新鉴定为抑制PERK通路及ATF6通路的成分的成分。作为PERK通路及ATF6通路的抑制剂,虽不予限定,从滴眼剂中的溶解性的观点考虑,优选为苯基丁酸钠。如后述的实验例所记载,若为苯基丁酸钠,则在ATF6通路之外,还可抑制PERK通路,故而优选。PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂可通过已知的方法进行合成而使用,也可购买市售品而使用。

[0063] 于本说明书中,“药学上容许的盐”并无特别限制,具体而言,可例举有机酸盐、无机酸盐、有机碱或无机碱。作为有机酸盐,可举出例如乙酸盐、三氟乙酸盐、丁酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐等单羧酸盐;富马酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、丙二酸盐等多元羧酸盐;乳酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐等羟基羧酸盐;甲烷磺酸盐、甲苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐等有机磺酸盐。作为无机酸盐,可举出例如盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐。作为与有机碱的盐,可举出例如与甲基胺、三乙基胺、三乙醇胺、二乙醇胺、吗啉、哌嗪、吡咯烷、三吡啶、甲基吡啶、乙二胺等有机胺的盐。作为与无机碱的盐,可举出例如铵盐;与钠或钾等碱金属、钙或镁

等碱土金属、铝等金属的盐等各种盐。这些盐可单独使用1种,也可任意组合而使用2种以上。“药学上容许的盐”也可包括盐的溶剂合物或水合物。

[0064] PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂的含量可根据用法、用量、添加剂的种类等适当地变更。例如相对于滴眼剂总量,优选为0.01质量%以上,更优选为0.05质量%以上,进一步优选为0.1质量%以上,特别优选为0.2质量%以上。另外,PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂的含量,例如相对于滴眼剂总量,优选为5质量%以下,更优选为4质量%以下,进一步优选为3质量%以下,特别优选为2质量%以下。另外,PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂的含量,例如相对于滴眼剂总量,优选为0.01~5质量%,更优选为0.05~4质量%,进一步优选为0.1~3质量%,特别优选为0.2~2质量%。

[0065] 作为巩膜变薄治疗剂,使用选自苯基丁酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种时,就其含量而言,例如相对于滴眼剂总量,优选为0.01~5质量%,更优选为0.05~4质量%,进一步优选为0.1~3质量%,特别优选为0.2~2质量%。

[0066] [用途]

[0067] 眼轴长度在出生后至2岁左右急速伸长,其后便缓慢伸长。这种与成长相伴的眼轴伸长称为“生理性眼轴伸长”,是眼睛发育所不可或缺的现象。然而,在学童期以后眼轴长度也持续伸长则会导致近视进展,因此被认为是“病理性眼轴伸长”。例如,就病理性眼轴伸长而言,成人的眼中眼轴长度伸长1mm会导致增加约3.0D的近视度数。

[0068] 本发明的滴眼剂被用于巩膜变薄及伴随眼疾病的治疗用途。于本说明书中,巩膜变薄伴随眼疾病是指因重度近视使眼轴长度器质地过度伸长所引起的疾病。重度近视中,维持着眼球形状的巩膜的变薄被认为是上述伴随眼疾病的初期症状(参见非专利文献4)。

[0069] 于后述实施例中,近视诱导小鼠中,于近视诱导结束后的3周眼轴仍持续伸长,发生巩膜的变薄。即,确认到近视诱导结束后的病理性眼轴伸长与巩膜变薄在与儿童的近视进展后的成年期相当的期间仍会持续,暗示了这为巩膜变薄及伴随眼疾病的发病机制。因此,考虑以巩膜厚度、巩膜中胶原纤维的粗细度、或者巩膜中胶原蛋白相关基因·蛋白(选自COL1A1、COL4A3、COL8A2、COL11A2、及COL15A1组成的组中的至少1种)的表达等对巩膜的变薄进行评价,筛选出可抑制其变薄的成分,从而抑制眼球的变形,能够在巩膜变薄及伴随眼疾病的治疗中加以利用。

[0070] 于后述实施例中,近视诱导小鼠中,近视诱导结束后PERK通路及ATF6通路亢进,发生作为巩膜变薄的原因的眼轴伸长。即,确认到近视诱导所致的病理性眼轴伸长与巩膜变薄在与儿童的近视进展后的成年期相当的期间仍会持续,暗示了这为巩膜变薄及伴随眼疾病的发病机制。因此,考虑以PERK通路及ATF6通路的同时亢进来对巩膜的变薄进行评价,筛选出可抑制它们的成分,从而抑制眼球的变形,能够在巩膜变薄及伴随眼疾的治疗中加以利用。

[0071] 作为巩膜变薄伴随眼疾病,可举出近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管、近视性视神经病变、近视性视网膜病变、视网膜脉络膜萎缩、黄斑出血、近视性牵引性黄斑病变、近视性黄斑病变、近视性黄斑变性、近视性黄斑分离症、近视性屈光暗点、近视性弧形斑、近视性中心窝分离症(myopic foveoschisis)、弥漫性萎缩病变、局灶性萎缩病变、漆裂纹(Lacquer cracks)、后葡萄肿、视网膜脱离、黄斑裂孔、视盘倾斜综合征、

近视性散光、固定性内斜视、机械外展限制、内斜视、重度近视性斜视等眼疾病。

[0072] 这些巩膜变薄伴随眼疾病之中,从与巩膜变薄(眼球变形)有强烈因果关系的观点考虑,优选眼后节疾病。此外,从有明确且直接的因果关系的观点考虑,优选针对近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管或近视性视神经病变应用本发明。

[0073] (剂型)

[0074] 本发明的组合物可作为滴眼剂使用。于本发明中,巩膜变薄治疗用滴眼剂的剂型没有限定,可举出例如水性滴眼剂、用时溶解滴眼剂、悬浮性滴眼剂、油性滴眼剂、眼软膏剂等。上述之中,从显著发挥本发明效果的观点考虑,优选为水性滴眼剂。

[0075] 滴眼剂中,除了上述成分之外,可配合其他的有效成分(药理活性成分、生理活性成分等)。这样的成分的种类没有特别限制,可举出例如减充血成分、眼肌调节药成分、抗炎药成分、收敛药成分、抗组胺药成分、抗过敏药成分、维生素类、氨基酸类、抗菌药成分、糖类、高分子化合物或其衍生物、纤维素或其衍生物、局部麻醉药成分等。

[0076] 在滴眼剂中,在不损害本发明效果的范围内,可进一步根据其用途或形态按照常用方法适当地选择各种成分或添加物,使其含有一种或并用含有两种以上。作为这些成分或添加物,可举出例如液体制剂等的制备中通常使用的载体、香料或清凉剂、防腐剂、杀菌剂或抗菌剂、pH调节剂、螯合剂、稳定剂、等渗剂、缓冲剂、增稠剂等各种添加剂。以下例示出滴眼剂中使用的代表性成分,但不限于于此。

[0077] 作为载体,可举出例如水、含水乙醇等水性溶剂。需要说明的是,当各种成分难溶于水性溶剂时,也可使用增溶剂。作为增溶剂,可举出例如聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚维酮、聚山梨酯80等。

[0078] 作为香料或清凉剂,可举出例如萜烯类(具体而言,茴香脑、丁香酚、樟脑、香叶醇、桉叶油醇、冰片、薄荷醇、柠檬烯、龙脑等。它们可为d体、l体或dl体中的任意)、精油(茴香油、清凉薄荷油、肉桂油、留兰香油、薄荷水、薄荷油、胡椒薄荷油(peppermint oil)、佛手柑油、尤加利油、玫瑰油等)等。

[0079] 作为防腐剂、杀菌剂或抗菌剂,可举出例如泊利氯铵、盐酸烷基二氨基乙基甘氨酸、苯甲酸钠、乙醇、苯扎氯铵、苄索氯铵、葡萄糖酸氯己啶、氯丁醇、山梨酸、山梨酸钾、脱水乙酸钠、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、硫酸羟基喹啉、苯乙醇、苄醇、双胍化合物(具体而言,聚六亚甲基双胍或其盐酸盐等)、Glokil1(RHODIA公司制的商品名)等。

[0080] 作为pH调节剂,可举出例如盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化镁、三乙醇胺、单乙醇胺、二异丙醇胺、硫酸、磷酸等。

[0081] 作为螯合剂,可举出例如抗坏血酸、依地酸四钠、依地酸钠、柠檬酸等。

[0082] 作为稳定剂,可举出例如依地酸钠水合物、聚维酮、聚山梨酯80、二丁基羟基甲苯、氨丁三醇、甲醛次硫酸氢钠(吊白块)、生育酚、焦亚硫酸钠、单乙醇胺、单硬脂酸铝、单硬脂酸甘油酯等。

[0083] 作为等渗剂,可举出例如氯化钾、氯化钠、浓甘油、葡萄糖、D-甘露醇等。

[0084] 作为缓冲剂,可举出例如柠檬酸钠水合物、乙酸钠水合物、碳酸氢钠、氨丁三醇、硼酸、硼砂、磷酸氢钠水合物、磷酸二氢钠等。

[0085] 作为增稠剂,可举出例如羧基乙烯基聚合物、聚维酮、聚乙烯醇(部分皂化物)、羟

乙基纤维素、羟丙甲纤维素、甲基纤维素、甘油等。

[0086] 在本发明的滴眼剂中,可在期待发挥本发明的效果或不阻碍本发明的效果的范围内配合添加剂。其含量没有特别限定,相对于滴眼剂总量,优选为0.001~1质量%左右。

[0087] 滴眼剂的pH只要调成3~10即可,从使用感的观点考虑,优选为4~9,从使用感的观点考虑,更优选为5~8.5。

[0088] 作为收容本发明的滴眼剂的容器,可没有限制地使用已知的滴眼容器。作为滴眼容器,通常可使用可对眼睛滴入滴眼剂的形状,例如具备滴嘴且于滴嘴的前端具备容器口的形状的容器。另外,作为滴眼容器,可以是在容器上安装有与其分开成型的滴嘴的结构滴眼容器、及滴嘴部(液体流出部)与容器主体一体成型的结构的滴眼容器(例如一次性的滴眼容器等)中的任一种。

[0089] 滴眼容器通常只要采用塑料容器即可。关于塑料容器的构成材料,没有特别限制,可举出例如聚对苯二甲酸乙二酯、聚芳酯、聚萘二甲酸乙二酯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚酰亚胺中的任1种、它们的共聚物或它们的2种以上的混合物。尤其是从在适度的挤出等下容易发挥本发明的效果的观点考虑,优选聚对苯二甲酸乙二酯、聚芳酯、聚萘二甲酸乙二酯或它们的共聚物、或它们的2种以上的混合物。

[0090] 滴眼剂可填充于以这样的材料为主材料的透明容器(具备不妨碍到观察异物的程度的透明性的容器),也可填充于避光容器。避光例如可通过在透明容器材料中添加着色剂来进行,也可通过用收缩薄膜或外盒等包覆容器来避光。另外,为了在适度的挤出等下容易进一步发挥本发明的效果,容器的容量优选为0.5~50mL左右,更优选为3~20mL左右。

[0091] 另外,关于滴眼容器所具备的滴嘴,对于其结构或构成材料也没有特别限制。关于滴嘴的结构,只要是作为滴眼容器的滴嘴而一般所采用的结构即可。另外,关于滴嘴的构成材料,可举出例如与上述塑料容器的构成材料同样的材料。从使滴眼剂的断液更良好、且抑制滴入量的不均的观点考虑,包含聚乙烯或聚丙烯作为构成材料的滴嘴是适宜的。作为聚乙烯的种类,可举出高密度聚乙烯、低密度聚乙烯等,其中包含低密度聚乙烯作为构成材料的滴嘴是适宜的。

[0092] (滴眼剂的制造方法)

[0093] 本发明的滴眼剂可用本领域技术人员惯用或已知的方法来制备。例如通过下述方式制备即可:使各成分分散于水等载体中后,若有需要则添加增溶剂,根据需要进行加热,使用均质机等使其均匀化、溶解或乳化,并用pH调节剂调节pH。另外,作为制剂的灭菌方法,可选择电子束灭菌、高压釜灭菌、过滤灭菌等方法。

[0094] (使用方法)

[0095] 本发明的滴眼剂的用法及用量根据患者的症状等而变动,通常只要以1日约1~6次,1次约滴眼1~2滴进行滴眼即可。

[0096] 就本发明的滴眼剂而言,虽不予限定,作为巩膜变薄治疗剂而使用含有选自由苯基丁酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种的滴眼剂时,例如能以1日1~2次、1次1~2滴滴入滴眼剂,优选以1日1次、1次1滴进行滴眼。

[0097] 另外,从显著发挥本发明效果的观点考虑,本发明的滴眼剂可在例如午睡前、就寝前等活动不活跃的时间带使用。

[0098] [巩膜变薄治疗剂的筛选方法]

[0099] 在本发明中,巩膜变薄治疗剂的筛选方法包括:使候选物质接触源自眼的细胞的工序;和以前述细胞中的PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化为指标来选择候选物质的工序。虽不予限定,例如可在存在候选物质的条件下或不存在候选物质的条件下接触细胞,测定候选物质所引起的PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化并加以比较来进行候选物质的筛选。

[0100] 作为源自眼的细胞,虽不予限定,从显著发挥本发明的效果的观点考虑,优选为巩膜中的细胞。

[0101] 虽不予限定,源自眼的细胞优选为来源于诱导近视的动物模型的细胞。作为这样的近视诱导模型,可利用已知的动物模型。

[0102] 虽不予限定,作为近视诱导模型,可举出佩戴负透镜来诱导近视的动物模型、通过施予近视诱导剂来诱导近视的动物模型等。

[0103] 作为这样的负透镜,可利用-20~-40屈光度(D)的负透镜,优选为-25~-35屈光度(D)。负透镜的佩戴方法可利用已知方法,虽不予限定,可举出使用固定件将负透镜固定在动物的眼前等。

[0104] 负透镜的佩戴期间可设为例如至少1周,优选2周以上,更优选3周以上。

[0105] 此外,作为近视诱导剂,可利用已知的物质,例如作为近视诱导剂,可使用衣霉素、毒胡萝卜素等。另外,作为近视诱导剂,也可组合使用PERK通路的激活剂、ATF6通路的激活剂。作为PERK通路的激活剂,可举出CCT020312等,作为ATF6通路的激活剂,可举出AA147等,可单剂施予或混合施予这些激活剂,优选混合施予这些激活剂。

[0106] 就这样的近视诱导剂而言,虽不予限定,从作用于巩膜等的眼细胞的观点考虑,例如可制成注射剂或滴眼剂而进行施予,优选制成滴眼剂而进行施予。使用衣霉素作为滴眼剂时,例如可设为10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选为20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选为40~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0107] 使用毒胡萝卜素作为滴眼剂时,例如可设为1~100 $\mu\text{M}$ ,优选为2~60 $\mu\text{M}$ ,更优选为5~30 $\mu\text{M}$ 。

[0108] 使用近视诱导模型时,从制作预设应用于巩膜变薄及伴随眼疾病的动物模型的观点考虑,优选使用近视诱导完成后的动物。虽不予限定,为小鼠的情况下,开始佩戴负透镜的时期优选为断奶时期,更优选为3周龄小鼠。就C57BL6等小鼠而言,从3周龄至6周龄会发生生理性眼轴伸长。因此,通过自3周龄起诱导近视,除了生理性眼轴伸长之外,也可促进过度的眼轴伸长,故而可引发病理性眼轴伸长。

[0109] 另外,候选物质的施用时期优选为例如近视诱导中(3周龄~6周龄等)及/或近视诱导后(6周龄~8周龄等)。从在因巩膜变薄而引起眼后节疾病的、与人类所谓成年期相当的期间进行的观点考虑,候选物质的施用时期优选为例如近视诱导后(6周龄~8周龄等)。虽不予限定,根据于近视诱导后施用候选物质的手法,可评价候选物质对儿童期的近视进展结束后所余留的病理性眼轴伸长及巩膜变薄所造成的影响。

[0110] 虽不予限定,就使候选物质接触源自眼的细胞的步骤而言,优选通过口服、腹腔注射或滴眼而施予该候选物质,更优选通过滴眼而施予。例如对巩膜中的细胞进行评价时,可使滴眼剂含有候选物质而进行施予。

[0111] 在测定候选物质所引起的PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化步骤中,可使用已知的评价方法。虽不予限定,基因的表达、蛋白质的表达或分泌可

通过微阵列、实时PCR法、PCR法、Western印迹法、ELISA法、免疫组织染色等已知方法来测定。

[0112] 例如在测定PERK或ATF6的信号转导系统的基因的变化时,可利用已知的RNA提取方法从培养细胞中提取RNA,并供于对mRNA的表达进行定量分析的步骤。

[0113] 就对mRNA的表达进行定量分析的步骤而言,虽不予限定,优选使用实时PCR法。作为用实时PCR法进行测定的标志物,能以在(PERK通路及ATF6通路的抑制剂)的项目所述的与信号转导有关的因子作为测定项目。

[0114] 作为与PERK通路有关的因子,可举出例如CHOP、ATF4、GADD34等。

[0115] 作为与ATF6通路有关的因子,可举出例如GRP78、GRP94、PDI、Cnex、HYOU、ERdj3等。

[0116] 在测定基于候选物质的巩膜变薄的步骤中,可使用已知的评价方法。虽不予限定,根据巩膜厚度进行评价时,可将巩膜组织利用HE染色等进行染色,并利用显微镜等进行组织观察及分析来测定巩膜厚度。另外,对于在原位(in situ)测量巩膜厚度,可使用光学相干断层扫描仪(OCT),而为了更高精确度地观察巩膜厚度,也可使用谱域(SD)-OCT、扫频源(SS)-OCT。

[0117] 另外,虽不予限定,通过巩膜中的胶原纤维的粗细度或量进行评价时,可利用电子显微镜等对巩膜中的胶原纤维进行组织观察及分析,从而测定纤维面积、纤维截面的直径。

[0118] 当巩膜变薄因候选物质被抑制时,可选定该候选物质作为巩膜变薄治疗剂,作为巩膜变薄治疗剂使用。

[0119] 本发明也可为以下方式。

[0120] 巩膜变薄治疗用滴眼剂,其含有PERK(PKRK-样内质网激酶)通路及/或ATF6(转录激活因子6)通路的抑制剂作为有效成分;

[0121] 含有PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂作为有效成分的滴眼剂用于巩膜变薄治疗中的用途;

[0122] PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂在巩膜变薄治疗用滴眼剂的制造中的用途;

[0123] 巩膜变薄治疗方法,其包括使人摄取有效量的PERK通路及/或ATF6通路的抑制剂;

[0124] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其包括:前述抑制剂至少选择性地抑制ATF6通路;

[0125] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂为PERK通路及ATF6通路这两通路的抑制剂;

[0126] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂为选自由苯基丁酸及其药理学上容许的盐组成的组中的至少1种;

[0127] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂为苯基丁酸钠;

[0128] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂的含量相对于滴眼剂总量而言为0.01~5质量%;

[0129] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂的含量相对于滴眼剂总量而言为0.1~3质量%;

[0130] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述抑制剂的含量相对于滴眼剂总量而言为0.2~2质量%;

[0131] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法,其中,前述巩膜变薄治疗不抑制生理性眼轴

伸长；

[0132] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述巩膜变薄治疗对病理性眼轴伸长进行抑制；

[0133] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述巩膜变薄治疗作为巩膜变薄伴随的眼疾病的治疗用途而使用；

[0134] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述巩膜变薄伴随眼疾病为近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管、近视性视神经病变、近视性视网膜病变、视网膜脉络膜萎缩、黄斑出血、近视性牵引性黄斑病变、近视性黄斑病变、近视性黄斑变性、近视性黄斑分离症、近视性屈光暗点、近视性弧形斑、近视性中心窝分离症、弥漫性萎缩病变、局灶性萎缩病变、漆裂纹(Lacquer cracks)、后葡萄肿、视网膜脱离、黄斑裂孔、视盘倾斜综合征、近视性散光、固定性内斜视、机械外展限制、内斜视或重度近视性斜视；

[0135] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述巩膜变薄伴随眼疾病为近视性黄斑变性、近视性脉络膜萎缩、近视性脉络膜新生血管或近视性视神经病变；

[0136] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述滴眼剂为水性滴眼剂；

[0137] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述滴眼剂以1日1~2次滴眼而使用；

[0138] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述滴眼剂以1日1~2次滴眼而使用；

[0139] 如上述所记载的滴眼剂、用途或方法，其中，前述滴眼剂在午睡前或就寝前使用；

[0140] 巩膜变薄治疗剂的筛选方法，其包括：使候选物质接触源自眼的细胞的工序；和以前述细胞中的、PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的变化为指标来选择候选物质的工序。

[0141] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述源自眼的细胞为来源于诱导近视的动物模型的细胞；

[0142] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述动物模型是佩戴负透镜而诱导近视的动物模型、或通过施予近视诱导剂而诱导近视的动物模型；

[0143] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述负透镜为-20~-40屈光度(D)的透镜；

[0144] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述负透镜的佩戴期间为至少1周；

[0145] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述近视诱导剂包含衣霉素及/或毒胡萝卜素；

[0146] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述衣霉素的滴眼施予时的浓度为10~100 $\mu$ g/mL；

[0147] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述毒胡萝卜素的滴眼施予时的浓度为1~100 $\mu$ M；

[0148] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述动物模型在断奶时期开始佩戴负透镜；

[0149] 如上述所记载的筛选方法，其中，前述使候选物质接触源自眼的细胞的工序包括：通过口服、腹腔注射或滴眼而施予前述候选物质；

[0150] 如上述所记载的筛选方法，其包括：当PERK及/或ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的表达因候选物质被抑制时，选择该候选物质作为巩膜变薄治疗剂；

[0151] 如上述所记载的筛选方法，其包括：当PERK及ATF6的信号转导系统的蛋白质及/或基因的表达因候选物质被抑制时，选择该候选物质作为巩膜变薄治疗剂；

[0152] 如上述所记载的筛选方法，其包括：当巩膜中的胶原蛋白相关蛋白质及/或基因的

表达因候选物质而正常化时,选择该候选物质作为巩膜变薄治疗剂;

[0153] 如上述所记载的筛选方法,其中,前述胶原蛋白相关蛋白质及/或基因为选自由COL1A1、COL4A3、COL8A2、COL11A2及COL15A1组成的组中的至少1种。

[0154] 实施例

[0155] 以下举出实验结果具体地说明本发明。

[0156] [实验方法]

[0157] 本实验中的所有动物实验得到庆应义塾大学动物实验委员会的批准,遵守庆应义塾大学动物实验相关的设施指南、眼科·视觉研究中动物的使用相关的ARVO声明、动物研究:研究中动物的使用相关的体内(in vivo)实验的报告 (ARRIVE) 指南。

[0158] (近视诱导小鼠的特征)

[0159] 如非专利文献3所记载,人眼在刚出生时为远视,其后眼轴会伸长(即近视化),在学童期(8岁左右)正视化。另外,小鼠(C57BL6)的3至6周龄的期间,眼轴也会随着成长而伸长,该近视诱导期间的3~6周龄,在近视进展的动态这一点与人类儿童相当,近视诱导期间结束后实质与成年期相当。通过采用该动物模型,可阐明人类成人近视进展(巩膜变薄)的机制,并筛选出巩膜变薄治疗剂或其伴随眼疾病的治疗剂。

[0160] 图1(a)示意性地示出佩戴负透镜而诱导轴性近视的机理。正视是指,进入眼睛的平行光线成像于网膜上,因此可清楚地看到影像的状态。另一方面,轴性近视则指因眼轴长度变长,进入眼的平行光线成像于网膜前方而无法看清的状态。包括人类在内,动物的眼会随着成长而变大。使幼鼠佩戴负透镜,则眼轴会伸长至佩戴负透镜时成像的位置、即佩戴负透镜时可看清的状态。其结果,眼轴伸长,可形成与轴性近视同样的眼的状态。

[0161] (近视诱导小鼠的制作)

[0162] 具体而言,如下制作近视诱导小鼠。需要说明的是,近视诱导、眼轴长度及屈光的测量以与非专利文献6、7同样的方法进行。首先,将雄性C57BL6J小鼠在12小时的明暗循环下,于温度控制洁净室中收容于标准透明笼中。使动物自由摄取标准饲料与经高压蒸气灭菌的自来水。将刚断奶的3周龄小鼠以Domitor(日本全药工业株式会社)、Vetorphale(Meiji Seika Pharma株式会社)、咪达唑仑(SANDOZ株式会社)这3种混合麻醉进行麻醉,用剪刀使头盖露出。如图1(b)所示,于头盖设立支柱,以牙科用黏固剂(Super-Bond, Sun Medical株式会社)予以固定。支柱以可用螺帽固定后述调节器具的方式设有螺纹牙。

[0163] 为了诱导近视,在右眼(近视诱导眼)佩戴-30屈光度(diopter, D)的负透镜(Rainbow Contact, RAINBOW OPTICAL LABORATORY株式会社),作为对照,在左眼(对照眼)佩戴0D的透镜或仅镜框佩戴。将透镜佩戴于小鼠时,为了防止小鼠通过前肢等造成损伤,在透镜下部的镜框部粘接朝侧向突出的形状的护具。由于护具,小鼠不会触碰到透镜,不会损伤透镜。就护具而言,在此处使用粘接于镜框部而成为一体的护具,但只要透镜不被小鼠的行为损伤即可,无需与透镜成为一体。例如,也可为如遭受外伤动物所佩戴的伊丽莎白圈那样的形状的护具。

[0164] 在透镜上方的镜框部,配合小鼠的成长而粘接有用于对佩戴的透镜的幅度或角度进行调节的调节器具。调节器具弯成“<”字形,一侧粘接有透镜,另一侧则以可佩戴于设立在头部的支柱的方式设有长孔。使长孔通过支柱,以螺帽进行螺旋固定,由此可在不压迫小鼠双眼的周缘的情况下使其密合于皮肤而固定。通过由支柱、螺帽、调节器具这3件形成的

调节机构,可配合小鼠的成长调节幅度、角度,调节成透镜对准小鼠眼睛的位置。另外,由于可取下透镜,因此可测量眼轴长度、屈光值的经时变化。

[0165] (眼轴伸长与屈光的测量)

[0166] 对照眼仅佩戴镜框,近视诱导眼则佩戴-30D透镜3周,测定屈光值、眼轴长度,求出佩戴前后的差。屈光值利用屈光计(Infrared photorefractor for mice,Tubingen大学Schaeffel教授制作)来测量,眼轴长度利用SD-OCT(Spectral-domain OCT,Envisu R4310、bioptigen Inc.)来测量。

[0167] (巩膜试样的制备)

[0168] 实验干预及测定眼参数后,自C57BL6J小鼠摘出眼球。为了进行透射型电子显微镜观察,而将小鼠的眼球在经冰冷却的2.5%戊二醛的PBS中固定1小时,沿着矢状面切断。摘出角膜与晶状体,将剩余组织进一步以2.5%戊二醛/60mM HEPES缓冲液(pH7.4)固定一夜。将标本用60mM HEPES缓冲液进行清洗,以1%四氧化锇/60mM HEPES缓冲液于4℃培养2小时,通过乙醇系列进行脱水并更换,包埋于Epon 812(EM Japan,东京,日本)中。包埋后,将块体切薄成70nm,用乙酸铀酰与柠檬酸铅进行染色。用JEM-1400Plus(JEOL Ltd.,东京,日本)可视化。

[0169] 为制备冻结切片(小鼠),用OCT化合物(Sakura Finetek,东京,日本)冷冻眼球。使用低温恒温器(CM3050S;Leica Biosystems、韦茨拉尔,Gelmass)将冷冻块体以5μm的厚度切断。切片保存于-80℃直至使用。

[0170] 制作石蜡切片(小鼠)时,以4%多聚甲醛将眼球固定一夜,包埋于石蜡中,利用Microtome(REM-710,Yamato Kohki,埼玉,日本)薄切成3μm切片。接着,将切片用苏木精与伊红进行染色,使用BX53显微镜(Olympus,东京,日本)可视化。巩膜厚度使用cellSens软件(Olympus)来测定。

[0171] (受试药的制备)

[0172] 苯基丁酸钠(Cayman Chemical,MI,USA)及牛磺熊去氧胆酸(Sigma-Aldrich,东京,日本)溶解于PBS。IRE1抑制剂STF080310(Selleck Biotech,东京,日本)或4μ8C(Selleck Biotech)、PERK抑制剂GSK2656157(Selleck Biotech)或GSK2606414(Selleck Biotech)、ATF6抑制剂甲磺酸奈非那韦水合物(东京化学工业,东京,日本)或Ceapin-A7(Sigma-Aldrich)用DMSO溶解,利用PBS以1:1000进行稀释而用于滴眼试验。

[0173] (UPR抑制剂的近视诱导中的滴眼)

[0174] 在近视诱导中将60μM的STF080312(STF)、100μM的4μ8C(4μ8C)、100μM的GSK2656157(GSK)、100μM的GSK2606414(GSK2606414)、100μM的甲磺酸奈非那韦水合物(NFV)、100μM的Ceapin-A7(Ceapin)在10日期间每日以1日1次在傍晚滴眼至两眼。

[0175] (腹腔注射)

[0176] 在整个近视诱导期间,每日腹腔注射(i.p.)苯基丁酸钠PBS溶液(4-PBA;200mg/kg体重)或牛磺熊去氧胆酸(TUDCA;100mg/kg体重)。

[0177] (苯基丁酸钠的近视诱导期间结束后的滴眼)

[0178] 在近视诱导小鼠中相当于人类成年期的近视诱导期间结束后,将2%的苯基丁酸钠的PBS溶液(4-PBA)在10日期间以每日、1日1次于傍晚滴眼至两眼。此外,图11示意性地示出近视诱导期间(LIM)与该期间结束后的施予计划。

[0179] (通过Western印迹法的浓度测定分析)

[0180] 巩膜的蛋白质(10 $\mu$ g/孔)利用SDS-PAGE进行分离,并转移至PVDF膜(美国MA州, Merck Millipore),用Blocking One(东京,Nacalai Tesque)进行封闭,与抗ATF6 (BioAcademia株式会社)、磷酸化-IRE1 (Ser724, Abcam, Cambridge, UL)、IRE1、磷酸化-eIF2  $\alpha$ 、eIF2 $\alpha$ 及 $\beta$ -肌动蛋白(Cell Signaling Technologies Japan, 东京, 日本)抗体一同于4 $^{\circ}$ C孵育一夜。将膜与适宜的HR偶联二抗进行孵育,使用EzWestLumi plus (ATTA, 东京日本)进行可视化。SDS-PAGE在10%丙烯酰胺凝胶上使用蛋白分子量标记物(MagicMark XP Western Protein Standard, ThermoFisher Scientific)来进行。使用ImageJ软件来进行浓度测定分析。

[0181] (定量PCR)

[0182] 定量real-time PCR使用StepOnePlus实时PCR系统,用PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) 来进行。表达水平利用 $\beta$ -肌动蛋白进行标准化。

[0183] (统计分析)

[0184] 实验中所得数据均以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。组间差通过学生t检验或单因子方差分析或广义估计方程式进行分析。当ANOVA显示显著性差异时,接着进行Tukey HSD,来判定各平均值间差异的显著性。 $p$ 值小于0.05时,表示有统计学上的显著性差异。

[0185] [实验结果]

[0186] <试验例1近视诱导小鼠的近视诱导后的巩膜的变薄>

[0187] 重度近视中,据说维持着眼球形状的巩膜的变薄是眼球变形的初期症状(参见非专利文献4)。因此,为了确认近视诱导小鼠的巩膜也发生变薄,实施近视诱导后的巩膜的组织学评价。

[0188] 按照上述试验方法,对近视诱导小鼠中诱导近视后的眼轴伸长与屈光变化进行评价(图2)。另外,摘出诱导近视后的眼球,进行苏木精与伊红染色并观察巩膜厚度(图3a、b)。另外,将染色组织中距神经盘(disk)的距离与巩膜厚度绘成图表(图3c)。

[0189] 其结果,相对于对照眼,近视诱导眼几乎巩膜全周显著变薄(图3c)。由这些结果确认到,眼轴因近视而病理性伸长时,巩膜会变薄,呈现可能成为各种眼后节疾病的原因的眼球变形的初期症状。

[0190] <试验例2近视诱导小鼠的基于UPR基因的抑制的眼轴伸长>

[0191] 重度近视中,据说UPR基因通路表达亢进是病理性眼轴伸长及巩膜变薄的原因(专利文献1)。因此,于该试验例2中,对发生巩膜变薄的近视诱导小鼠的巩膜,评价眼轴伸长这样的表型会如何受到UPR基因的已知抑制剂的影响。需要说明的是,作为PERK抑制剂,使用GSK2656157 (GSK)、GSK2606414,作为ATF6抑制剂,使用甲磺酸奈非那韦水合物(NFV)、Ceapin-A7,作为IRE1抑制剂,使用STF080312 (STF)、4 $\mu$ 8C(图4)。

[0192] 按照前述试验方法,近视诱导小鼠中,利用各种基因抑制剂对眼轴伸长进行评价(图4)。

[0193] 图5a、b示出在小鼠的近视诱导期间将60 $\mu$ M的STF、100 $\mu$ M的GSK、100 $\mu$ M的NFV在10日期间以每日1次滴眼后的眼轴伸长(a)及屈光变化(b)。另外,图5-c、d示出同样地滴眼这些抑制剂的组合(STF+GSK:S+G、GSK+NFV:G+N、NFV+STF:N+S、STF+GSK+NTF:S+G+N)后的眼轴伸长(c)及屈光变化(d)。另外,图6示出分别同样地滴眼100 $\mu$ M的GSK2606414、Ceapin-A7、4 $\mu$ 8C

后的眼轴伸长(a)及屈光变化(b)。

[0194] 其结果,近视诱导小鼠的巩膜中,通过单独滴眼作为UPR基因的PERK、ATF6、IRE1各自的抑制剂,与预期相反,并未观察到眼轴伸长的抑制或屈光的近视化的抑制(图5a、b)。反而通过单独滴眼除STF外的抑制剂,未经近视诱导的对照眼的眼轴与DMSO滴眼相比显著伸长且屈光呈近视化。另外,组合这些进行滴眼时,仅至少PERK抑制剂与ATF6抑制剂这2种存在时(G+N、S+G+N)眼轴长度显著被抑制,屈光的近视化被抑制,且未观察到在单独滴眼时观察到的对照眼的眼轴伸长(图5c、d)。此外,单独滴眼与图5不同的抑制剂GSK2606414、Ceapin-A7、4 $\mu$ 8C所引起的眼轴长度及屈光的变化与图5的结果完全相同,眼轴伸长或屈光近视化均没有被抑制,单独滴眼除4 $\mu$ 8C以外的抑制剂时就连对照眼的眼轴也伸长(图6)。

[0195] 由这些结果确认到,抑制UPR基因之中至少PERK与ATF6这两者时,可抑制眼轴伸长,抑制屈光的近视化。若为PERK单独、ATF6单独、PERK与IRE1、ATF6与IRE1的抑制时,确认到会造成病理性眼轴伸长。认为PERK通路与ATF6通路的抑制对眼轴伸长抑制是重要的,但仅抑制单方时,另一方会代偿性地亢进,整体上无法抑制眼轴伸长,因此认为抑制PERK通路与ATF6通路这两者对抑制巩膜变薄是必需的。甚而,新发现了为了探索巩膜变薄治疗剂,需要探索可抑制至少PERK通路与ATF6通路这两者的成分。此外,由于即使使用不同的抑制剂也会出现同样的结果,因此,同时抑制PERK通路与ATF6通路对抑制巩膜变薄是有效的,可以说这是通用的机制,并不限定于特定的抑制剂。

[0196] <试验例3近视诱导小鼠的巩膜中的4-PBA的UPR基因表达抑制效果>

[0197] 试验例2中已确认到要探索巩膜变薄治疗剂,则需要探索可抑制至少PERK通路与ATF6通路这两者的成分,因此在该试验例3中,针对已知可抑制眼轴伸长的成分(苯基丁酸钠{4-PBA}、牛磺熊去氧胆酸{TUDCA})评价UPR基因的抑制分布。

[0198] 图7示出将4-PBA在整个小鼠近视诱导期间每日进行腹腔注射后的基因表达变化。图8示出同样地由施予4-PBA所引起的近视诱导第1周与第3周的眼轴伸长(a)与屈光变化(b)。另外,图9示出同样地由TUDCA施予所引起的近视诱导第1周与第3周的眼轴伸长(b)与屈光变化(a)。

[0199] 其结果,近视诱导小鼠中,位于已亢进的PERK通路与ATF6通路的下游(图4)的基因表达因滴眼2%4-PBA而显著被抑制(图7)。另外,滴眼2%4-PBA第1周与第3周的眼轴伸长同等程度地显著被抑制,屈光的近视化也同等程度地显著被抑制。另外与此同时,未经近视诱导的对照眼的眼轴伸长(生理性眼轴伸长)则没有抑制,仅抑制了近视诱导眼的病理性眼轴伸长(图8)。另外同样地,施予已知为UPR基因抑制剂的TUDCA时,也与4-PBA同样地没有抑制生理性眼轴伸长,仅抑制了病理性眼轴伸长(图9)。

[0200] 由这些结果确认到,4-PBA、TUDCA在UPR基因通路中,通过抑制作为巩膜变薄的机制的PERK通路与ATF6通路,从而仅抑制病理性眼轴伸长。即,暗示了如4-PBA、TUDCA、PERK抑制剂与ATF6抑制剂的组合这样至少抑制PERK与ATF6这两者的成分可治疗巩膜变薄及伴随眼后节疾病。

[0201] <试验例4近视诱导小鼠的巩膜中4-PBA的胶原纤维狭窄化抑制效果>

[0202] 巩膜是以胶原蛋白为主的组织,据说巩膜变薄与胶原纤维的狭窄化有关(参见非专利文献5)。因此,于该试验例4中,将PBS在整个小鼠近视诱导期间每日进行腹腔注射,结果近视诱导眼的巩膜中观察到胶原纤维的狭窄化,同样地施予了4-PBA,结果该巩膜中的胶

原纤维的狭窄化被抑制而恢复至原本的粗细度(图10a)。并且,计算这些胶原纤维的粗细度差异的截面积,结果截面积为 $8000\mu\text{m}^2$ 以下的细胶原纤维的总面积因近视化而增加(PBS的-30D,细纤维较多),通过滴眼2%4-PBA,其面积分布也恢复如初(图10b)。

[0203] 由这些结果确认到,眼轴因近视而病理性伸长会使巩膜变薄。而且确认到施予4-PBA具有消除该巩膜变薄的效果。

[0204] <试验例5近视诱导小鼠的巩膜中近视诱导后的4-PBA的病理性眼轴伸长抑制效果>

[0205] 与专利文献1中的模拟儿童近视进展的小鼠模型中的近视诱导期间(3周龄~6周龄)的滴眼不同,对滴眼4-PBA能否抑制近视诱导期间结束后(6周龄~8周龄)(即与因巩膜变薄而引起眼后节疾病的人类的所谓成年期相当的期间)(图11)的眼轴伸长进行评价。

[0206] 近视诱导结束后,每日滴眼2%4-PBA,将第1周与第3周的眼轴伸长抑制示于图12a,将屈光变化示于图12b。

[0207] 其结果,近视诱导结束后3周眼轴仍持续伸长,观察到滴眼2%4-PBA抑制所谓成年期的眼轴伸长的倾向(图12a)。另外,屈光也于近视诱导结束后呈近视化,同样地观察到滴眼2%4-PBA可抑制的倾向(图12b)。

[0208] 由这些结果暗示了,在儿童近视进展结束后的成年期仍存在近视进展,2%4-PBA可抑制该过度的眼轴伸长,治疗巩膜变薄及伴随眼后节疾病。

[0209] 由试验例1~5的结果确认到,在近视诱导小鼠模型中引起成为眼球变形的原因的巩膜变薄,并确认到这是由巩膜中胶原纤维的狭窄化而导致的。另外,认为这些机制与UPR基因组有关,为了抑制巩膜变薄,同时抑制UPR基因之中的PERK通路与ATF6通路是重要的。这些结果显示近视诱导小鼠模型是对探索巩膜变薄及伴随眼后节疾病的治疗剂有用的试验体系。

[0210] 另外,确认到引起巩膜变薄的病理性眼轴伸长在与儿童近视进展后的成年期相当的期间仍会持续,认为这是巩膜变薄及其伴随眼后节疾病的机制。确认到4-PBA不仅可抑制儿童期的近视进展,而且可抑制成年期的病理性眼轴伸长,另外不仅如此,确认到还具有使近视诱导所导致的胶原纤维的狭窄化复原的效果。这些结果显示4-PBA可用作巩膜变薄及其伴随眼后节疾病的治疗剂。

[0211] <试验例6 4-PBA的药物动态>

[0212] 确认基于全身施予4-PBA的、眼组织中的药物动态。具体的试验方法如下。

[0213] 腹腔内施予4-PBA(200mg/kg体重)1周。自最后施予起1小时后,摘出眼球,分离各组织。集储取自16只小鼠(32只眼睛)的组织作为一个试样,在液态氮中冷冻保存直至测定。在基于LC-MS/MS的测定前,添加9倍重量的甲醇/水(1:1、v/v)并进行均质化,进行离心分离(10000xg、4℃、5分钟),将上清液用于分析。

[0214] 需要说明的是,作为标准试剂,使用4-苯基丁酸(东京化成工业株式会社)、LC-MS/MS(LC-20AD系统:岛津制作所株式会社,API4000:SCIEX,东京,日本)、HPLC柱、Atlantis dc18(5 $\mu\text{m}$ 、2.1mmID $\times$ 150mm、Waters)。移动相使用甲酸/水(1:10000、v/v)与乙腈,分析中,各移动相的梯度保持在50%。试样注入量设为10 $\mu\text{L}$ ,柱温度设为50℃,流速设为0.2mL/min。

[0215] 另外,作为质谱(MS)条件,采用负模式的电喷雾离子化(ESI),离子通过多重反应监测(MRM)来测定。将结果示于表1。

[0216] [表1]

	试样	施予后的时间	4-PBA 浓度 (mg/g 或 ng/ml)			
			视网膜 (右)	脉络膜	巩膜	血浆
[0217] 4-PBA	1	-	检测界限以下	检测界限以下	检测界限以下	检测界限以下
	2	15 分钟	349	348	203	394
	3	30 分钟	88.2	117	107	186
	4	60 分钟	27.9	76.7	44.9	76.2

[0218] 如表1所示,通过4-PBA的腹腔内施予,不仅在视网膜、脉络膜中,在巩膜中也检测到4-PBA。

[0219] <试验例7-1对主要的胶原蛋白成分的影响体内>

[0220] 对近视诱导小鼠模型滴眼施予4-PBA,确认对作为维持眼球形状的主要胶原蛋白的胶原蛋白1A1 (COL1A1) 等的影响。具体试验方法如下。

[0221] 对经近视诱导的小鼠滴眼PBS (Veh) 或2%4-PBA,用Western印迹法对其巩膜(n=7)中的胶原蛋白1A1进行评价,用定量PCR对胶原蛋白相关mRNA表达进行评价。

[0222] 将结果示于图13。如图13 (A) 及图13 (B) 所示,在近视诱导眼的巩膜中,胶原蛋白1A1 (COL1A1) 蛋白质及mRNA减少。另一方面,发现滴眼施予4-PBA时,可消除由近视所诱导的胶原蛋白1A1蛋白质及mRNA的减少。另外,同样地针对Col4a3、Col8a2、Col11a2及Col15a1的mRNA进行评价,结果这些基因因近视诱导而表达亢进,通过滴眼施予4-PBA可消除该亢进(图13 (C))。这些结果显示,滴眼施予4-PBA通过使由近视所引起的胶原蛋白蛋白质组的表达异常正常化从而抑制巩膜变薄,可作为其伴随眼后节疾病的治疗剂·预防剂。

[0223] <试验例7-2对主要胶原蛋白成分的影响体外>

[0224] 与近视诱导相同,在经可激活UPR通路的衣霉素处理的初代人巩膜成纤维细胞中,施予UPR各通路特异性的抑制剂,在试验例7-1中确认对因近视诱导而表达减少的胶原蛋白1A1 (COL1A1) 等的影响。具体的试验方法如下。

[0225] 使初代人巩膜成纤维细胞 (huScF) (Lifeline Cell Technology, USA) 在FibroLifeS2成纤维细胞培养基 (Lifeline Cell Technology) 中增殖。将该细胞以衣霉素200ng/mL进行6小时处理后,施予DMSO或作为UPR基因抑制剂的STF (IER1抑制剂)、GSK (PERK抑制剂)、NFV (ATF6抑制剂),收集蛋白质,进行Western印迹。

[0226] 将结果示于图13。如图13 (D) 及图13 (E) 所示,通过衣霉素处理,胶原蛋白1A1 (COL1A1) 蛋白质及mRNA减少。另外,Col4a3、Col8a2、Col11a2及Col15a1的mRNA因衣霉素处理而表达亢进。该结果与试验例7-2的近视诱导眼的巩膜组织中的表达分布一致。另外,施予GSK与NFV这两个成分(抑制PERK与ATF6)时,可消除由衣霉素所诱导的胶原蛋白1A1蛋白质的减少,观察到强烈的胶原蛋白表达亢进。该结果在以下所述的试验例8的近视诱导小鼠中,与施予GSK+NFV这两个成分时的显著的巩膜变薄抑制的结果一致,表明同时抑制PERK通路与ATF6通路对通过胶原蛋白分泌正常化来抑制巩膜变薄是极为有效的。

[0227] <试验例8巩膜变薄及其伴随眼后节疾病的治疗中ATF6通路的参与>

[0228] 进一步研究了在巩膜变薄及其伴随眼后节疾病的治疗中,PERK通路与ATF6通路这两通路之中、ATF6通路以何种程度参与。按照上述[实验方法]的记载,用Western印迹法进行浓度测定分析,求出ATF6的激活态(ATF6-N)量及ATF6的前体态(ATF6-P)量。近视诱导小鼠的巩膜中的PERK、ATF6、IRE1各自的抑制剂的单独滴眼方法或基于抑制剂的组合的滴眼

方法等以试验例2的记载为基准。

[0229] 以ATF6的激活态(ATF6-N)的量除以ATF6的前体态(ATF6-P)的量而得的值作为激活的指标,示于图14。

[0230] 如图14所示,ATF6的ATF6-N的量除以ATF6的ATF6-P的量而得的值在若干组中显示显著高的值。显示高值的组,与观察到图5c及图5d中分别示出的病理性眼轴伸长及屈光值的降低的组一致。即,表明未经近视诱导的眼(非LIM眼)呈近视化(眼轴伸长或屈光值低下)时,ATF6必会激活(ATF6-N相对于ATF6-P的增加),而近视诱导眼(LIM眼)中ATF6失活时,则近视化被抑制。其相关性通过对比图5c-d与图14来显示,汇总至下述表2。表2中的“STF”或“S”表示IRE1抑制剂,“GSK”或“G”表示PERK抑制剂,“NFV”或“N”表示ATF6抑制剂,这与前述的试验例同样。表2中汇总的结果表明,在近视眼的巩膜中,ATF6通路的激活成为触发因子而引起与眼轴伸长相伴的巩膜变薄;反之,通过ATF6通路的失活,与眼轴伸长相伴的巩膜变薄被抑制。具有该药效·药理的药剂(4-PBA)对巩膜变薄所伴随的眼后节疾病的治疗是有效的。

[0231] [表2]

抑制剂		变薄(眼轴伸长)	变薄(屈光度降低)	ATF6-N / ATF6-P (ATF6 激活)	
单独	STF	与对照(DMSO)等同	与对照(DMSO)等同	与对照(DMSO)等同	
	GSK	非LIM眼中也眼轴伸长	非LIM眼中也屈光值降低	与对照(DMSO)等同	
	NFV	非LIM眼中也眼轴伸长	非LIM眼中也屈光值降低	非LIM眼中也ATF6激活	
两种成分	S+G	非LIM眼中也眼轴伸长	非LIM眼中也屈光值降低	非LIM眼中也ATF6激活	
	G+N	LIM眼中伸长抑制 <抑制变薄>	LIM眼中降低抑制 <抑制变薄>	LIM眼中上升抑制 <抑制变薄>	
	N+S	非LIM眼中也眼轴伸长	非LIM眼中也屈光值降低	非LIM眼中也ATF6激活	
三种成分	S+G+N	LIM眼中伸长抑制 <抑制变薄>	LIM眼中降低抑制 <抑制变薄>	-	-

[0232] <试验例9施予滴眼剂对近视诱导所致的晶状体肥厚的影响>

[0234] 确认到通过近视诱导(LIM),晶状体有些微变厚的倾向。对是否会因4-PBA的施予形态的不同而对晶状体的变化带来影响进行了研究。按照上述[实验方法]的记载,对近视诱导幼鼠滴眼或腹腔内施予4-PBA,与眼轴长度的测量同样地,使用SD-OCT测量晶状体的厚度。

[0235] 如图15(A)所示,确认到与DMSO滴眼NL(=no lens)组相比,-30D透镜佩戴组中,因近视诱导(LIM)而使晶状体变厚。腹腔内施予4-PBA时,则未对晶状体的肥厚造成影响。另一方面,如图15(B)所示,以滴眼施予4-PBA时,-30D透镜佩戴组中未观察到晶状体的肥厚。即表明作为4-PBA的施予方法,从对目标组织的到达性的观点考虑,滴眼是适宜的。

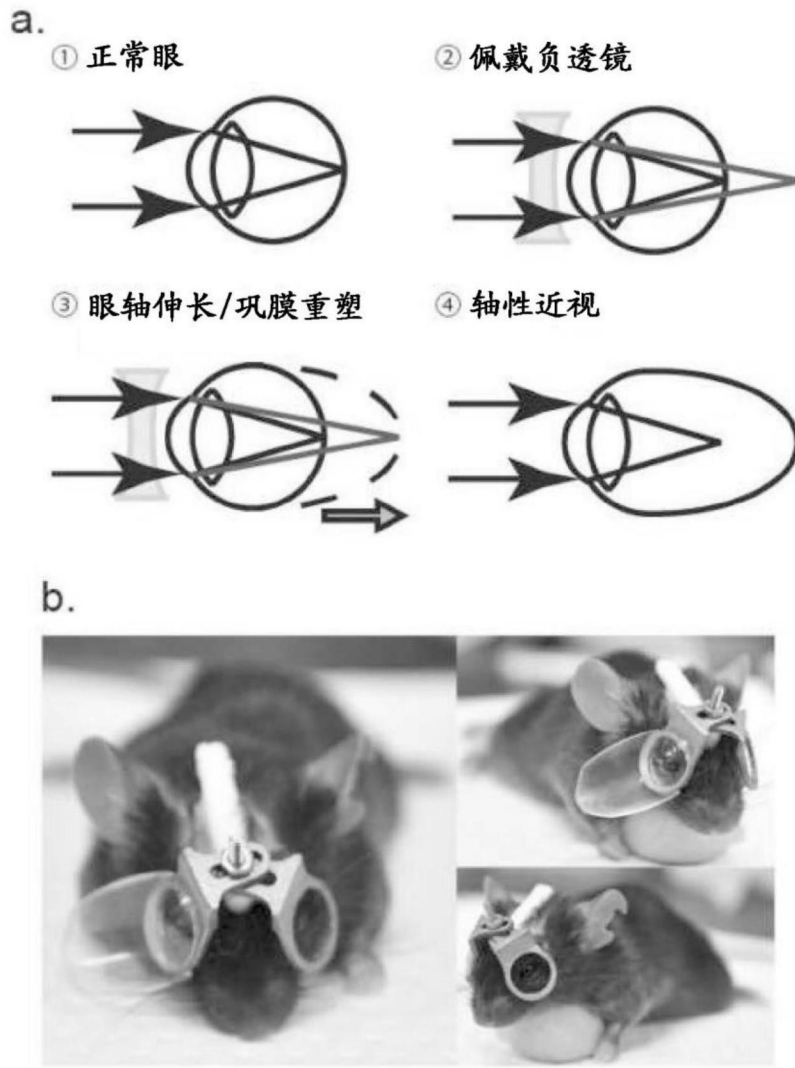


图1

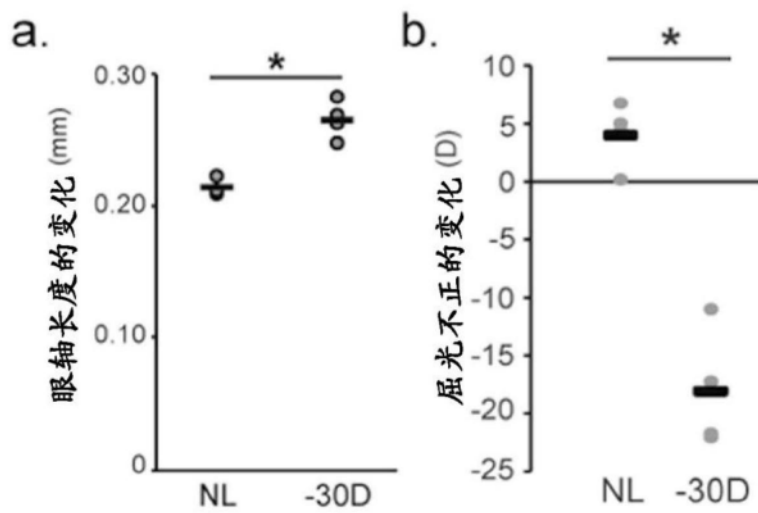


图2

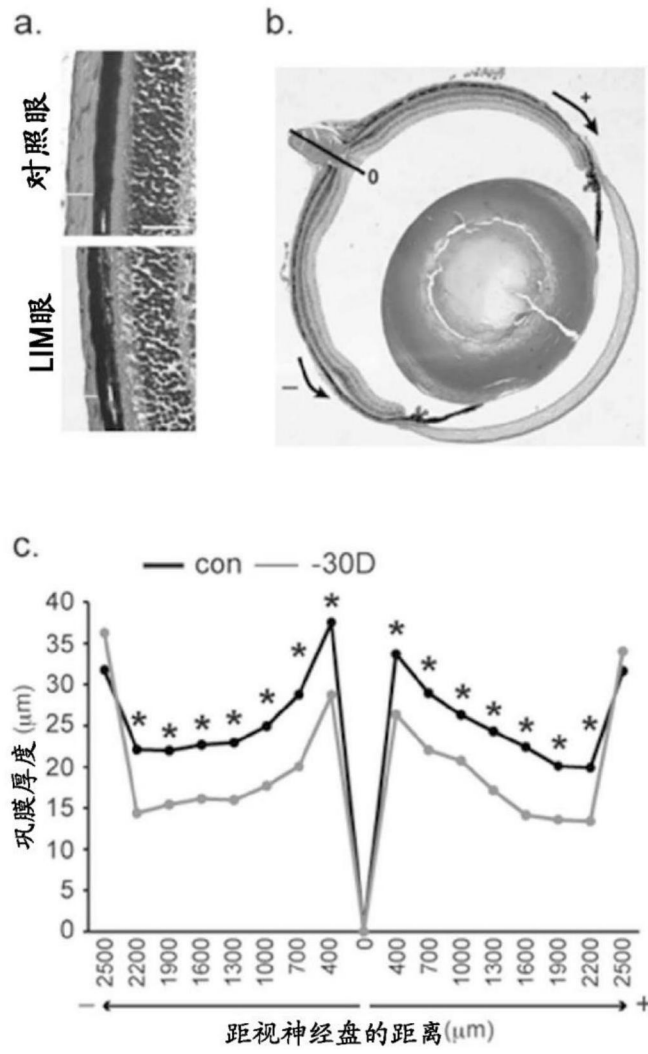


图3

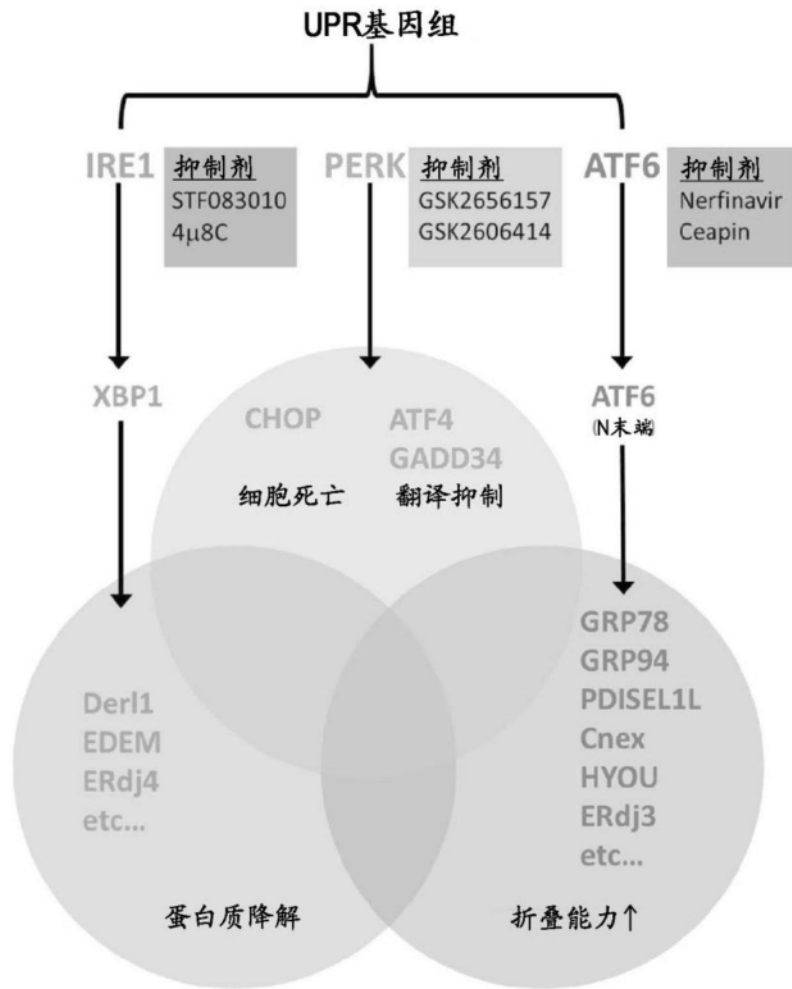


图4

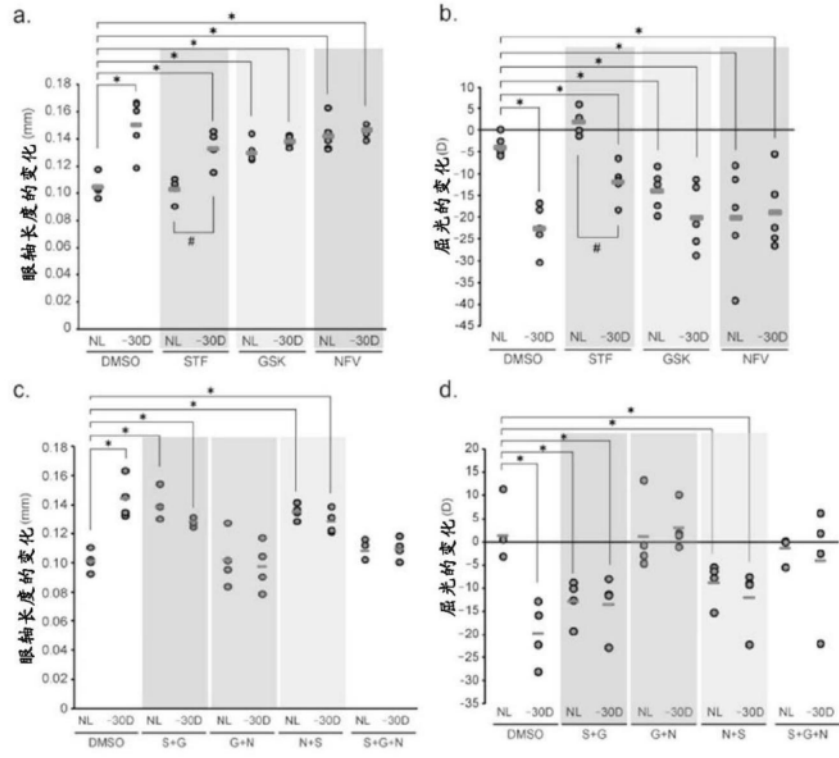


图5

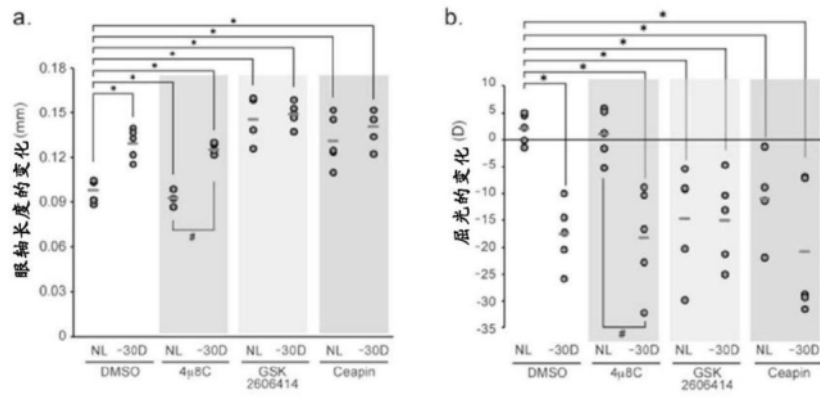


图6

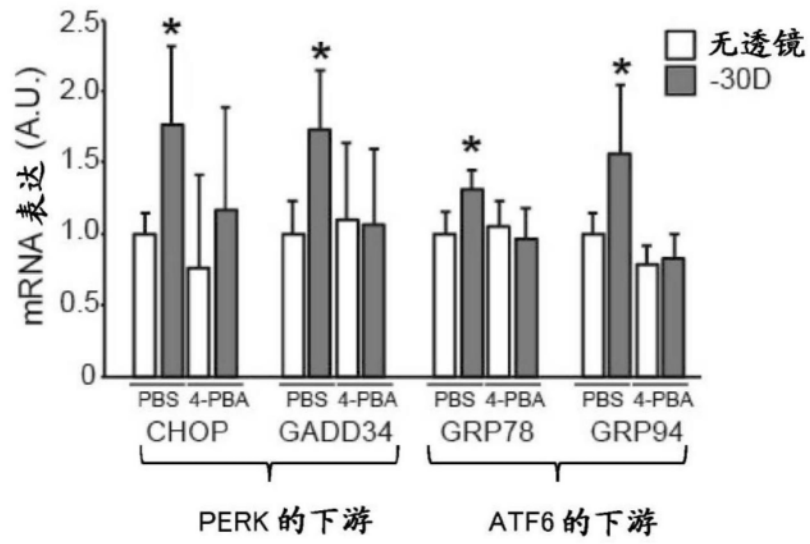


图7

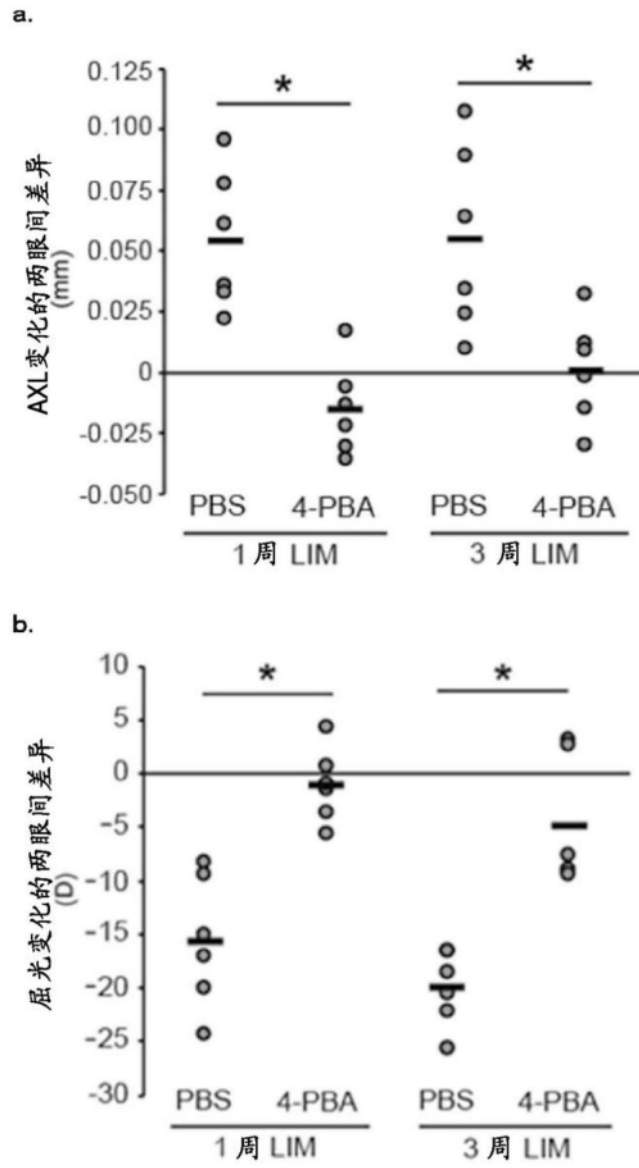


图8

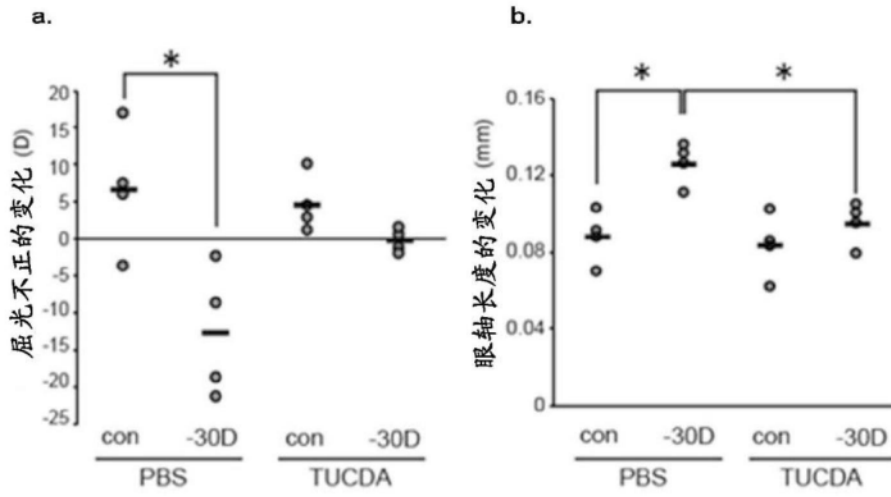


图9

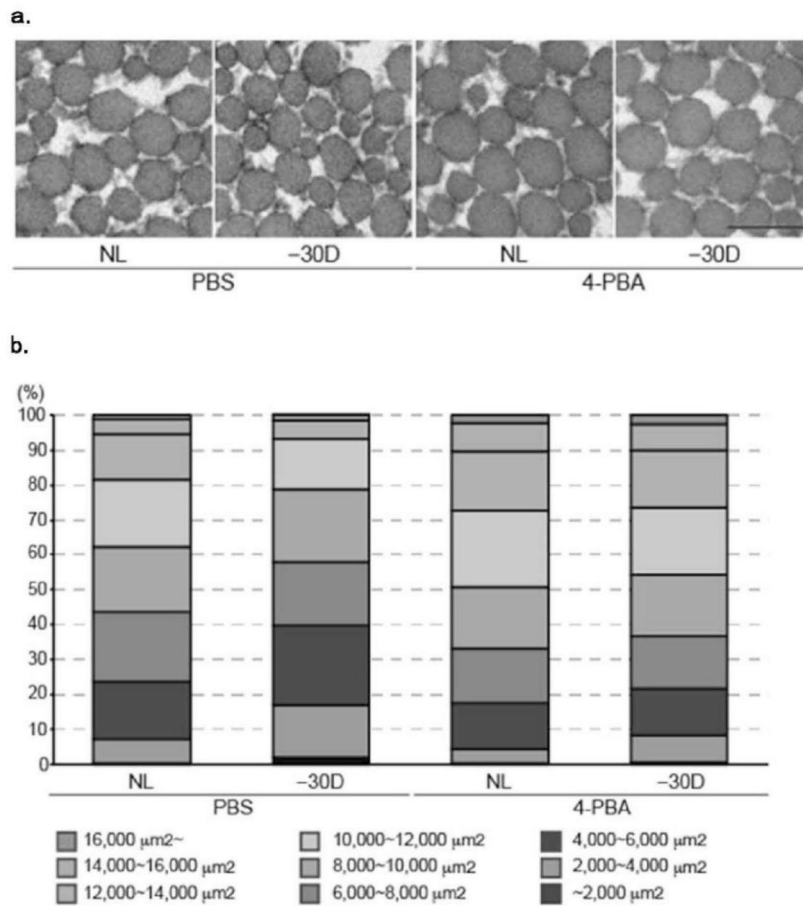


图10

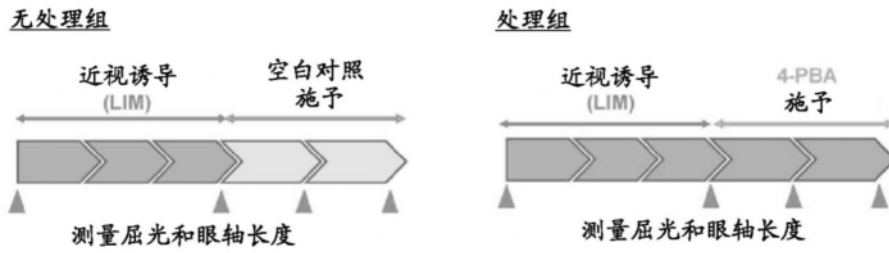


图11

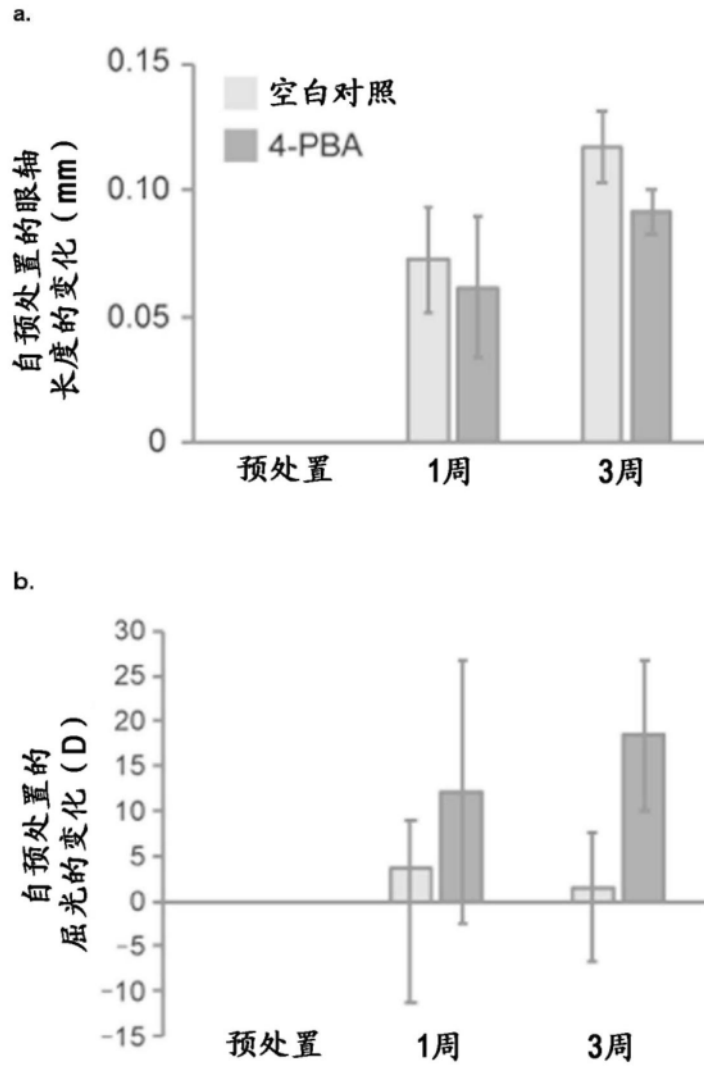


图12

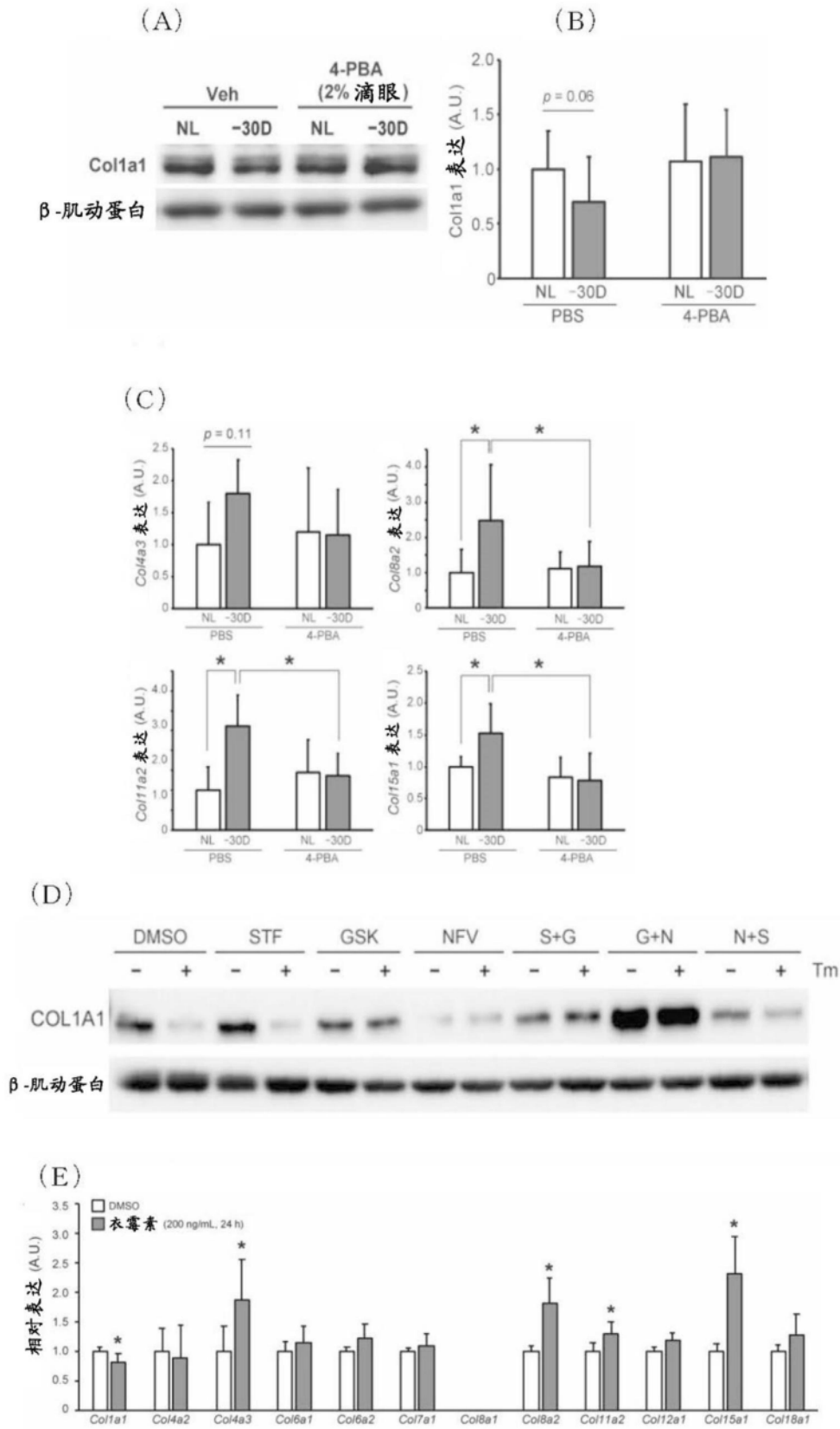


图13

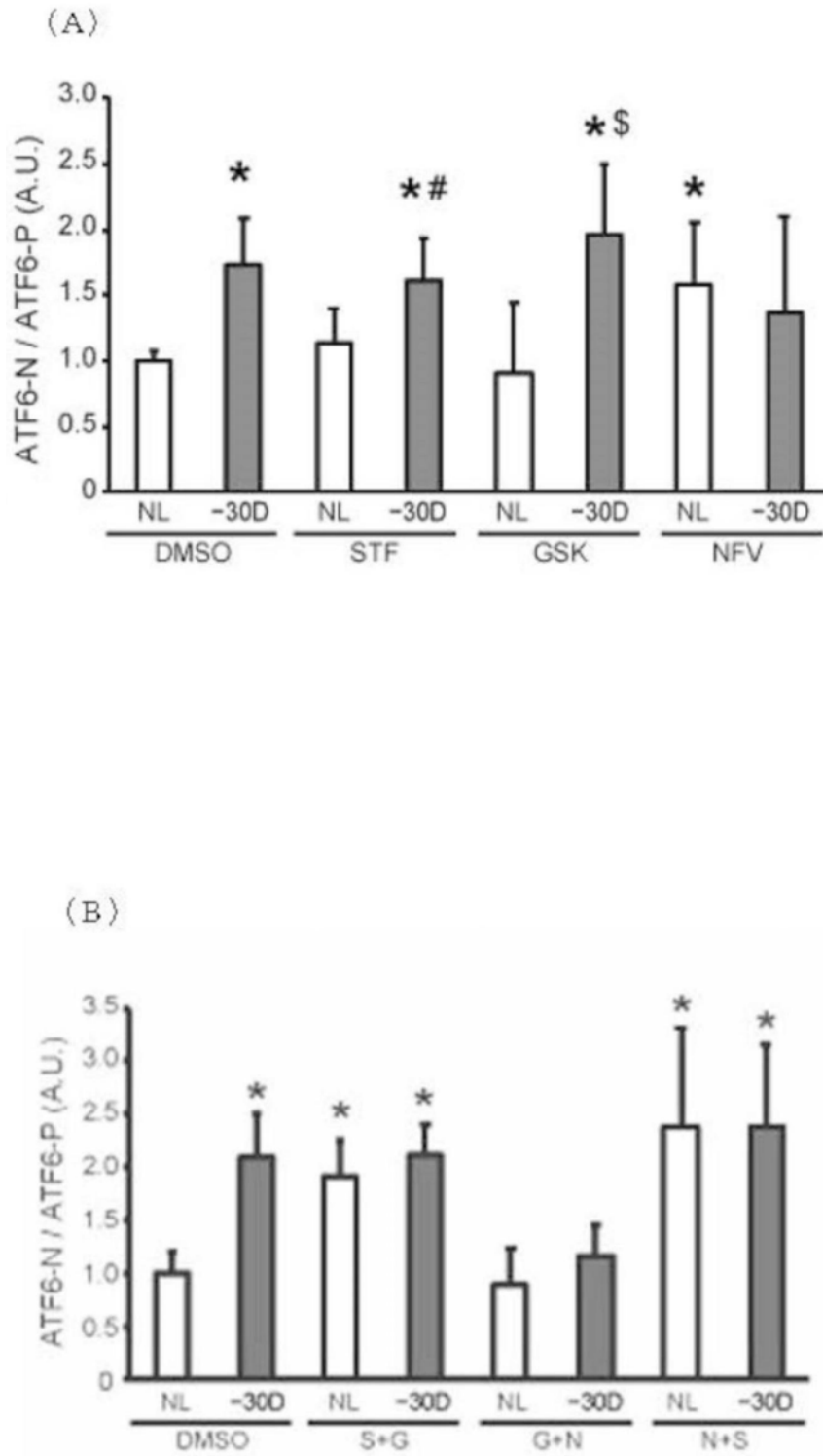


图14

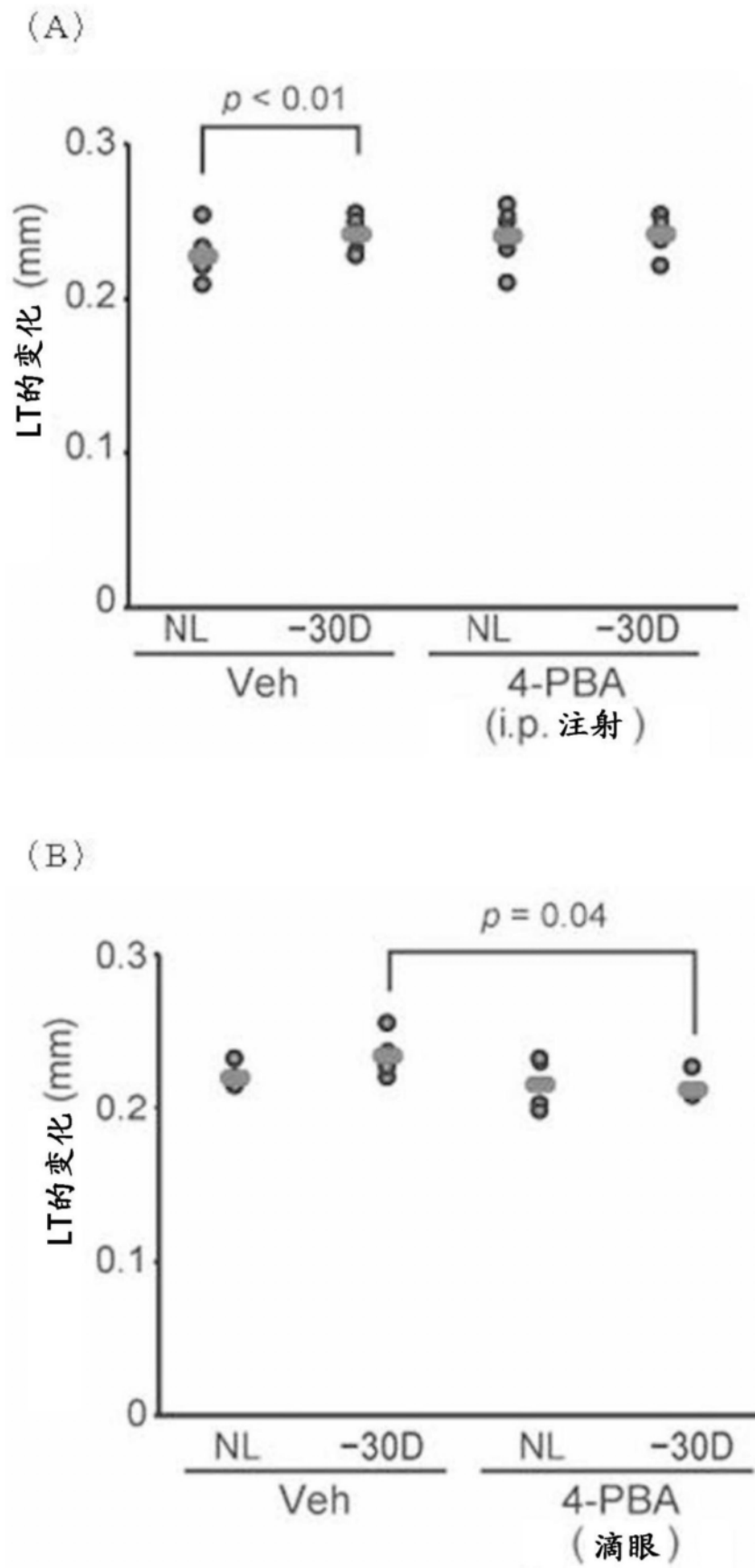


图15