



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0135055
(43) 공개일자 2023년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2023.05)
A61K 9/0048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7022415
(22) 출원일자(국제) 2021년09월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년07월03일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/032068
(87) 국제공개번호 WO 2022/123837
국제공개일자 2022년06월16일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-205490 2020년12월11일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시킴가이사 쓰보타 라보
일본국 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 토신
시나노마치 에키마에 빌딩 304
(72) 발명자
쓰보타 가즈오
일본 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 도신 시
나노마치에키마에빌딩 304 가부시킴가이사 쓰보타
라보 내
구리하라 도시히데
일본 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 도신 시
나노마치에키마에빌딩 304 가부시킴가이사 쓰보타
라보 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

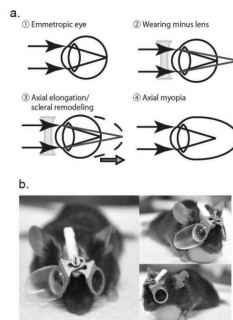
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **강막 비박화 치료용 점안제 및 강막 비박화 치료제의스크리닝 방법**

(57) 요약

[과제] 강막의 비박화를 억제 내지 치료하는 성분을 탐색하는 스크리닝 방법, 및 그 유효 성분을 함유함으로써, 강막의 과도의 비박화 억제를 가능하게 하여, 그 결과, 강막 비박화에 수반하는 후안부 질환을 치료할 수 있는 점안제를 제공한다. [해결수단] PERK 경로 및/또는 ATF6 경로를 동시에 억제할 수 있는 성분을 유효 성분으로서 함유하는 점안제에 의해 상기 과제를 해결한다. 안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정과, 상기 세포에 있어서의, 강막 비박화에의 영향을 지표로 하여 후보 물질을 선택하는 공정을 포함하는, PERK 경로 및/또는 ATF6 경로를 동시에 억제할 수 있는 성분의 스크리닝 방법에 의해 상기 과제를 해결한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

G01N 33/5041 (2013.01)

G01N 33/5047 (2013.01)

(72) 발명자

이케다 신이치

일본 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 도신 시
나노마치에키마에빌딩 304 가부시키가이샤 쓰보타
라보 내

모리 기와코

일본 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 도신 시
나노마치에키마에빌딩 304 가부시키가이샤 쓰보타
라보 내

지양 샤오안

일본 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 34반치 도신 시
나노마치에키마에빌딩 304 가부시키가이샤 쓰보타
라보 내

명세서

청구범위

청구항 1

PERK(PKRK-like endoplasmic reticulum kinase) 경로 및/또는 ATF6(Activating transcription factor 6) 경로의 저해제를 유효 성분으로서 함유하는, 강막(強膜) 비박화(非薄化) 치료용 점안제.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 저해제가, 페닐뷰티르산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인, 점안제.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 저해제가, 페닐뷰티르산 나트륨인, 점안제.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 저해제의 함유량이, 점안제 전량에 대해서, 0.01~5질량%인, 점안제.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 강막 비박화 치료가, 강막 비박화에 의해 야기되는 후안부 질환을 치료하는 것인, 점안제.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 후안부 질환이, 근시성 황반 변성, 근시성 망맥락막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 또는, 근시성 시신경 증인, 점안제.

청구항 7

안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정과, 상기 세포에 있어서의, PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 지표로 하여 후보 물질을 선택하는 공정을 포함하는, 강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은, 근시가 진행되고 있는 성인의 눈에 대해서, 안구 형상에 영향을 주는 강막(強膜) 비박화(非薄化)를 억제함으로써 안구 형상을 정상적으로 유지하여, 강막 비박화에 수반하는 안 질환을 치료하는 것이 가능한 유효 성분을 함유하는 강막 비박화 치료용 점안제, 및 그 강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 근시 및 강도 근시에 관한 최신의 연구에 의하면, 세계적으로 현저한 근시 인구의 증대가 예상되어, 2050년에는 근시는 약 50억명, 강도 근시는 약 10억명에 달한다고 예상되고 있다(비특허문헌 1을 참조).

- [0003] 또한, 일본에 있어서의 몇몇 역학 조사의 결과, -6D 이상의 강도 근시의 유병률은 5% 전후이며, 또한, 일반 주민을 대상으로 한 역학 연구인 다지미 스터디에서는, 강도 근시에 의해 야기되는 근시성 황반 변성이 실명 원인의 제3위가 되고 있다(비특허문헌 2를 참조).
- [0004] 이러한 강도 근시에 의해, 안구의 형상을 유지하기 위해서 결정적인 역할을 담당하고 있는 강막에서 비박화가 생김이 알려져 있고, 이 강막 비박화가 다양한 안 질환을 야기함이 알려져 있다(비특허문헌 2를 참조). 이들 강막 비박화 수반 안 질환을 분류하면, 근시성 황반 변성 등의 후안부 질환, 백내장, 안구 운동 장애를 들 수 있다. 어느 강막 비박화 수반 안 질환에 있어서도, 일단 손상된 시신경이나 수정체를 치료 또는 재생하는 것은 용이하지 않고, 이들 질환의 근본 원인인 과잉한 안축(眼軸) 신장에 수반하는 강막 비박화(안구의 변형)를 억제하는 것이 근치 요법이 된다.
- [0005] 예를 들어, 강막 비박화 수반 안 질환의 하나인 근시성 맥락막 신생 혈관(근시성 CNV)의 경우, 신생 혈관을 억제하는 기존약으로서 아플리베르셉트 및 라니비주마브가 알려져 있다. 그러나, 이들 항체 의약에 있어서는, 신생 혈관은 억제할 수 있지만, 강막 비박화 치료 효과는 없고, 또한, 맥락막이 반흔화하는 등의 예후 불량에 알려져 있다. 따라서, 이 질환이 중증화되기 전의 조기의 근본 치료(후안부에의 기계적 압력의 경감)가 강하게 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 국제 공개 W02018/164113

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050, Ophthalmology, Vol 123, Number 5, May 2016.
- (비특허문헌 0002) 증가하는 근시·강도 근시, 의학의 추이, Vol. 253, Issue 2, 159-161, 2015.
- (비특허문헌 0003) 후지카도 다카시, 「일본 안과 학회 전문의 제도 생애 교육 강좌 총설 54 소아의 근시의 진행 방지」, 일안회지, 117권, 4호, 397면~406면(2013년 4월 10일).
- (비특허문헌 0004) Posterior staphyloma in pathologic myopia, Progress in Retinal and Eye Research, 70(2019) 99-100.
- (비특허문헌 0005) Pathogenesis and Prevention of Worsening Axial Elongation in Pathological Myopia, Clinical Ophthalmology 2020: 14853-873.
- (비특허문헌 0006) Jiang, X., et. al., A highly efficient murine model of experimental myopia. Scientific reports 8, 2026, doi: 10.1038/s41598-018-20272-w(2018).
- (비특허문헌 0007) Mori, K., et. al., 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).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 근년, 강막 비박화(본 명세서에 있어서, 안구의 변형이라고도 한다)에 관한 인자가 밝혀져 왔다. 본 발명자들이 이 인자군에 대해 예의 연구한 결과, UPR(unfolded protein response) 유전자군이 안축 신장에 관여함이 발견되었다(특허문헌 1을 참조). 이 인자군에는, PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6(Activating transcription factor 6), IRE1(Inositol requiring 1)의 3개가 알려져 있지만, 이들을 어떻게 제어하면 강막 비박화를 억제 내지 치료할 수 있는지는 불명했다. 바꾸어 말하면, 이 유전자군을 어떻게 제어하는지는 강막 비

박화 및 수반 안 질환의 치료 전략상 극히 결정적이고 또한 곤란하다고 생각되고 있었다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명자들은, 성인 강막 비박화(과잉인 안축 신장)를 시뮬레이트하는 시험계를 검토하여, 마우스의 근시 유도 완료 후의 강막 비박화에 있어서의 메커니즘과 그 강막 비박화 치료에 유효한 성분을 검토했다. 이와 같은 성분이면, 강막 비박화를 억제하고, 또한 강막 비박화에 수반하는 안 질환을 치료할 수 있을 것이 강하게 기대된다.
- [0010] 본 발명의 목적은, 성인의 강도 근시에 의해 야기되는 강막 비박화를 억제할 수 있는 성분을 탐색하는 스크리닝 방법을 제공하는 것, 또한, 그 스크리닝 방법에 의해 얻어진 유효 성분에 의해, 강막 비박화 및 그 수반 안 질환을 치료할 수 있는 점안제를 제공하는 것에 있다.
- [0011] 즉, 본 발명은,
- [0012] [1] PERK(PKRR-like endoplasmic reticulum kinase) 경로 및/또는 ATF6(Activating transcription factor 6) 경로의 저해제를 유효 성분으로서 함유하는, 강막 비박화 치료용 점안제.
- [0013] [2] 상기 저해제가, 페닐뷰티르산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인, 상기 [1] 에 기재된 점안제.
- [0014] [3] 상기 저해제가, 페닐뷰티르산 나트륨인, 상기 [1] 또는 [2] 에 기재된 점안제.
- [0015] [4] 상기 저해제의 함유량이, 점안제 전량에 대해서, 0.01~5질량%인, 상기 [1] ~ [3] 중 어느 하나에 기재된 점안제.
- [0016] [5] 상기 강막 비박화 치료가, 강막 비박화에 의해 야기되는 후안부 질환을 치료하는 것인, 상기 [1] ~ [4]] 중 어느 하나에 기재된 점안제.
- [0017] [6] 상기 후안부 질환이, 근시성 황반 변성, 근시성 망막막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 또는, 근시성 시신경증인, 상기 [5] 에 기재된 점안제.
- [0018] [7] 안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정과, 상기 세포에 있어서의, PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 지표로 하여 후보 물질을 선택하는 공정을 포함하는, 강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 의하면, 강막 비박화를 억제할 수 있는 성분을 탐색하는 스크리닝 방법을 제공할 수 있다. 또한, 그 스크리닝 방법에 의해 얻어진 유효 성분에 의해, 강막 비박화 및 그 수반 안 질환을 치료할 수 있는 점안제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] [도 1] 마우스에 있어서의 근시 유도의 설명도로서, (a)는 근시 유도의 모식적 구조도이고, (b)는 근시 유도 마우스의 사진이다.
- [도 2] 근시 유도가 강막에 있어서 안축 신장과 굴절 변화를 유발하는 것을 나타내는 그래프로서, (a)는 마우스(n=4)에 있어서의 근시 유도 3주간의 안축 길이의 변화이고(*p<0.05), (b)는 마우스(n=4)에 있어서의 근시 유도 3주간의 굴절의 변화(*p<0.05)이다.
- [도 3] 근시 유도 후의 안과학적 및 세포학적 변화의 설명도이다. (a)는, 대조안 및 근시 유도안의 헤마톡실린 및 에오신 염색으로서, 황색의 봉은 강막의 두께를 나타내고 있다(각 군 n=5, 스케일 바는 50µm이다). (b)는, 강막 두께의 측정에 대한 설명도로서, 시신경 유두의 위치를 「0」이라고 하고, 시신경 유두로부터의 상방(+) 및 하방(-)의 거리(400µm, 700µm, 1000µm, 1300µm, 1600µm, 1900µm, 2200µm 및 2500µm)에서 강막 두께를 측정했다. (c)는, 그 강막 두께 측정 결과의 그래프이다.
- [도 4] UPR 유전자인 PERK 경로, ATF6 경로, IRE1 경로 각각의 각종 저해제를 나타내는 설명도이다.
- [도 5] 마우스에의 PERK 경로, ATF6 경로, IRE1 경로의 각종 저해제의 점안에 의한 안축 신장 및 굴절의 변화(근시화)를 나타내는 그래프이다. (a)는, STF080310(STF), GSK2656157(GSK) 및 넬피나비르(NFV)의 단독 점안이 안축 신장에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고(각 군 n=5), DMSO 점안 NL(=no lens)군과 비교한 결과(*p<

0.05)와, STF 점안 NL군 또는 -30D 렌즈 장착군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다. (b)는, STF, GSK 및 NFV의 단독 점안이 굴절의 근시화에 미치는 영향을 나타내는 결과이고(각 군 $n=5$), DMSO 점안 NL군과 비교한 결과($p < 0.05$)와, STF 점안 NL군 또는 -30D 렌즈 장착군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다. (c)는, STF, GSK 및 NFV의 병용 점안이 안축 신장에 미치는 영향을 나타내는 결과이고(각 군 $n=4$), DMSO 점안 NL군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다. (d)는, STF, GSK 및 NFV의 병용 점안이 굴절의 근시화에 미치는 영향을 나타내는 결과이고(각 군 $n=4$), DMSO 점안 NL군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다.

[도 6] 도 5와는 상이한 저해제에 있어서의, 마우스에의 PERK 경로, ATF6 경로, IRE1 경로의 각종 저해제의 점안에 의한 안축 신장 및 굴절의 변화(근시화)를 나타내는 그래프이다. (a)는, 4 μ 8C, GSK2606414 및 Ceapin-A7의 단독 점안이 안축 신장에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고(각 군 $n=5$), DMSO 점안 NL(=no lens) 군과 비교한 결과($p < 0.05$)와, 4 μ 8C 점안 NL군 또는 -30D 렌즈 장착군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다. (b)는, 4 μ 8C, GSK2606414 및 Ceapin-A7의 단독 점안이 굴절의 근시화에 미치는 영향을 나타내는 결과이고(각 군 $n=5$), DMSO 점안 NL군과 비교한 결과($p < 0.05$)와 4 μ 8C 점안 NL군 또는 -30D 렌즈 장착군과 비교한 결과($p < 0.05$)이다.

[도 7] 마우스에 있어서의 근시 유도강도가 강막에 있어서의 UPR 유전자 발현 향진을 유도하는 그래프로서, PBS의 복강내 주사(PBS) 및 페닐뷰티르산 나트륨의 투여(4-PBA; 200mg/kg/일)의 강막(각 군 $n=6$)에 있어서 UPR 유전자의 발현을 정량적 PCR에 의해 측정하여, 킨트롤안(백색 칼럼)에 대해 근시 유도안(회색 칼럼)에 있어서 유전자 발현이 향진하고, 4-PBA에 의한 그 억제력을 나타내는 결과이다($p < 0.05$).

[도 8] 마우스에 있어서의 근시 유도가 안축 신장 및 굴절의 근시화를 유도하는 그래프로서, (a)는, 안축 신장이 근시 유도(LIM) 1주째 및 3주째의 페닐뷰티르산의 복강내 주사(4-PBA; 200mg/kg/일)에 의해 억제되는 것을 나타내는 결과이고(각 군 $n=6$, $p < 0.05$), (b)는, 굴절의 근시화가 근시 유도(LIM) 1주째 및 3주째의 4-PBA 투여에 의해 억제되는 것을 나타내는 결과이다(각 군 $n=6$, $p < 0.05$).

[도 9] 마우스에 있어서의 근시 유도가 안축 신장 및 굴절의 근시화를 유도하는 그래프로서, (a)는, 굴절의 근시화가 타우로우르소테옥시콜산의 복강내 주사(TUDCA; 100mg/kg 체중)에 의해 억제되는 것을 나타내는 그래프이고(각 군 $n=4$, $p < 0.05$), (b)는, 안축 신장이 TUDCA에 의해 억제되는 것을 나타내는 그래프이다(각 군 $n=4$, $p < 0.05$).

[도 10] (a)는, 렌즈 없음(NL) 및 -30D 렌즈를 장착한 C57BL6J 마우스에 PBS 또는 4-PBA를 점안했을 경우의, 강막 콜라겐 섬유 투과형 전자 현미경상(생물학적으로 독립된 3개의 샘플의 대표적인 화상)이다. (b)는, 강막 콜라겐 섬유 면적($n=$ 생물학적으로 독립된 3샘플)의 결과이다. 섬유 면적은, ImageJ 소프트웨어를 이용하여 1개의 강막으로부터 얻은 5개의 화상으로부터 측정했다.

[도 11] 4-PBA 점안이 근시 진행이 끝난 후의 성인에 있어서의 근시화에 유효한 것의 설명도로서, 3주간의 근시 유도(LIM) 기간이 종료된 후(성인의 근시 기간을 시플레이트)에 점안하는 실험의 계획을 나타내는 모식도이다.

[도 12] 성인의 근시 기간에 상당하는 마우스의 근시 유도 기간 종료 후에 4-PBA를 점안했을 때의 근시 억제 효과로서, (a)는, 비히클($n=7$) 및 4-PBA($n=5$) 점안군에 있어서의 전처치(Pre-treatment)로부터 1주(1wk) 또는 3주(3wk)의 안축 신장 결과이고, (b)는, 마찬가지로 점안했을 때의 굴절 변화($n=5$)이다.

[도 13] 시험예 7에 있어서의, 주요 콜라겐 성분의 감소에 대한 4-PBA 점안 혹은 UPR 유전자 저해제 투여의 영향을 평가한 결과이다.

[도 14] 시험예 8에 있어서의, 강막 비박화 및 그 수반 후안부 질환의 치료에 있어서의 ATF6 경로의 관여를 평가한 그래프이다.

[도 15] 시험예 9에 있어서의, 근시 유도에 의한 수정체 비후에의 투여 형태의 차이에 의한 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명은, 이하의 실시형태 및 실험예로 한정되지 않고, 본 발명의 요지를 포함하는 범위에서 여러 가지 변형예나 응용예를 포함한다.

[0022] [강막 비박화 치료용 점안제]

[0023] 본 발명에 따른 강막 비박화 및 그것에 수반하는 안 질환 치료용 점안제는, PERK(PKR-like endoplasmic

reticulum kinase) 경로 및 ATF6(Activating transcription factor 6) 경로의 저해제를 유효 성분으로서 함유한다.

- [0024] (강막 비박화 치료제)
- [0025] 전술한 바와 같이, 과도한 안축 신장이 강막의 비박화(안구의 변형)를 야기하여, 강막 비박화 및 수반 안 질환의 야기 및/또는 악화에 관여하고 있다. 후술하는 실험예에서 나타내는 바와 같이, 근시 유도 마우스 모델에 있어서, 안구의 변형의 원인이 되는 강막 비박화가 야기되고 있음이 확인되고, 그 메커니즘은 UPR 유전자군의 특정의 유전자의 발현 향진이며, 그 결과, 강막에 있어서의 콜라겐 섬유의 협세화(狹細化)가 야기되어, 강막 비박화에 이르는 것이 시사되었다. 따라서, 강막의 비박화에 대해서 억제 효과를 갖는 물질이 유효 성분이 될 수 있다.
- [0026] 즉, 강막의 비박화에 관여하는 유전자, 및/또는, 단백질을 표적으로 하여, 이들을 억제하는 화합물이나, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 등의 핵산 등을, 강막 비박화 및 수반 안 질환의 치료에 유효한 성분으로서 점안제에 배합할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에 있어서, PERK 경로 및 ATF6 경로의 저해제란, PERK의 시그널 전달계(PERK 경로), 및, ATF6의 시그널 전달계(ATF6 경로)의 어느 것에 대해서도 저해 효과를 갖는 물질을 말한다. 이들 시그널 전달계에의 저해 효과는, 후술하는 실시예와 같이, 공지된 방법에 의해, 이들 시그널 전달계에 관여하는 유전자, 및/또는, 단백질의 변화를 지표로 하여 평가할 수 있다.
- [0028] (PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제)
- [0029] 전술한 바와 같이, 강막 비박화(병적 안축 신장)에 관한 인자로서, 소포체 중의 이상 단백질인 절첩 부전 단백질에 응답하는 유전자 경로가 병적 안축 신장에 관여하고 있다. 이 유전자 경로에는, PERK 경로, ATF6 경로 및 IRE1 경로의 3개가 알려져 있지만, 후술하는 실험예에 나타내는 바와 같이, 적어도 ATF6 경로를 억제하는 것이 근시 억제에 필수임이 새롭게 발견되었다. 또한, 이들 3개의 경로 중, PERK 경로와 ATF6 경로를 억제함으로써 근시 진행 억제 효과가 더욱 높아짐이 새롭게 발견되었다. PERK 경로 또는 ATF6 경로의 어느 하나만을 억제했을 경우에는, 다른 쪽의 경로를 대상적(代償的)으로 활성화해 버리는 경우가 있음도 확인되었다. 따라서, 한정은 되지 않지만, 하나의 실시형태에 있어서는, PERK 경로와 ATF6 경로의 어느 것에 대해서도 저해 효과를 갖는 물질이 병적 안축 신장(강막 비박화) 억제의 유효 성분이 될 수 있다.
- [0030] 즉, PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달에 관련되는 유전자나 단백질을 표적으로 하여, 이들을 저감시키는 화합물이나, PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 단백질 발현을 저감시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA 등의 핵산을, 강막 비박화 치료에 유효한 성분으로서 점안제에 배합할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에 있어서, PERK 경로 또는 ATF6 경로의 저해제란, 소포체에 있어서의 PERK의 시그널 전달계, 또는, ATF6의 시그널 전달계에 대해서 저해 효과를 갖는 물질을 말한다. 이들의 시그널 전달계에의 저해 효과는, 후술하는 실험예에 기재된 방법에 의해, 또는 공지된 방법에 의해, 이들의 시그널 전달계에 관여하는 유전자, 및/또는, 단백질의 변화를 지표로 하여 평가할 수 있다.
- [0032] PERK의 시그널 전달계에 관련되는 인자의 유전자 발현, 또는, 단백질의 발현을 평가하는 경우, 후보 물질을 첨가하지 않는 컨트롤과 비교하여, 후보 물질에 의해 그 인자의 발현이 적어도 1% 변동하는 것에 의해 평가하는 것이 가능하다.
- [0033] 또한, ATF6의 시그널 전달계에 관련되는 인자의 유전자 발현, 또는, 단백질의 발현을 평가하는 경우, 후보 물질을 첨가하지 않는 컨트롤과 비교하여, 후보 물질에 의해 그 인자의 발현이 적어도 1% 변동하는 것에 의해 평가하는 것이 가능하다.
- [0034] PERK는, 소포체막 관통형 키나제이며, 그 시그널 전달에 관련되는 인자로서는, 예를 들어, eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α), ATF4(Activating transcription factor 4), CHOP(C/EBP homologous protein), GADD34(growth arrest DNA and damage protein 34) 등을 들 수 있다.
- [0035] 또한, ATF6은, CREB/ATF 패밀리에 속하는 막결합형 전사 인자이며, 그 시그널 전달에 관련되는 인자로서는, 예를 들어, BiP(Binding immunoglobulin protein, 「GRP78」이라고도 칭해진다), Txndc12(thioredoxin domain containing 12, 「Erp18」이라고도 칭해진다), S1P(site-1 protease), S2P(site-2 protease) 등을 들 수 있다.
- [0036] 후술하는 실험예에 있어서, PERK 경로와 ATF6 경로의 양쪽 모두를 억제할 수 있는 성분을 스크리닝함으로써, 폐

닐뷰티르산, 타우로우르소스테옥시콜산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종이 발견되어 있다. 그러나, 이들에 한정하지 않고, 새롭게, 적어도 ATF6 경로를 억제하는 성분으로서 특정되는 성분이나, 새롭게 PERK 경로와 ATF6 경로를 억제하는 성분으로서 특정되는 성분도 사용할 수 있다. PERK 경로 및 ATF6 경로의 저해제로서는, 한정은 되지 않지만, 점안제에 있어서의 용해성의 관점에서, 페닐뷰티르산 나트륨이 바람직하다. 후술하는 실험예에 기재하는 바와 같이, 페닐뷰티르산 나트륨이면, ATF6 경로에 더하여, PERK 경로도 저해할 수 있기 때문에, 바람직하다. PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제는, 공지된 방법에 의해 합성하여 사용해도 되고, 시판품을 입수하여 사용해도 된다.

[0037] 본 명세서에 있어서, 「약학적으로 허용할 수 있는 염」은, 특별히 제한되지 않지만, 구체적으로는, 유기산염, 무기산염, 유기 염기, 또는 무기 염기를 들 수 있다. 유기산염으로서, 예를 들어, 아세트산염, 트라이플루오로아세트산염, 뷰티르산염, 팔미트산염, 스테아르산염 등의 모노카복실산염; 푸마르산염, 말레산염, 석신산염, 말론산염 등의 다가 카복실산염; 락트산염, 타르타르산염, 시트르산염 등의 옥시카복실산염; 메테인설폰산염, 툴루엔설폰산염, 토실산염 등의 유기 설폰 산염을 들 수 있다. 무기산염으로서, 예를 들어, 염산염, 황산염, 질산염, 브로민화 수소산염, 인산염을 들 수 있다. 유기 염기와 염으로서, 예를 들어, 메틸아민, 트라이에틸아민, 트라이에탄올아민, 다이에탄올아민, 모폴린, 피페라진, 피롤리딘, 트라이피리딘, 피롤린, 에틸렌다이아민 등의 유기 아민과의 염을 들 수 있다. 무기 염기와 염으로서, 예를 들어, 암모늄염; 나트륨 또는 칼륨 등 알칼리금속, 칼슘 또는 마그네슘 등의 알칼리 토류 금속, 알루미늄 등의 금속과의 염 등의 각종의 염을 들 수 있다. 이들 염은, 1종 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 임의로 조합하여 사용해도 된다. 「약학적으로 허용되는 염」에는, 염의 용매화물 또는 수화물을 포함하고 있어도 된다.

[0038] PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제의 함유량은, 용법, 용량, 첨가제의 종류 등에 따라 적절히 변경될 수 있다. 예를 들어, 점안제 전량에 대해서, 0.01질량% 이상이 바람직하고, 0.05질량% 이상이 보다 바람직하고, 0.1질량% 이상이 더 바람직하고, 0.2질량% 이상이 특히 바람직하다. 또한, PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제의 함유량은, 예를 들어, 점안제 전량에 대해서, 5질량% 이하가 바람직하고, 4질량% 이하가 보다 바람직하고, 3질량% 이하가 더 바람직하고, 2질량% 이하가 특히 바람직하다. 또한, PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제의 함유량은, 예를 들어, 점안제 전량에 대해서, 0.01~5질량%가 바람직하고, 0.05~4질량%가 보다 바람직하고, 0.1~3질량%가 더 바람직하고, 0.2~2질량%가 특히 바람직하다.

[0039] 강막 비박화 치료제로서 페닐뷰티르산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 이용하는 경우, 그 함유량은, 예를 들어, 점안제 전량에 대해서, 0.01~5질량%가 바람직하고, 0.05~4질량%가 보다 바람직하고, 0.1~3질량%가 더 바람직하고, 0.2~2질량%가 특히 바람직하다.

[0040] [용도]

[0041] 안축 길이는, 출생 후부터 2세경까지 급속히 신장되고, 그 후는 서서히 신장되게 된다. 이와 같은 성장에 수반하는 안축 신장은, 「생리적 안축 신장」이라고 하고, 눈의 발달에는 불가결한 현상이다. 그러나, 학동기(學童期) 이후에 있어서도 안축 길이가 계속 신장되는 것은, 근시의 진행으로 이어지기 때문에, 「병적 안축 신장」이라고 생각되고 있다. 예를 들어, 병적 안축 신장에서는, 성인의 눈에서 1mm 안축 길이가 신장되는 것은, 약 3.0D의 근시도가 증가하는 것으로 이어진다.

[0042] 본 발명에 따른 점안제는, 강막 비박화 및 수반 안 질환의 치료용으로서 이용된다. 본 명세서에 있어서, 강막 비박화 수반 안 질환이란, 강도 근시에 의해 기질적으로 안축 길이가 과도하게 신장됨으로써 야기되는 질환을 말한다. 강도 근시에 있어서, 안구의 형태를 유지하고 있는 강막의 비박화가, 상기 수반 안 질환의 초기 증상이라고 말해지고 있다(비특허문헌 4를 참조).

[0043] 후술하는 실시예에서는, 근시 유도 마우스에 있어서, 근시 유도 종료 후의 3주간에서도 계속해서 안축은 신장되어, 강막의 비박화가 생기고 있었다. 즉, 근시 유도 종료 후의 병적 안축 신장과 강막 비박화는, 소아의 근시 진행 후의 성인기에 상당하는 기간에서도 계속됨이 확인되고, 이것이 강막 비박화 및 수반 안 질환 발증의 메커니즘임이 시사되었다. 따라서, 강막의 비박화를, 강막 두께, 강막에 있어서의 콜라겐 섬유유리 굵기, 혹은, 강막에 있어서의 콜라겐 관련 유전자·단백(COL1A1, COL4A3, COL8A2, COL11A2, 및 COL15A1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종)의 발현 등으로 평가하여, 이 비박화를 억제할 수 있는 성분을 스크리닝하는 것에 의해, 안구의 변형을 억제하여, 강막 비박화 및 수반 안 질환의 치료에 이용할 수 있는 것이라고 생각된다.

[0044] 후술하는 실시예에서는, 근시 유도 마우스에 있어서, 근시 유도 종료 후에 PERK 경로 및 ATF6 경로가 항진하고 있어, 강막의 비박화의 원인인 안축 신장이 생기고 있었다. 즉, 근시 유도에 의한 병적 안축 신장과 강막 비박

화는, 소아의 근시 진행 후의 성인기에 상당하는 기간에서도 계속됨이 확인되고, 이것이 강막 비박화 및 수반 안 질환 발증의 메커니즘임이 시사되었다. 따라서, 강막의 비박화를, PERK 경로 및 ATF6 경로의 동시 항진으로 평가하여, 이들을 억제할 수 있는 성분을 스크리닝하는 것에 의해, 안구의 변형을 억제하여, 강막 비박화 및 수반 안질환의 치료에 이용할 수 있는 것이라고 생각된다.

- [0045] 강막 비박화 수반 안 질환으로서는, 근시성 황반 변성, 근시성 망맥락막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 근시성 시신경증, 근시성 망막증, 망막 맥락막 위축, 황반부 출혈, 근시성 견인 황반증, 근시성 황반증, 근시성 황반부 병변, 근시성 황반 분리증, 근시성 굴절 맹점, 근시성 코누스, 근시성 중심와 분리증, 미만성 위축 병변, 국한성 위축 병변, Lacquer cracks, 후부 포도종, 망막 박리, 황반원공, 경사 유두 증후군, 근시성 난시, 고정 내사시(內斜視), 기계적 외전 제한, 내사시, 강도 근시성 사시, 등의 안 질환을 들 수 있다.
- [0046] 이들 강막 비박화 수반 안 질환 중, 강막 비박화(안구의 변형)와 강한 인과관계가 있다고 하는 관점에서 후안부 질환이 바람직하다. 더욱이, 명확하고 또한 직접적인 인과 관계가 있다고 하는 관점에서, 근시성 황반 변성, 근시성 망맥락막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 또는, 근시성 시신경증에 대해서, 본 발명이 적용되는 것이 바람직하다.
- [0047] (제형)
- [0048] 본 발명에 따른 조성물은, 점안제로서 이용된다. 본 발명에 있어서, 강막 비박화 치료용 점안제의 제형은, 한정 은 되지 않지만, 예를 들어, 수성 점안제, 용시(用時) 용해 점안제, 현탁성 점안제, 유성 점안제, 안연고제 등을 들 수 있다. 이들 중에서도, 본 발명의 효과를 현저하게 발휘하는 관점에서, 수성 점안제인 것이 바람직하다.
- [0049] 점안제에는, 진술한 성분에 더하여, 그 외의 유효 성분(약리 활성 성분, 생리 활성 성분 등)을 배합할 수 있다. 이와 같은 성분의 종류는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어, 충혈 제거 성분, 안근 조절약 성분, 항염증약 성분, 수렴약 성분, 항히스타민약 성분, 항알레르기약 성분, 비타민류, 아미노산류, 항균약 성분, 당류, 고분자 화합물 또는 그 유도제, 셀룰로스 또는 그 유도제, 국소 마취약 성분 등을 들 수 있다.
- [0050] 점안제에는, 추가로 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위에서, 그 용도나 형태에 따라서, 통상적 방법에 따라, 다양한 성분이나 첨가물을 적절히 선택하여, 1종 또는 2종 이상을 병용하여 함유시킬 수 있다. 그들의 성분 또는 첨가물로서, 예를 들어, 액체 등의 조제에 일반적으로 사용되는 담체, 향료 또는 청량화제, 방부제, 살균제 또는 항균제, pH 조절제, 킬레이트제, 안정화제, 등장화제, 완충제, 점조화제 등의 각종 첨가제를 들 수 있다. 이하에, 점안제에 사용되는 대표적인 성분을 예시하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0051] 담체로서는, 예를 들어, 물, 함수 에탄올 등의 수성 용매를 들 수 있다. 한편, 각종 성분이 수성 용매에 녹기 어려운 경우에는, 가용화제를 이용해도 된다. 가용화제로서는, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유, 스테아르산 폴리옥실 40, 포비돈, 폴리소르베이트 80 등을 들 수 있다.
- [0052] 향료 또는 청량화제로서는, 예를 들어, 테르펜류(구체적으로는, 아네톨, 유제놀, 캄페, 게라니올, 시네올, 보르네올, 멘톨, 리모넨, 용뇌(龍腦) 등. 이들은 d체, l체 또는 dl체의 어느 것이어도 된다.), 정유(회향유, 콜민트유, 계피유, 스피어민트유, 박하수, 박하유, 페퍼민트유, 베르가모트유, 유칼리유, 로즈유 등) 등을 들 수 있다.
- [0053] 방부제, 살균제 또는 항균제로서는, 예를 들어, 염화 폴리드로늄, 염산 알킬 다이아미노에틸글리신, 벤조산 나트륨, 에탄올, 염화 벤잘코늄, 염화 벤제토늄, 글루콘산 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 소르브산, 소르브산 칼륨, 데하이드로아세트산 나트륨, 파라옥시벤조산 메틸, 파라옥시벤조산 에틸, 파라옥시벤조산 프로필, 파라옥시벤조산 뷰틸, 황산 옥시퀴놀린, 페네틸 알코올, 벤질 알코올, 바이구아나이드 화합물(구체적으로는, 폴리헥사메틸렌바이구아나이드 또는 그의 염산염 등), 글로킬(로디아사제의 상품명) 등을 들 수 있다.
- [0054] pH 조절제로서는, 예를 들어, 염산, 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 칼슘, 수산화 마그네슘, 트라이에탄올 아민, 모노에탄올아민, 다이아이스프로판올아민, 황산, 인산 등을 들 수 있다.
- [0055] 킬레이트제로서는, 예를 들어, 아스코르브산, 에데트산 4나트륨, 에데트산 나트륨, 시트르산 등을 들 수 있다.
- [0056] 안정화제로서는, 예를 들어, 에데트산 나트륨 수화물, 포비돈, 폴리소르베이트 80, 다이뷰틸하이드록시톨루엔, 트로메타몰, 나트륨 폼알데하이드 설폭실레이트(롱가리트), 토코페롤, 피로아황산 나트륨, 모노에탄올 아민, 모노스테아르산 알루미늄, 모노스테아르산 글리세린 등을 들 수 있다.

- [0057] 등장화제로서는, 예를 들어, 염화 칼륨, 염화 나트륨, 진한 글리세린, 포도당, D-만니톨 등을 들 수 있다.
- [0058] 완충제로서는, 예를 들어, 시트르산 나트륨 수화물, 아세트산 나트륨 수화물, 탄산수소 나트륨, 트로메타몰, 붕산, 인산수소 나트륨 수화물, 인산이수소 나트륨 등을 들 수 있다.
- [0059] 점조화제로서는, 예를 들어, 카복시바이닐 폴리머, 포비돈, 폴리바이닐 알코올(부분 비누화물), 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이프로멜로스, 메틸셀룰로스, 글리세린 등을 들 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 점안제에 있어서, 첨가제는, 본 발명의 효과를 기대하여, 또는 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위 내에서 배합할 수 있다. 그 함유량은 특별히 한정되지 않지만, 점안제 전량에 대해서, 0.001~1질량% 정도 인 것이 바람직하다.
- [0061] 점안제의 pH는, 3~10으로 하면 되고, 4~9가 사용감의 관점에서 바람직하고, 5~8.5가 사용감의 관점에서 보다 바람직하다.
- [0062] 본 발명에 따른 점안제를 수용하는 용기로서는, 공지된 점안 용기를 제한 없이 사용할 수 있다. 점안 용기로서는, 통상, 눈에 점안제를 적하할 수 있는 형상, 예를 들어 노즐을 구비하고, 노즐의 끝에 용기구(容器口)를 구비하는 형상의 것을 사용할 수 있다. 또한, 점안 용기로서는, 용기에 그것과는 별도로 성형된 노즐이 장착되어 있는 구조의 것, 및 노즐부(액의 주출부)와 용기 본체가 일체 성형된 구조의 것(예를 들어, 1회용 타입의 점안 용기 등)의 어느 것이어도 된다.
- [0063] 점안 용기는, 통상, 플라스틱 용기로 하면 된다. 플라스틱 용기의 구성 재료에 대해서는, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리아릴레이트, 폴리에틸렌 나프탈레이트, 폴리카보네이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리이미드의 어느 1종, 이들의 공중합체, 또는 이들의 2종 이상의 혼합체를 들 수 있다. 특히 압출의 가감 등으로 본 발명의 효과를 발휘하기 쉬운 점에서, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리아릴레이트, 폴리에틸렌 나프탈레이트 또는 이들의 공중합체, 또는 이들의 2종 이상의 혼합체가 바람직하다.
- [0064] 점안제는, 이와 같은 재료를 주재료로 하는 투명 용기(이물을 관찰하는 데 지장 없을 정도의 투명성을 구비한 용기)에 충전되어도 되고, 차광된 용기에 충전되어도 된다. 차광은, 예를 들어 투명 용기 재료에 착색제를 첨가하는 것에 의해 행해도 되고, 용기를 수축 필름이나 외부상자 등으로 덮는 것에 의해 차광해도 된다. 또한, 용기의 용량은, 압출의 가감 등으로 본 발명의 효과를 보다 한층 발휘하기 쉽게 하기 위해서, 0.5~50mL 정도가 바람직하고, 3~20mL 정도가 보다 바람직하다.
- [0065] 또한, 점안 용기에 구비되어 있는 노즐에 대해서도, 그 구조나 구성 재료에 대해서는 특별히 제한되는 것은 아니다. 노즐의 구조에 대해서는, 점안 용기의 노즐로서 일반적으로 채용되고 있는 구조이면 된다. 또한, 노즐의 구성 재료에 대해서는, 예를 들어, 상기 플라스틱 용기의 구성 재료와 마찬가지로의 것이 예시된다. 점안제의 액 절(液切)을 한층 양호하게 시키고, 적하량의 불균형도 억제한다고 하는 관점에서는, 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌을 구성 재료로서 포함하는 노즐이 호적하다. 폴리에틸렌의 종류로서는, 고밀도 폴리에틸렌, 저밀도 폴리에틸렌 등을 들 수 있지만, 그 중에서도 저밀도 폴리에틸렌을 구성 재료로서 포함하는 노즐이 호적하다.
- [0066] (점안제의 제조 방법)
- [0067] 본 발명에 따른 점안제는, 당업자에게 관용 또는 공지된 방법으로 조제할 수 있다. 예를 들어, 각 성분을 물 등의 담체에 분산시킨 후, 필요하면 가용화제를 첨가하고, 필요에 따라서 가운하고, 호모 믹서 등을 이용하여 균일화, 용해 또는 유화시키고, pH 조정제로 pH를 조정하는 것에 의해 조제하면 된다. 또한, 제제의 멸균 방법으로서, 전자선 멸균, 오토클레이브 멸균, 여과 멸균 등의 방법을 선택할 수 있다.
- [0068] (사용 방법)
- [0069] 본 발명에 따른 점안제의 용법 및 용량은, 환자의 증상 등에 따라 변동하지만, 통상, 1일 약 1~6회, 1회 약 1~2적을 점안하면 된다.
- [0070] 본 발명에 따른 점안제는, 한정은 되지 않지만, 강막 비박화 치료제로서 페닐뷰티르산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 함유시킨 점안제를 이용하는 경우, 예를 들어, 점안제를 1일 1~2회, 1회 1~2적으로 점안하는 것이 가능하고, 1일 1회, 1회 1적으로 점안하는 것이 바람직하다.
- [0071] 또한, 본 발명의 효과를 현저하게 발휘하는 관점에서, 본 발명에 따른 점안제는, 예를 들어, 낮잠 전, 취침 전 등의 활동이 활발하지 않은 시간대에 이용하는 것이 가능하다.

- [0072] [강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법]
- [0073] 본 발명에 있어서, 강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법은, 안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정과, 상기 세포에 있어서의, PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 지표로 하여 후보 물질을 선택하는 공정을 포함한다. 한정은 되지 않지만, 예를 들어, 후보 물질의 존재하 또는 부존재하에서 세포에 접촉시켜, 후보 물질에 의한 PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 측정하여 비교하는 것에 의해 후보 물질의 스크리닝이 행해질 수 있다.
- [0074] 안 유래의 세포로서는, 한정은 되지 않지만, 본 발명의 효과를 현저하게 발휘하는 관점에서, 강막에 있어서의 세포인 것이 바람직하다.
- [0075] 한정은 되지 않지만, 안 유래의 세포는, 근시를 유도한 동물 모델에서 유래하는 세포인 것이 바람직하다. 이와 같은 근시 유도 모델로서는, 공지된 동물 모델을 이용하는 것이 가능하다.
- [0076] 한정은 되지 않지만, 근시 유도 모델로서는, 마이너스 렌즈를 장용(裝用)시켜 근시를 유도한 동물 모델, 근시 유도제를 투여하는 것에 의해 근시 유도한 동물 모델 등을 들 수 있다.
- [0077] 이와 같은 마이너스 렌즈로서는 -20~-40디옵터(D)의 것을 이용할 수 있고, 바람직하게는 -25~-35디옵터(D)이다. 마이너스 렌즈의 장용 방법은, 공지된 방법을 이용할 수 있고, 한정은 되지 않지만, 동물의 눈 앞에 고정구를 이용하여 마이너스 렌즈를 고정하는 것 등을 들 수 있다.
- [0078] 마이너스 렌즈의 장용 기간은, 예를 들어, 적어도 1주간으로 할 수 있고, 2주간 이상이 바람직하고, 3주간 이상이 보다 바람직하다.
- [0079] 또한, 근시 유도제로서는, 공지된 물질을 이용하는 것이 가능하지만, 예를 들어, 근시 유도제로서, 튜니카마이신, 탐시가르긴 등을 이용하는 것이 가능하다. 또한, 근시 유도제로서는, PERK 경로의 활성화제나, ATF6 경로의 활성화제를 조합하여 이용하는 것도 가능하다. PERK 경로의 활성화제로서는, CCTO20312 등을 들 수 있고, ATF6 경로의 활성화제로서는, AA147 등을 들 수 있고, 이들을 단계 투여, 또는 혼합 투여하는 것이 가능하고, 이들을 혼합 투여하는 것이 바람직하다.
- [0080] 이와 같은 근시 유도제는, 한정은 되지 않지만, 강막 등의 눈의 세포에 작용시키는 관점에서, 예를 들어, 주사제, 또는, 점안제로서 투여하는 것이 가능하고, 점안제로서 투여하는 것이 바람직하다. 튜니카마이신을 점안제로서 이용하는 경우는, 예를 들어, 10~100 µg/mL로 할 수 있고, 20~80 µg/mL가 바람직하고, 40~60 µg/mL가 보다 바람직하다.
- [0081] 탐시가르긴을 점안제로서 이용하는 경우는, 예를 들어, 1~100 µM로 할 수 있고, 2~60 µM이 바람직하고, 5~30 µM이 보다 바람직하다.
- [0082] 근시 유도 모델을 이용하는 경우, 강막 비박화 및 수반 안 질환에의 적용을 상정한 동물 모델로 하는 관점에서, 근시 유도 완료 후의 동물을 이용하는 것이 바람직하다. 한정은 되지 않지만, 마우스인 경우, 마이너스 렌즈의 장용 개시 시기는, 이유 시기로 하는 것이 바람직하고, 3주령 마우스인 것이 보다 바람직하다. C57BL6 등의 마우스에서는, 3주령으로부터 6주령에 걸쳐 생리적 안축 신장이 생긴다. 따라서, 3주령으로부터 근시를 유도하는 것에 의해, 생리적 안축 신장에 더하여, 과잉한 안축 신장을 촉진시킬 수 있기 때문에, 병적 안축 신장을 생기기 하는 것이 가능해진다.
- [0083] 또한, 후보 물질의 적용 시기는, 예를 들어, 근시 유도 중(3주령~6주령 등), 및/또는, 근시 유도 후(6주령~8주령 등)가 바람직하다. 강막 비박화에 의해 후안부 장애가 야기되는, 인간에서 말하는 성인기에 상당하는 기간에 행하는 관점에서는, 후보 물질의 적용 시기는, 예를 들어, 근시 유도 후(6주령~8주령 등)가 보다 바람직하다. 한정은 되지 않지만, 근시 유도 후에 후보 물질을 적용하는 수법에 의하면, 후보 물질이, 소아기의 근시 진행이 끝난 후의 잔여된 병적 안축 신장, 및, 강막의 비박화에 주는 영향을 평가하는 것이 가능하다.
- [0084] 한정은 되지 않지만, 후보 물질을 안 유래의 세포에 접촉시키는 스텝은, 당해 후보 물질을 경구, 복강내 주사 또는 점안에 의해 투여하는 것이 바람직하고, 점안에 의해 투여하는 것이 보다 바람직하다. 예를 들어, 강막에 있어서의 세포에 있어서 평가하는 경우는, 후보 물질을 점안제에 함유시켜 투여하는 것이 가능하다.
- [0085] 후보 물질에 의한 PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 측정하는 스텝에서는, 공지된 평가 방법을 이용하는 것이 가능하다. 한정은 되지 않지만, 유전자의 발현이나 단백질의 발현 또는 분비는, 마이크로어레이, 리얼타임 PCR법, PCR법, 웨스턴 블롯법, ELISA법, 면역 조직 염색 등의 공지된 방법에

의해 측정할 수 있다.

- [0086] 예를 들어, PERK 또는 ATF6의 시그널 전달계의 유전자의 변화를 측정하는 경우, 배양 세포로부터 공지된 RNA 추출 방법을 이용하여 RNA를 추출하고, mRNA의 발현을 정량 분석하는 스텝에 제공하는 것이 가능하다.
- [0087] mRNA의 발현을 정량 분석하는 스텝은, 한정은 되지 않지만, 리얼타임 PCR법을 이용하는 것이 바람직하다. 리얼타임 PCR법으로 측정하는 마커로서는, (PERK 경로 및 ATF6 경로의 저해제)의 항목에서 전문한, 시그널 전달에 관련되는 인자를 측정 항목으로 하는 것이 가능하다.
- [0088] PERK 경로에 관련되는 인자로서는, 예를 들어, CHOP, ATF4, GADD34 등을 들 수 있다.
- [0089] ATF6 경로에 관련되는 인자로서는, 예를 들어, GRP78, GRP94, PDI, Cnex, HYOU, ERdj3 등을 들 수 있다.
- [0090] 후보 물질에 의한 강막의 비박화를 측정하는 스텝에서는, 공지된 평가 방법을 이용하는 것이 가능하다. 한정은 되지 않지만, 강막 두께에 의해 평가하는 경우, 강막 조직을 HE 염색 등에 의해 염색하고, 현미경 등에 의해 조직 관찰 및 분석을 행하는 것에 의해, 강막 두께를 측정하는 것이 가능하다. 또한, 강막 두께를 in situ로 측정하려면, 광간섭 단층계(OCT)를 이용하는 것이 가능하고, 보다 고정밀도의 강막 두께 관찰을 위해, 스펙트럴 도메인(SD)-OCT나 스윙트 소스(SS)-OCT를 이용할 수도 있다.
- [0091] 또한, 한정은 되지 않지만, 강막에 있어서의 콜라겐 섬유의 굵기 또는 양에 의해 평가하는 경우, 강막에 있어서의 콜라겐 섬유를 전자 현미경 등에 의해 조직 관찰 및 분석을 행하는 것에 의해, 섬유 면적이나 섬유 단면에 있어서의 직경을 측정하는 것이 가능하다.
- [0092] 후보 물질에 의한 강막의 비박화가 억제되어 있는 경우, 당해 후보 물질을 강막 비박화 치료제로서 선정하여, 강막 비박화 치료제로서 이용하는 것이 가능하다.
- [0093] 본 발명은, 이하의 태양으로도 있을 수 있다.
- [0094] PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase) 경로 및/또는 ATF6(Activating transcription factor 6) 경로의 저해제를 유효 성분으로서 함유하는, 강막 비박화 치료용 점안제;
- [0095] 강막 비박화 치료에 있어서의 사용을 위한, PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제를 유효 성분으로서 함유하는 점안제;
- [0096] PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제의, 강막 비박화 치료용 점안제의 제조를 위한 사용;
- [0097] PERK 경로 및/또는 ATF6 경로의 저해제를, 사람에게 유효량 섭취시키는 것을 포함하는, 강막 비박화 치료 방법;
- [0098] 상기 저해제가, 적어도 ATF6 경로를 선택적으로 억제하는 것을 포함하는, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0099] 상기 저해제가, PERK 경로 및 ATF6 경로의 양 경로의 저해제인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0100] 상기 저해제가, 페닐뷰티르산 및 그 약리학적으로 허용되는 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0101] 상기 저해제가, 페닐뷰티르산 나트륨인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0102] 상기 저해제의 함유량이, 점안제 전량에 대해서, 0.01~5질량%인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0103] 상기 저해제의 함유량이, 점안제 전량에 대해서, 0.1~3질량%인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0104] 상기 저해제의 함유량이, 점안제 전량에 대해서, 0.2~2질량%인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0105] 상기 강막 비박화 치료법이, 생리적 안축 신장을 억제하지 않는 것인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0106] 상기 강막 비박화 치료법이, 병적 안축 신장을 억제하는 것인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0107] 상기 강막 비박화 치료법이, 강막 비박화 수반 안 질환의 치료용으로서 이용되는, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0108] 상기 강막 비박화 수반 안 질환이, 근시성 황반 변성, 근시성 망막막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 근시성 시신경증, 근시성 망막증, 망막 맥락막 위축, 황반부 출혈, 근시성 견인 황반증, 근시성 황반증, 근시성 황반부 병변, 근시성 황반 분리증, 근시성 굴절 맹점, 근시성 코누스, 근시성 중심와 분리증, 미만성 위축 병변, 국한

성 위축 병변, Lacquer cracks, 후부 포도종, 망막 박리, 황반원공, 경사 유두 증후군, 근시성 난시, 고정 내사시, 기계적 외전 제한, 내사시, 또는, 강도 근시성 사시인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;

- [0109] 상기 강막 비박화 수반 안 질환이, 근시성 황반 변성, 근시성 망막라막 위축, 근시성 맥락막 신생 혈관, 또는, 근시성 시신경증인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0110] 상기 점안제가, 수정 점안제인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0111] 상기 점안제가, 1일 1~2회의 점안에서 이용되는 것인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0112] 상기 점안제가, 1일 1~2회의 점안에서 이용되는 것인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0113] 상기 점안제가, 낮잠 전, 또는, 취침 전에 이용되는 것인, 상기에 기재된 점안제, 사용, 또는 방법;
- [0114] 안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정과, 상기 세포에 있어서의, PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 변화를 지표로 하여 후보 물질을 선택하는 공정을 포함하는, 강막 비박화 치료제의 스크리닝 방법;
- [0115] 상기 안 유래의 세포가, 근시를 유도한 동물 모델에서 유래하는 세포인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0116] 상기 동물 모델이, 마이너스 렌즈를 장용시켜 근시를 유도한 동물 모델, 또는, 근시 유도제를 투여하는 것에 의해 근시 유도한 동물 모델인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0117] 상기 마이너스 렌즈가, -20~-40디옵터(D)의 렌즈인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0118] 상기 마이너스 렌즈의 장용 기간이, 적어도 1주간인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0119] 상기 근시 유도제가, 튜니카마이신, 및/또는, 탐시가르긴을 포함하는, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0120] 상기 튜니카마이신의 점안 투여의 경우의 농도가, 10~100 μg/mL인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0121] 상기 탐시가르긴의 점안 투여의 경우의 농도가, 1~100 μM인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0122] 상기 동물 모델이, 이유 시기에 마이너스 렌즈를 장용 개시하는 것인, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0123] 상기 안 유래의 세포에 후보 물질을 접촉시키는 공정이, 상기 후보 물질을 경구, 복강내 주사 또는 점안에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0124] 후보 물질에 의한 PERK 및/또는 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 발현이 억제되어 있는 경우, 당해 후보 물질을 강막 비박화 치료제로서 선택하는 것을 포함하는, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0125] 후보 물질에 의한 PERK 및 ATF6의 시그널 전달계의 단백질, 및/또는, 유전자의 발현이 억제되어 있는 경우, 당해 후보 물질을 강막 비박화 치료제로서 선택하는 것을 포함하는, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0126] 후보 물질에 의한 강막에 있어서의 콜라겐 관련 단백질, 및/또는, 유전자의 발현이 정상화되어 있는 경우, 당해 후보 물질을 강막 비박화 치료제로서 선택하는 것을 포함하는, 상기에 기재된 스크리닝 방법;
- [0127] 상기 콜라겐 관련 단백질, 및/또는, 유전자가, COL1A1, COL4A3, COL8A2, COL11A2, 및 COL15A1로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인, 상기에 기재된 스크리닝 방법.

[0128] **실시예**

[0129] 이하에 실험 결과를 들어 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0130] [실험 방법]

[0131] 본 실험에 있어서의 모든 동물 실험은, 게이오기주쿠 대학 동물 실험 위원회의 승인을 받고, 게이오기주쿠 대학 동물 실험에 관한 시설 가이드라인, 안과·시각 연구에 있어서의 동물의 사용에 관한 ARVO 성명, 동물 연구: 연구에 있어서의 동물의 사용에 관한 in vivo 실험의 보고(ARRIVE) 가이드라인을 준수했다.

[0132] (근시 유도 마우스의 특징)

[0133] 비특허문헌 3에 기재되어 있는 바와 같이, 인간의 눈은 출생 직후는 원시이며, 그 후에 안축이 신장(즉 근시화)되어, 학동기(8세경)에 정시화(正視化)된다. 또한, 마우스(C57BL6)의 3 내지 6주령의 기간도 성장에 수반하여 안축이 신장되고 있어, 이 근시 유도 기간의 3~6주령은, 근시 진행의 동태라고 하는 점에서 인간의 소아에

상당하고, 근시 유도 기간 종료 후는 실질 성인기에 상당한다. 이 동물 모델을 이용함으로써, 인간 성인의 근시 진행(강막 비박화)에 있어서의 메커니즘 해명과, 강막 비박화 치료제 또는 그 수반 안 질환 치료제의 스크리닝이 가능하다.

[0134] 마이너스 렌즈를 장용시켜 축성 근시가 유도되는 기구를 도 1(a)에 모식적으로 나타냈다. 정시(正視)는 눈에 들어오는 평행 광선이 망막 상에서 상을 맺으므로, 상이 뚜렷하게 보이는 상태를 말한다. 한편, 축성 근시는, 안축 길이가 길어져 있기 때문에 눈에 들어오는 평행 광선이 망막의 앞에서 상을 맺기 때문에, 뚜렷하게 보이지 않는 상태를 말한다. 인간을 포함하여 동물의 눈은 성장과 함께 커진다. 유약(幼若)한 마우스에게 마이너스 렌즈를 장용시키면, 마이너스 렌즈를 장용하고 있을 때 상을 맺는 위치, 즉 마이너스 렌즈 장용 시에는 뚜렷하게 보이는 상태까지 안축이 신장된다. 그 결과, 안축이 신장되어, 축성 근시와 마찬가지로의 눈 상태를 만들어 낼 수 있다.

[0135] (근시 유도 마우스의 제작)

[0136] 구체적으로는 이하와 같이 하여 근시 유도 마우스를 제작한다. 한편, 근시 유도, 안축 길이 및 굴절의 계측은 비특허문헌 6, 7과 마찬가지로의 방법으로 행했다. 우선, 웅성 C57BL6J 마우스를, 12시간의 명암 사이클하에서 온도 제어 클린룸에서 표준 투명 케이지에 수용했다. 동물에는, 표준 사료와 고압 증기 멸균한 수돗물을 자유 섭취시켰다. 이유 직후의 3주령의 마우스를 도미토르(닛폰 젠야쿠 공업주식회사), 베토르팔(Meiji Seika 파르마주식회사), 미다줄람(산도 주식회사)의 3종 혼합 마취로 마취하고, 가위로 두개를 노출시킨다. 도 1(b)에 나타내는 바와 같이, 두개에 지주를 입설하고, 치과용 시멘트(Super-Bond, 산메디칼 주식회사)로 고정한다. 지주는, 후술하는 조절 기구를 너트로 고정할 수 있도록 나사산이 마련되어 있다.

[0137] 근시를 유도하기 위해서 -30디옵터(diopter, D)의 마이너스 렌즈(레인보우 콘택트, 주식회사 레인보우 옵티컬 연구소)를 우안(근시 유도안)에, 컨트롤로서 OD의 렌즈, 또는 프레임만을 좌안(컨트롤안)에 장착시킨다. 렌즈는 마우스에 장착시켰을 때에, 마우스가 앞다리 등에 의해 흠집을 내지 않도록, 렌즈 하부의 프레임부에 측방으로 돌출된 형상의 프로텍터가 접촉되어 있다. 프로텍터에 의해, 마우스는 렌즈를 건드릴 수 없어, 렌즈에 흠집이 나지 않는다. 프로텍터는 여기에서는 프레임부에 접촉하여 일체가 된 것을 사용하고 있지만, 마우스의 행동에 의해 렌즈에 흠집이 나지 않으면 되고, 렌즈와 일체가 되어 있을 필요는 없다. 예를 들어, 외상을 입은 동물이 장용하는 엘리자베스 칼라와 같은 형상의 것이어도 된다.

[0138] 렌즈 상방의 프레임부에는, 마우스의 성장에 맞추어, 장착한 렌즈의 폭이나 각도를 조절하기 위한 조절 기구가 접촉되어 있다. 조절 기구는 「<」자 형상으로 절곡되어 있고, 한쪽은 렌즈가 접촉되어 있고, 다른 쪽은 두부에 입설된 지주에 장착할 수 있도록 긴 구멍이 마련되어 있다. 긴 구멍을 지주에 통과시키고, 너트로 나사 고정하는 것에 의해 마우스의 두 눈의 주연(周緣)을 압박하지 않고, 피부에 밀착시켜 고정할 수 있다. 지주, 너트, 조절 기구의 3점으로 이루어지는 조절 기구에 의해, 마우스의 성장에 맞추어 폭, 각도를 조절하여, 마우스의 눈의 위치에 렌즈가 오도록 조정할 수 있다. 또한, 렌즈의 제거가 가능하므로, 안축 길이, 굴절치의 경시적인 변화를 계측하는 것이 가능하다.

[0139] (안축 신장과 굴절의 계측)

[0140] 컨트롤안은 프레임만, 근시 유도안은 -30D 렌즈를 3주간 장용시키고, 굴절치, 안축 길이를 측정하여, 장용 전후의 차를 구했다. 굴절치는 굴절계(Infrared photorefractor for mice, Tubingen 대학 Schaeffel 교수 제작), 안축 길이는 SD-OCT(Spectral-domain OCT, 스펙트럴 도메인 광 간섭 단층 촬영, Envisu R4310, bioptigen Inc.)에 의해 계측했다.

[0141] (강막 시료의 조제)

[0142] 실험적 개입과 안 파라미터 측정 후, 안구를 C57BL6J 마우스로부터 적출했다. 투과형 전자 현미경 관찰을 위해서, 마우스의 안구를 병행한 2.5% 글루타르알데하이드의 PBS 중에서 1시간 고정하고, 시상면을 따라 절단했다. 각막과 수정체를 적출하고, 나머지의 조직을 추가로 2.5% 글루타르알데하이드/60mM HEPES 완충액(pH 7.4)에서 하룻밤 고정했다. 표본을 60mM HEPES 완충액으로 세정하고, 1% 테트록사이드 오스튬/60mM HEPES 완충액으로 2시간 4℃에서 인큐베이트하고, 에탄올 시리즈를 통과시켜 탈수하고, 교환하고, Epon 812(EM Japan, 도쿄, 일본)에 포매(包埋)했다. 포매 후, 블록을 70nm로 박절하고, 아세트산 우라닐과 시트르산 납으로 염색했다. 구분을 JEM-1400Plus(JEOL Ltd., 도쿄, 일본)로 가시화했다.

[0143] 동결 절편(마우스)을 조제하기 위해서, 안구를 OCT 화합물(Sakura Finetek, 도쿄, 일본)로 동결했다. 냉동 블록은, 크라이오스택(CM3050S; 라이카·바이오 시스템즈, 베를린, 독일)을 이용하여 5μm의 두께로 절단했다. 절

편은 사용까지 -80℃에서 보존했다.

- [0144] 파라핀 절편(마우스)의 제작에는, 4% 파라폼알데하이드에서 안구를 하룻밤 고정하고, 파라핀에 포매하고, 마이 크로톰(REM-710, YamatoKohki, 사이타마, 일본)에 의해 3 μm 절편으로 슬라이스했다. 다음에, 절편을 헤마톡실 린과 에오신으로 염색하고, BX53 현미경(Olympus, 도쿄, 일본)을 이용하여 가시화했다. 강막 두께는, cellSens 소프트웨어(Olympus)를 이용하여 측정했다.
- [0145] (피험약의 조제)
- [0146] 페닐뷰티르산 나트륨(Cayman Chemical, MI, USA) 및 타우로우르소테옥시콜산(시그마·알드리치, 도쿄, 일본)은, PBS에 용해했다. IRE1 저해제인 STF080310(셀렉·바이오테크, 도쿄, 일본) 또는 4 μ8C(셀렉·바이오테크), PERK 저해제인 GSK2656157(셀렉·바이오테크) 또는 GSK2606414(셀렉·바이오테크), ATF6 저해제인 넬피나비르 메시스 테레이트 하이드레이트(도쿄 화학공업, 도쿄, 일본) 또는 Ceapin-A7(시그마·알드리치)은, DMSO로 용해하고, 1:1000으로 PBS에 의해 희석하여 점안 시험에 이용했다.
- [0147] (UPR 저해제의 근시 유도 중의 점안)
- [0148] 60 μM의 STF080312(STF), 100 μM의 4 μ8C(4 μ8C), 100 μM의 GSK2656157(GSK), 100 μM의 GSK2606414(GSK2606414), 100 μM의 넬피나비르 메시스테레이트 하이드레이트(NFV), 100 μM의 Ceapin-A7(Ceapin)을, 근시 유도 중에, 10일간, 매일, 1일 1회, 저녁, 양 눈에 점안했다.
- [0149] (복강내 주사)
- [0150] 페닐뷰티르산 나트륨 PBS 용액(4-PBA; 200mg/kg 체중) 또는 타우로우르소테옥시콜산(TUDCA; 100mg/kg 체중)을, 근시 유도 기간을 통하여, 매일 복강내 주사(i.p.)했다.
- [0151] (페닐뷰티르산 나트륨의 근시 유도 기간 종료 후의 점안)
- [0152] 2%의 페닐뷰티르산 나트륨의 PBS 용액(4-PBA)을, 근시 유도 마우스에 있어서, 인간 성인기에 상당하는 근시 유 도 기간이 종료된 후에, 10일간, 매일, 1일 1회, 저녁, 양 눈에 점안했다. 한편, 근시 유도 기간(LIM)과 그 기 간 종료 후의 투여 스케줄을 도 11에 모식적으로 나타냈다.
- [0153] (웨스턴 블롯법에서의 농도 측정 분석)
- [0154] 강막의 단백질(10 μg/젤)은, SDS-PAGE에 의해 분리되어, PVDF막(미국 MA주, Merck Millipore)에 옮겨지고, Blocking One(도쿄, Nacalai Tesque)로 블록되고, 항ATF6(바이오아카데미 주식회사), 인산화-IRE1(Ser724, Abcam, Cambridge, UL), IRE1, 인산화-eIF2 α, eIF2 α, 및 β-액틴(Cell Signaling Technologies Japan, 도쿄, 일본) 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이트되었다. 막을 적절한 HRP 결합 2차 항체와 인큐베이트하고, EzWestLumi plus(ATTA, 도쿄 일본)를 이용하여 가시화했다. SDS-PAGE는 10% 아크릴아마이드 겔에서 단백 사이즈 마커(MagicMark XP Western Protein Standard, ThermoFisher Scientific)를 이용하여 행했다. ImageJ 소프트웨 어를 이용하여 농도 측정 분석을 행했다.
- [0155] (정량적 PCR)
- [0156] 정량적 real-time PCR은, StepOnePlus 리얼타임 PCR 시스템을 이용하여 PowerUp SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems, CA, USA)로 행했다. 발현 레벨은, β-액틴에 의해 표준화했다.
- [0157] (통계 해석)
- [0158] 실험에서 얻은 데이터는, 모두 평균치±표준 편차로 나타낸다. 군간차는, Student의 t 검정 또는 일원 배치 분 산 분석 또는 일반화 추정 방정식에 의해 해석했다. ANOVA가 유의차를 나타냈을 경우, 다음에 Tukey HSD를 행하 여, 각 평균치간의 차의 유의성을 판정했다. p치가 0.05 미만인 경우는, 통계학적 유의차를 나타낸다.
- [0159] [실험 결과]
- [0160] <시험예 1 근시 유도 마우스의 근시 유도 후의 강막의 비박화>
- [0161] 강도 근시에 있어서, 안구 형상을 유지하고 있는 강막의 비박화가, 안구 변형의 초기 증상이라고 말해지고 있다 (비특허문헌 4를 참조). 그래서, 근시 유도 마우스의 강막에서도 비박화가 발생하고 있음을 확인하기 위해서, 근시 유도 후의 강막의 조직학적 평가를 실시했다.
- [0162] 상기의 시험 방법에 따라, 근시 유도 마우스에 있어서 근시 유도한 후의 안축 신장과 굴절 변화를 평가했다(도

2). 또한, 근시 유도 후의 안구를 적출하고, 헤마톡실린과 에오신 염색하여 강막 두께를 관찰했다(도 3a, b). 또한, 염색 조직에 있어서 신경 유두(disk)로부터의 거리별의 강막 두께를 그래프화했다(도 3c).

[0163] 그 결과, 컨트롤안에 대해서 근시 유도안은 강막의 거의 전체 둘레에 걸쳐서 유의하게 비박화되고 있었다(도 3c). 이들 결과에 있는 바와 같이, 근시에 의해 안축이 병적으로 신장되면, 강막이 비박화되어, 다양한 후안부 질환의 원인이 될 수 있는 안구의 변형의 초기 증상을 나타냄이 확인되었다.

[0164] <시험예 2 근시 유도 마우스의 UPR 유전자의 억제에 의한 안축 신장>

[0165] 강도 근시에 있어서, UPR 유전자 경로 발현 향진이 병적 안축 신장 및 강막 비박화의 원인이라고 말해지고 있다(특허문헌 1). 그래서, 이 시험예 2에서는, 강막 비박화가 생긴 근시 유도 마우스의 강막에 있어서, UPR 유전자의 기저 저해제에 의해 안축 신장이라고 하는 표현형이 어떻게 영향을 받는지를 평가했다. 한편, PERK 저해제로서 GSK2656157(GSK), GSK2606414, ATF6 저해제로서 벨피나비르 메시스테레이트 하이드레이트(NFV), Ceapin-A7, IRE1 저해제로서 STF080312(STF), 4 μ 8C를 이용했다(도 4).

[0166] 전문한 시험 방법에 따라, 근시 유도 마우스에 있어서 각종 유전자 저해제에 의한 안축 신장을 평가했다(도 4).

[0167] 도 5a, b에, 마우스의 근시 유도 기간에 60 μ M의 STF, 100 μ M의 GSK, 100 μ M의 NFV를, 10일간·매일 1회 점안한 후의 안축 신장(a) 및 굴절 변화(b)를 나타냈다. 또한, 도 5-c, d에, 이들 저해제의 조합(STF+GSK: S+G, GSK+NFV: G+N, NFV+STF: N+S, STF+GSK+NTF: S+G+N)을, 마찬가지로 점안한 후의 안축 신장(c) 및 굴절 변화(d)를 나타냈다. 또한, 도 6에, 각각 100 μ M의 GSK2606414, Ceapin-A7, 4 μ 8C를, 마찬가지로 점안한 후의 안축 신장(a) 및 굴절 변화(b)를 나타냈다.

[0168] 그 결과, 근시 유도 마우스의 강막에 있어서, UPR 유전자인 PERK, ATF6, IRE1의 각각의 저해제의 단독 점안에 의해, 예상에 반해 안축 신장 억제도 굴절의 근시화의 억제도 인정되지 않았다(도 5a, b). 오히려, STF를 제외한 저해제 단독의 점안에 의해, 근시 유도하고 있지 않는 컨트롤안의 안축이 DMSO 점안과 비교하여 유의하게 신장되어 굴절이 근시화되고 있었다. 또한, 이들을 조합하여 점안하면, PERK 저해제와 ATF6 저해제의 적어도 2종이 존재할 때(G+N, S+G+N)만 안축 길이가 유의하게 억제되어, 굴절의 근시화가 억제되고, 단독 점안에서 인정된 컨트롤안의 안축 신장도 인정되지 않았다(도 5c, d). 더욱이, 도 5와는 상이한 저해제 GSK2606414, Ceapin-A7, 4 μ 8C의 단독 점안에 의한 안축 길이 및 굴절의 변화는, 도 5의 결과와 완전히 마찬가지로, 안축 신장도 굴절 근시화도 억제되지 않고, 4 μ 8C 이외의 단독 점안에서는 컨트롤안의 안축까지 신장되고 있었다(도 6).

[0169] 이들 결과로부터, UPR 유전자 중, 적어도 PERK와 ATF6을 양쪽 모두 억제했을 경우에 안축 신장이 억제되어, 굴절의 근시화가 억제됨이 확인되었다. PERK 단독, ATF6 단독, PERK와 IRE1, ATF6과 IRE1의 억제에서는, 병적인 안축 신장을 가져옴이 확인되었다. 이것은, PERK 경로와 ATF6 경로의 억제가 안축 신장 억제에는 중요하지만, 어느 한쪽만의 억제로는, 다른 한쪽이 대상으로 향진하여 도탈로는 안축 신장 억제할 수 없는 것이라고 생각되어, PERK 경로와 ATF6 경로의 양쪽 모두의 억제가 강막 비박화의 억제에 필수라고 생각되었다. 더 말하면, 강막 비박화 치료제를 탐색하려면, 적어도 PERK 경로와 ATF6 경로를 양쪽 모두 억제할 수 있는 성분을 탐색할 필요가 있음이 새롭게 발견되었다. 더욱이, 상이한 저해제를 이용해도 동일한 결과가 되므로, 강막 비박화의 억제에 PERK 경로와 ATF6 경로의 동시 저해가 유효하다는 것은, 특정의 저해제로 한정되는 것은 아니고, 보편적인 메커니즘이라고 말할 수 있다.

[0170] <시험예 3 근시 유도 마우스의 강막에 있어서의 4-PBA의 UPR 유전자 발현 억제 효과>

[0171] 시험예 2에 있어서, 강막 비박화 치료제 탐색에는, 적어도 PERK 경로와 ATF6 경로를 양쪽 모두 억제하는 성분을 탐색할 필요가 있음이 확인되었으므로, 이 시험예 3에서는, 이미 안축 신장을 억제함이 알려져 있는 성분(페닐뷰티르산 나트륨{4-PBA}, 타우로우르소데옥시콜산{TUDCA})에 대해, UPR 유전자의 억제 프로파일을 평가했다.

[0172] 도 7에, 4-PBA를 마우스의 근시 유도 기간을 통하여 매일 복강내 주사한 후의 유전자 발현 변화를 나타냈다. 도 8에, 마찬가지로 4-PBA 투여에 의한 근시 유도 1주째와 3주째의 안축 신장(a)과 굴절 변화(b)를 나타냈다. 또한, 도 9에, 마찬가지로 TUDCA 투여에 의한 근시 유도 1주째와 3주째의 안축 신장(b)과 굴절 변화(a)를 나타냈다.

[0173] 그 결과, 근시 유도 마우스에 있어서 향진하고 있던 PERK 경로와 ATF6 경로의 하류(도 4)에 있는 유전자 발현이, 2% 4-PBA 점안에 의해 유의하게 억제되었다(도 7). 또한, 2% 4-PBA 점안 1주째와 3주째의 안축 신장은 동일한 정도로 유의하게 억제되고, 굴절의 근시화도 또한 동일한 정도로 유의하게 억제되었다. 또한 동시에 근

시 유도되지 않았던 컨트롤안의 안축 신장(생리적 안축 신장)까지는 억제하지 않고, 근시 유도안의 병적 안축 신장만을 억제했다(도 8). 또한 마찬가지로, UPR 유전자 억제제로서 알려져 있는 TUDCA의 투여에서도 4-PBA와 마찬가지로 생리적 안축 신장은 억제하지 않고, 병적 안축 신장만을 억제했다(도 9).

- [0174] 이들 결과로부터, 4-PBA나 TUDCA는 UPR 유전자 경로에 있어서, 강막 비박화의 메커니즘인 PERK 경로와 ATF6 경로를 억제함으로써, 병적 안축 신장만을 억제함이 확인되었다. 즉, 4-PBA, TUDCA, PERK 저해제와 ATF6 저해제의 조합과 같이 적어도 PERK와 ATF6의 양쪽 모두를 억제하는 성분은, 강막 비박화 및 수반 후안부 질환을 치료할 수 있음이 시사되었다.
- [0175] <시험예 4 근시 유도 마우스의 강막에 있어서의 4-PBA의 콜라겐 섬유 협세화 억제 효과>
- [0176] 강막은 콜라겐을 주로 한 조직이며, 강막 비박화에는 콜라겐 섬유의 협세화가 관여하고 있다고 말해지고 있다(비특허문헌 5를 참조). 그래서, 이 시험예 4에서는, PBS를 마우스의 근시 유도 기간을 통하여 매일 복강내 주사한 바, 근시 유도안의 강막에 있어서 콜라겐 섬유의 협세화가 인정되었지만, 4-PBA를 마찬가지로 투여한 바, 이 강막에 있어서의 콜라겐 섬유의 협세화가 억제되고 원래의 굵기로 돌아오고 있었다(도 10a). 그리고, 그들 콜라겐 섬유의 굵기별의 단면적을 계산한 바, 단면적 $8000 \mu\text{m}^2$ 이하의 가는 콜라겐 섬유의 총면적이 근시화에 의해 증가하고 있었(PBS의 -30D에서 가는 섬유가 많다)지만, 2% 4-PBA 점안에 의해 그 면적 프로파일도 원래로 돌아가고 있었다(도 10b).
- [0177] 이들 결과로부터, 근시에 의해 안축이 병적으로 신장되는 것에 의해 강막이 비박화됨이 확인되었다. 그리고, 4-PBA 투여는 이 강막 비박화를 없애는 효과를 가짐이 확인되었다.
- [0178] <시험예 5 근시 유도 마우스의 강막에 있어서의 근시 유도 후의 4-PBA의 병적 안축 신장 억제 효과>
- [0179] 특허문헌 1에 있는 바와 같은 소아의 근시 진행을 시뮬레이트한 마우스 모델에 있어서의 근시 유도 기간(3주령~6주령)의 점안과는 달리, 근시 유도 기간이 종료된 후(6주령~8주령), 즉 강막 비박화에 의해 후안부 장애가 야기되는 인간에서 말하는 성인기에 상당하는 기간(도 11)에 있어서의 안축 신장을 4-PBA 점안이 억제하는지 여부를 평가했다.
- [0180] 근시 유도가 종료된 후, 2% 4-PBA를 매일 점안하여, 1주째와 3주째의 안축 신장 억제를 도 12a에 나타내고, 굴절 변화를 도 12b에 나타냈다.
- [0181] 그 결과, 근시 유도 종료 후의 3주간에서도 계속하여 안축은 신장되고 있어, 이른바 성인기의 안축 신장을 2% 4-PBA 점안이 억제하는 경향이 인정되었다(도 12a). 또한, 굴절도 근시 유도 종료 후에 근시화되고 있어, 마찬가지로, 2% 4-PBA 점안이 억제하는 경향이 인정되었다(도 12b).
- [0182] 이들 결과로부터, 소아의 근시 진행이 종료된 후의 성인기에 있어서도 근시의 진행이 잔여하고 있어, 2% 4-PBA는 이 과도한 안축 신장을 억제하여, 강막 비박화 및 수반 후안부 질환을 치료할 수 있음이 시사되었다.
- [0183] 시험예 1~5의 결과로부터, 근시 유도 마우스 모델에 있어서, 안구의 변형의 원인이 되는 강막 비박화가 야기되고 있음이 확인되고, 그것은 강막에 있어서의 콜라겐 섬유의 협세화에 의한 것임이 확인되었다. 또한, 이들의 메커니즘에는, UPR 유전자군이 관여하고 있어, 강막 비박화를 억제하기 위해서는, UPR 유전자 중에서도 PERK 경로와 ATF6 경로를 동시에 억제하는 것이 중요하다고 생각되었다. 이들 결과는, 근시 유도 마우스 모델이 강막 비박화 및 수반 후안부 질환의 치료제 탐색을 위해서 유용한 시험계임을 나타내고 있다.
- [0184] 또한, 강막 비박화를 야기하는 병적 안축 신장은, 소아의 근시 진행 후의 성인기에 상당하는 기간에서도 계속됨이 확인되고, 이것이 강막 비박화 및 그 수반 후안부 질환의 메커니즘이라고 생각되었다. 4-PBA는, 소아의 근시 진행뿐만 아니라, 성인기의 병적 안축 신장도 억제함이 확인되고, 또한 그 뿐만 아니라, 근시 유도에 의해 야기되는 콜라겐 섬유의 협세화를 원래로 되돌리는 효과도 가짐이 확인되었다. 이들 결과는, 4-PBA가 강막 비박화 및 그 수반 후안부 질환의 치료제로서 유용함을 나타내고 있다.
- [0185] <시험예 6 4-PBA의 약물 동태>
- [0186] 4-PBA의 전신 투여에 의한, 안 조직에서의 약물 동태를 확인했다. 구체적인 시험 방법은 이하와 같다.
- [0187] 4-PBA(200mg/kg 체중)를 1주간, 복강내 투여했다. 마지막 투여로부터 1시간 후, 안구를 적출하고, 각 조직을 분리했다. 16마리의 마우스(32안)로부터의 조직을 폴딩하여 하나의 샘플로 하고, 측정까지 액체 질소로 동결 보존했다. LC-MS/MS에 의한 측정 전에, 9배의 중량의 메탄올/물(1:1, v/v)을 첨가하여 균질화하고, 원심분리

(10000xg, 4℃, 5분)하여, 상청을 분석에 사용했다.

[0188] 한편, 표준 시약으로서 4-페닐뷰티르산(도쿄 화학공업 주식회사), LC-MS/MS(LC-20AD 시스템: 주식회사 시마즈 제작소, API4000: SCIEX, 도쿄, 일본), HPLC 칼럼, Atlantis dc18(5μm, 2.1mmID×150mm, Waters)을 사용했다. 이동상은 폼산/물(1:10000, v/v)과 아세트나이트릴을 이용하고, 분석 중, 각 이동상의 그라디언트는 50%로 유지했다. 샘플 주입량은 10 μL, 칼럼 온도는 50℃, 유속은 0.2mL/min으로 했다.

[0189] 또한, 질량 분석(MS) 조건으로서는, 네거티브 모드의 일렉트로스프레이 이온화(ESI)를 이용하고, 이온은 다양한 리액션 모니터링(MRM)에 의해 측정했다. 결과를 표 1에 나타낸다.

표 1

Sample	투여 후의 시간	4-PBA농도 (mg/g 또는 ng/mL)				혈장
		망막(우)	맥락막	강막	혈장	
4-PBA	1	검출 한계 이하	검출 한계 이하	검출 한계 이하	검출 한계 이하	
	2	15분	349	348	203	394
	3	30분	88.2	117	107	186
	4	60분	27.9	76.7	44.9	76.2

[0190]

[0191] 표 1에 나타내는 바와 같이, 4-PBA의 복강내 투여에 의해, 망막이나 맥락막뿐만 아니라 강막에 있어서도 4-PBA가 검출되었다.

[0192] <시험예 7-1 주요한 콜라겐 성분예의 영향 in vivo>

[0193] 근시 유도 마우스 모델에게 4-PBA를 점안 투여하고, 안구 형상 유지의 주요 콜라겐인 콜라겐 1A1(COL1A1) 등에의 영향을 확인했다. 구체적인 시험 방법은 이하와 같다.

[0194] 근시 유도한 마우스에게, PBS(Veh), 혹은, 2% 4-PBA를 점안하고, 그 강막(n=7)에 있어서의 콜라겐 1A1를 웨스턴 블로팅법으로, 콜라겐 관련 mRNA 발현을 정량적 PCR로 평가했다.

[0195] 결과를 도 13에 나타낸다. 도 13(A) 및 도 13(B)에 나타내는 바와 같이, 근시 유도안의 강막에 있어서 콜라겐 1A1(COL1A1) 단백질 및 mRNA는 감소했다. 한편으로, 4-PBA를 점안 투여했을 경우, 근시에 의해 유도된 콜라겐 1A1 단백질 및 mRNA의 감소를 캔슬할 수 있음이 발견되었다. 또한, 마찬가지로 Col4a3, Col8a2, Col11a2, 및 Col15a1의 mRNA에 대해서도 평가한 바, 이들 유전자는 근시 유도에 의해 발현 항진하고, 4-PBA의 점안 투여에 의해 그 항진이 캔슬되었다(도 13(C)). 이들 결과는, 4-PBA의 점안 투여가, 근시에 의해 야기되는 콜라겐 단백질 발현 이상을 정상화함으로써 강막 비박화를 억제하여, 그 수반 후안부 질환의 치료제·예방제가 될 수 있음을 나타내고 있다.

[0196] <시험예 7-2 주요한 콜라겐 성분예의 영향 in vitro>

[0197] 근시 유도와 같은 UPR 경로를 활성화할 수 있는 튜니카마이신으로 처리한 초대 인간 강막 섬유아세포에 있어서, UPR 각 경로 특이적인 저해제를 투여하여, 시험예 7-1에 있어서 근시 유도로 발현이 감소하는 콜라겐 1A1(COL1A1) 등에의 영향을 확인했다. 구체적인 시험 방법은 이하와 같다.

[0198] 초대 인간 강막 섬유아세포(huScF)(Lifeline Cell Technology, USA)를 FibroLifeS2 섬유아세포 배지(Lifeline Cell Technology)에서 증식시켰다. 이 세포를 튜니카마이신 200ng/mL로 6시간 처리한 후, DMSO, 혹은 UPR 유전자 저해제로서 STF(IER1 저해제), GSK(PERK 저해제), NFV(ATF6 저해제)를 투여하고, 단백질을 수집하여, 웨스턴 블로팅을 행했다.

[0199] 결과를 도 13에 나타낸다. 도 13(D) 및 도 13(E)에 나타내는 바와 같이, 튜니카마이신 처리에 의해, 콜라겐 1A1(COL1A1) 단백질 및 mRNA는 감소했다. 또한, Col4a3, Col8a2, Col11a2, 및 Col15a1의 mRNA는 튜니카마이신 처리에 의해 발현 항진했다. 이 결과는, 시험예 7-2의 근시 유도안의 강막 조직에서의 발현 프로파일과 일치하고 있었다. 또한, GSK와 NFV의 2성분을 투여(PERK와 ATF6을 저해)했을 경우, 튜니카마이신에 의해 유도된 콜라겐 1A1 단백질의 감소가 캔슬되어, 강한 콜라겐 발현 항진이 인정되었다. 이 결과는, 다음에 기술하는 시험예 8의 근시 유도 마우스에 있어서, GSK+NFV의 2성분을 투여했을 경우의 현저한 강막 비박화 억제의 결과와 일치하는 것으로, PERK 경로와 ATF6 경로의 동시 억제가 콜라겐 분비 정상화에 의한 강막 비박화 억제에 특히 유효함을 나타내고 있다.

[0200] <시험예 8 강막 비박화 및 그 수반 후안부 질환의 치료에 있어서의 ATF6 경로의 관여>

[0201] 강막 비박화 및 그 수반 후안부 질환의 치료에 있어서, PERK 경로와 ATF6 경로의 양 경로 중, ATF6 경로가 어느 정도 관여하고 있는지를 추가로 검토했다. 상기 [실험 방법]의 기재에 따라 웨스턴 블롯법으로의 농도 측정 분석을 행하여, ATF6의 활성화 form(ATF6-N)양, 및, ATF6의 precosor form(ATF6-P)양을 구했다. 근시 유도 유약(幼若) 마우스의 강막에 있어서의, PERK, ATF6, IRE1의 각각의 저해제의 단독 점안 방법, 또는, 저해제의 조합에 의한 점안 방법 등은, 시험예 2의 기재에 준한다.

[0202] ATF6의 활성화 form(ATF6-N)의 양을 ATF6의 precosor form(ATF6-P)의 양으로 나눈 값을 활성화의 지표로 하여, 도 14에 나타냈다.

[0203] 도 14에 나타내는 바와 같이, ATF6의 ATF6-N의 양을 ATF6의 ATF6-P의 양으로 나눈 값은 몇몇 군에서 유의하게 높은 값을 나타냈다. 높은 값을 나타낸 군은, 도 5c 및 도 5d에서 각각 나타난 병적 안축 신장 및 굴절치의 저하가 인정된 군과 일치하고 있었다. 즉, 근시 유도하고 있지 않는 눈(비LIM안)에 있어서 근시화(안축 신장 혹은 굴절치 저하)되고 있는 경우는, 반드시 ATF6이 활성화(ATF6-N의 ATF6-P에 대한 증가)되어 있고, 근시 유도안(LIM안)에 있어서 ATF6이 비활성화되어 있는 경우는, 근시화가 억제되고 있음이 나타났다. 이 상관 관계가, 도 5c-d와 도 14를 대비하는 것에 의해 나타나지만, 정리하면 하기 표 2와 같다. 표 2 중의 「STF」 또는 「S」는 IRE1 저해제를 나타내고, 「GSK」 또는 「G」는 PERK 저해제를 나타내고, 「NFV」 또는 「N」은 ATF6 저해제를 나타내고 있는 것은, 지금까지의 시험예와 마찬가지로이다. 표 2에 정리된 결과는, 근시안의 강막에 있어서 ATF6 경로의 활성화가 트리거가 되어 안축 신장에 수반하는 강막 비박화가 야기되는 것, 그 반대로, ATF6 경로의 비활화에 의해 안축 신장에 수반하는 강막 비박화가 억제되는 것을 나타내고 있다. 강막 비박화에 수반하는 후안부 질환의 치료에는, 이 약효·약리를 갖는 약제(4-PBA)가 유효하다.

표 2

저해제		비박화 (안축 신장)	비박화 (굴절치 저하)	ATF6-N/ATF6-P (ATF6 활성화)
단독	STF	컨트롤(DMSO)과 동등	컨트롤(DMSO)과 동등	컨트롤(DMSO)과 동등
	GSK	비LIM안에서도 안축 신장	비LIM안에서도 굴절치 저하	컨트롤(DMSO)과 동등
	NFV	비LIM안에서도 안축 신장	비LIM안에서도 굴절치 저하	비LIM안에서도 ATF6 활성화
2성분	S+G	비LIM안에서도 안축 신장	비LIM안에서도 굴절치 저하	비LIM안에서도 ATF6 활성화
	G+N	LIM안에서 신장 억제 <비박화 억제>	LIM안에서 저하 억제 <비박화 억제>	LIM안에서 상승 억제 <비박화 억제>
	N+S	비LIM안에서도 안축 신장	비LIM안에서도 굴절치 저하	비LIM안에서도 ATF6 활성화
3성분	S+G+N	LIM안에서 신장 억제 <비박화 억제>	LIM안에서 저하 억제 <비박화 억제>	-

[0204]

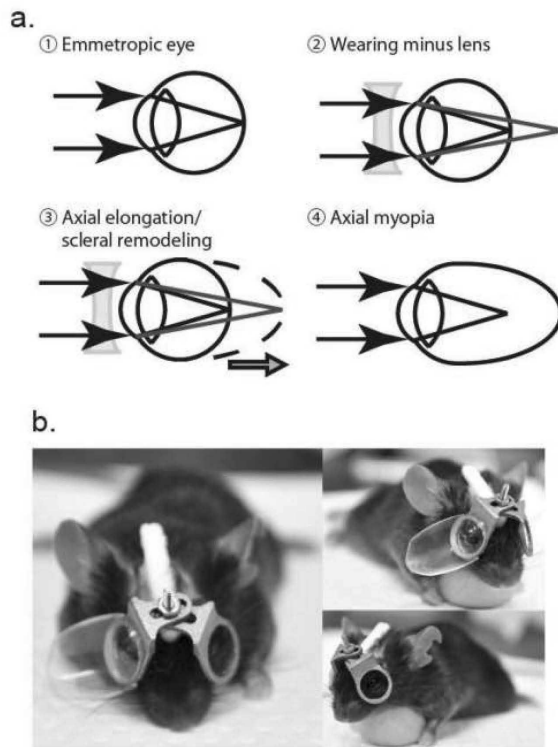
[0205] <시험예 9 근시 유도에 의한 수정체 비후에의 점안제 투여의 영향>

[0206] 근시 유도(LIM)에 의해, 수정체가 근소하게 두꺼워지는 경향이 확인되고 있다. 4-PBA의 투여 형태의 차이에 따라, 수정체의 변화에 영향이 있는지 여부를 검토했다. 상기 [실험 방법]의 기재에 따라, 근시 유도 유약 마우스에 4-PBA를 점안, 또는, 복강내 투여하고, 안축 길이의 측정과 마찬가지로, SD-OCT를 이용하여 수정체의 두께를 측정했다.

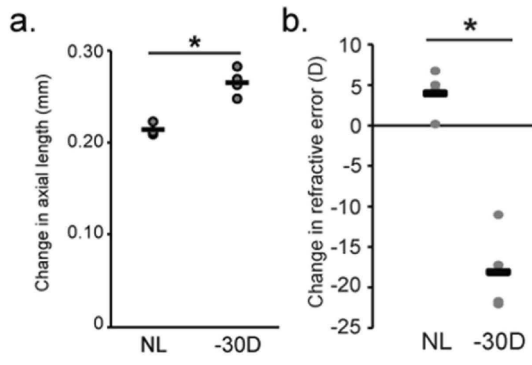
[0207] 도 15(A)에 나타내는 바와 같이, DMSO 점안 NL(=no lens)군과 비교하여, -30D 렌즈 장착군에서는, 근시 유도(LIM)에 의해, 수정체가 두꺼워짐이 확인되었다. 4-PBA를 복강내 투여했을 경우는, 수정체의 비후에 영향을 주지 않았다. 한편, 도 15(B)에 나타내는 바와 같이, 4-PBA를 점안으로 투여했을 경우는, -30D 렌즈 장착군에 있어서 수정체의 비후는 인정되지 않았다. 즉, 4-PBA의 투여 방법으로서, 타겟 조직에의 도달성의 관점에서 점안이 호적하다는 것이 나타났다.

도면

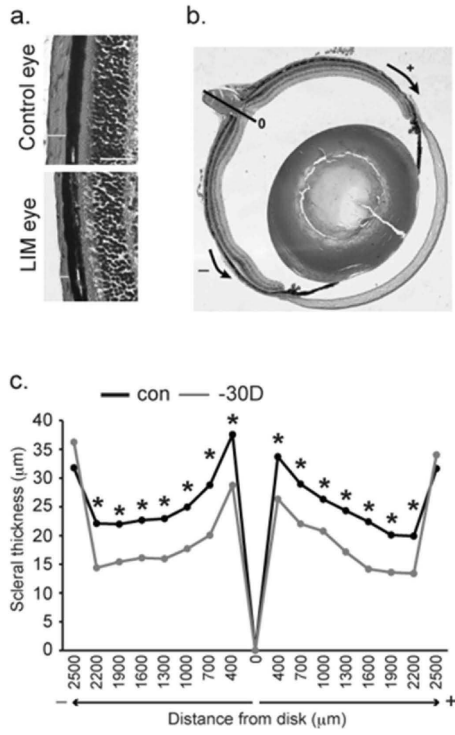
도면1



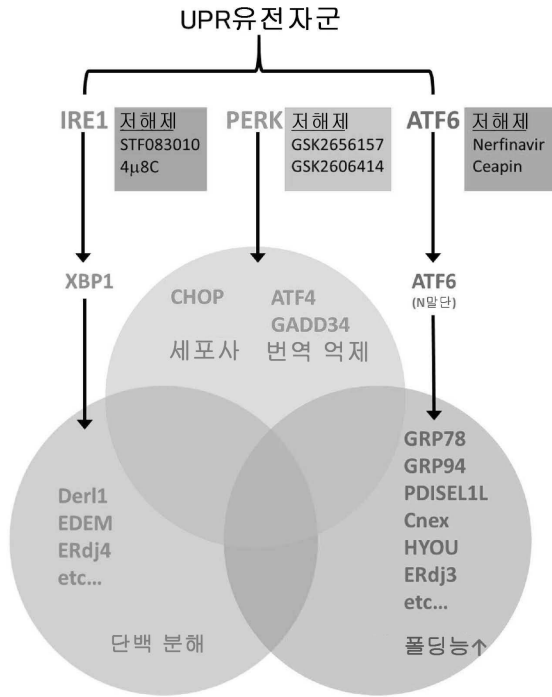
도면2



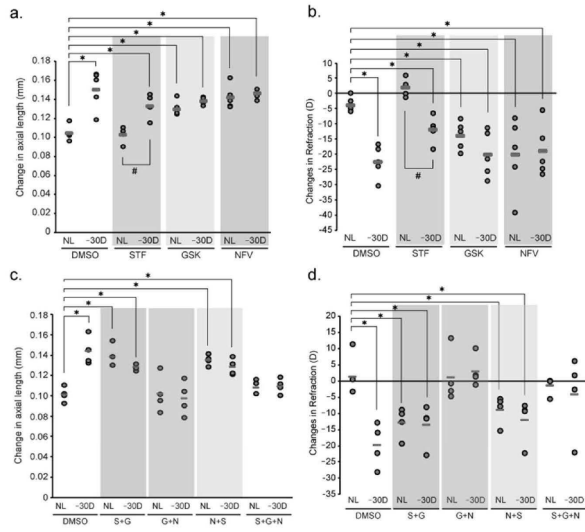
도면3



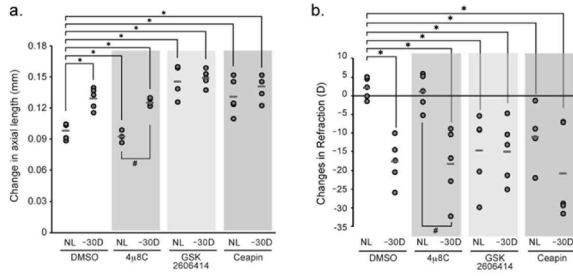
도면4



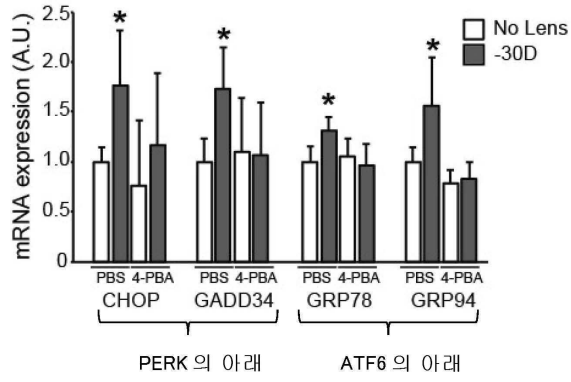
도면5



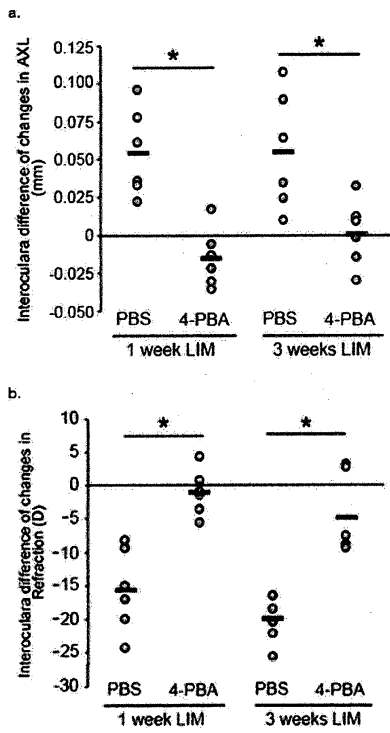
도면6



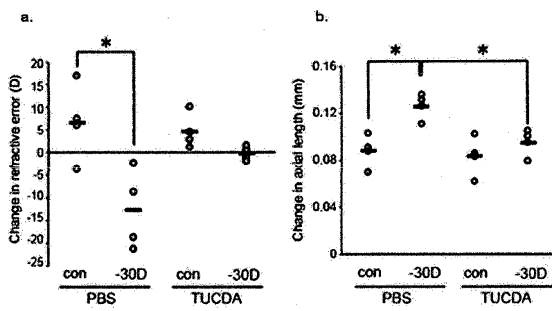
도면7



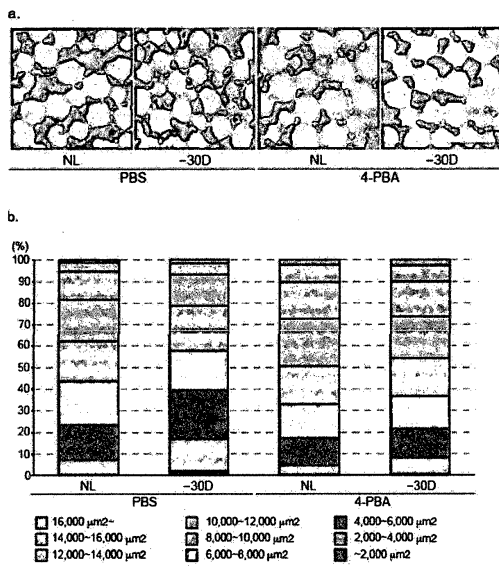
도면8



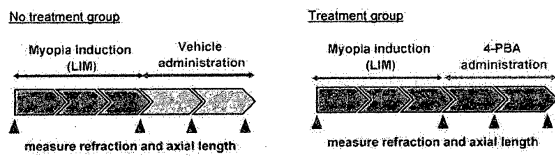
도면9



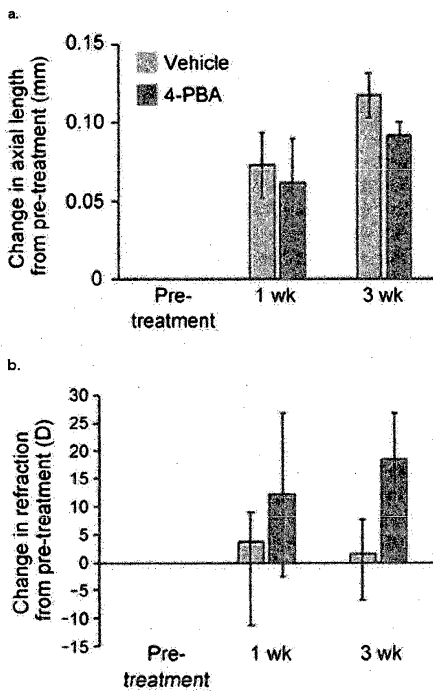
도면10



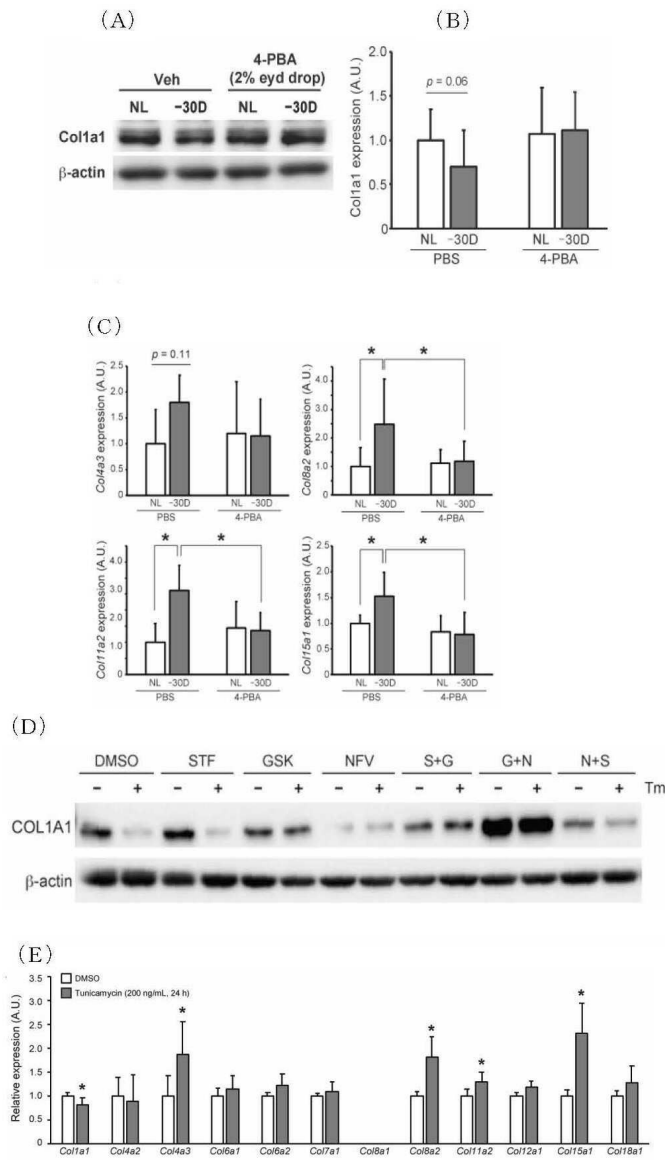
도면11



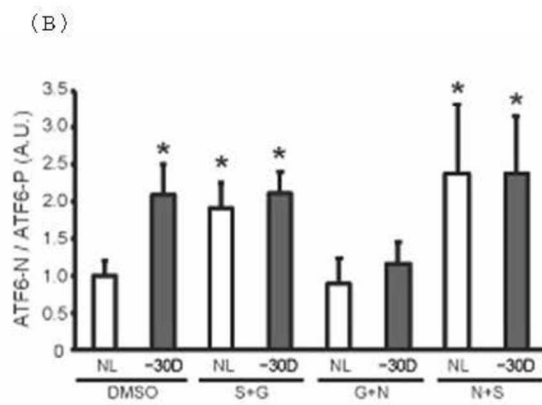
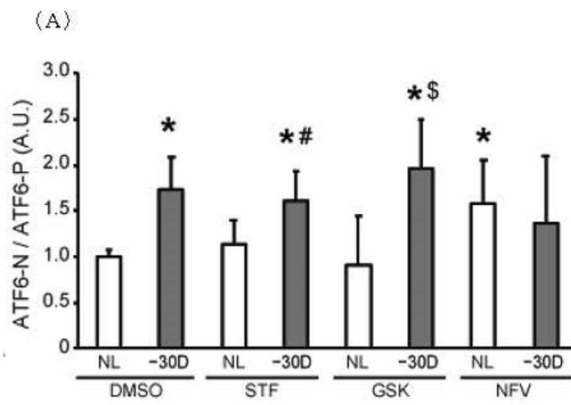
도면12



도면13



도면14



도면15

