

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 266**

51 Int. Cl.:

A61K 31/196 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2018** **PCT/JP2018/025122**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019** **WO19009265**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2018** **E 18827721 (4)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 3650045**

54 Título: **Fármaco para la enfermedad degenerativa de la retina asociada a la degeneración de los fotorreceptores**

30 Prioridad:

04.07.2017 JP 2017131087

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.00%)
3-5-1 Nihonbashi-honcho, Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

TSUJI, NAOKI y
UENO, MASUMI

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 999 266 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fármaco para la enfermedad degenerativa de la retina asociada a la degeneración de los fotorreceptores

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un fármaco terapéutico y/o preventivo para la retinosis pigmentaria, y además, un fármaco agonista del receptor de ácido retinoico útil como fármaco para la enfermedad degenerativa retiniana asociada con la degeneración de fotorreceptores, incluyendo la retinosis pigmentaria.

Antecedentes de la técnica

- 10 La retinosis pigmentaria es una enfermedad degenerativa progresiva de la retina que comienza por la degeneración y pérdida de células de bastón de las células fotorreceptoras. En la retinosis pigmentaria, se observa ceguera nocturna progresiva, constricción del campo visual y fotofobia debido a la degeneración de las células fotorreceptoras, con el resultado de que la visión disminuye, lo que conduce a la ceguera. La retinosis pigmentaria es una enfermedad hereditaria. El número de mutaciones genéticas causantes de la retinosis pigmentaria e identificadas hasta la fecha es de 3000 o más (Literatura no de Patente 1). De ellos, la mutación del gen de la rodopsina se produce con frecuencia, y se han encontrado 120 o más sitios de mutación
- 15 en humanos. Como resultado de la clasificación de las mutaciones del gen de la rodopsina, se propone que 11 mecanismos subyacen al procedimiento de pérdida de células de bastón (Literatura no de Patente 2). En estas circunstancias, es muy difícil acotar las moléculas diana para desarrollar un fármaco. Esto se considera un factor que dificulta el desarrollo de un fármaco terapéutico para la retinosis pigmentaria. Se ha deseado el desarrollo de un procedimiento terapéutico no dirigido directamente a un gen (Literatura no de Patente 3).

- 20 En la actualidad, no existe ningún fármaco terapéutico establecido para tratar la retinosis pigmentaria; sin embargo, basándose en numerosos experimentos con animales y ensayos clínicos en humanos, se han considerado las siguientes posibilidades terapéuticas para la retinosis pigmentaria (Literatura no de Patente 1):

- a) La mejora de la tasa de supervivencia de las células de bastón, aunque sea pequeña, conduce a la protección de las células de conos.
- 25 b) Las células de bastón, aunque tengan una función defectuosa, pueden favorecer la supervivencia de las células de conos.
- c) Si se puede mantener vivo un pequeño número de células de conos en la zona macular, es posible conservar un mínimo de vista suficiente para caminar por uno mismo.

- 30 Con el fin de proteger las células de bastón o las células de los conos basándose en los puntos de vista mencionados anteriormente, por ejemplo, un factor neurotrófico como el CNTF, el ácido valproico, la vitamina A y el ácido docosahexaenoico (DHA) se han sometido a ensayos clínicos; sin embargo, hasta ahora, no se ha informado de un efecto medicinal distinguible y ningún compuesto ha sido aprobado por la FDA.

- 35 Por otro lado, un tema que actualmente se estudia activamente en fases no clínicas y clínicas es la medicina regenerativa, que se proporciona mediante el trasplante de células madre o células de bastón obtenidas a partir de las células madre mediante diferenciación por inducción. Sin embargo, la medicina regenerativa tiene muchos problemas por resolver, tales como el rechazo inmunológico, la baja tasa de supervivencia de las células trasplantadas, la baja tasa de implantación y la bioseguridad (Literatura no de Patente 4).

- 40 Recientemente, como posibilidad para superar los problemas de la medicina regenerativa mediante trasplante, se ha considerado el ensamblaje de células madre endógenas mediante un agente medicinal. En cuanto a la regeneración de la retina por células madre endógenas, se ha confirmado, en los estudios de regeneración de la retina con pez cebra realizados hasta ahora, que la retina ablacionada se regenera. Basándose en esto, la posibilidad de regeneración de la retina en mamíferos adultos ha sido estudiada por muchos investigadores en los últimos años. A partir de estos estudios, se ha descubierto que las células de Mueller que tienen la naturaleza de células madre proliferan y migran a un sitio ablacionado en la retina ablacionada; sin embargo,
- 45 no se ha establecido en absoluto un procedimiento para inducir células de bastón suficientes en número y función a partir de células madre endógenas. Se trata de un gran problema por resolver (Literatura no de Patente 5).

- 50 En cuanto a las enfermedades degenerativas de la retina asociadas con la degeneración de los fotorreceptores, aparte de la retinosis pigmentaria, pueden mencionarse la degeneración macular asociada a la edad y la distrofia macular. Dado que la degeneración de las células fotorreceptoras, incluidas las células de bastón, subyace a estas enfermedades, se espera que estas enfermedades puedan tratarse y/o prevenirse mediante el suministro de células de bastón. De acuerdo con lo anterior, establecer un procedimiento para inducir un aumento de las células de bastón endógenas tiene una importancia extremadamente grande para proporcionar una terapia para estas enfermedades.

La degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad degenerativa de la retina asociada a la degeneración de los fotorreceptores. En la enfermedad, con el envejecimiento se produce una ablación en la mácula presente en el centro de la retina, con el resultado de que progresan los defectos de visión, que finalmente conducen a la pérdida de visión. La enfermedad se subdivide en dos tipos: atrófica y exudativa. En el tipo atrófico, el tejido macular se encoge y la retina es ablacionada, con el resultado de que, por ejemplo, el deterioro de la visión avanza gradualmente. Por el contrario, en el tipo exudativo, los vasos sanguíneos anormales (neovascularización coroidea) se desarrollan a partir de la coroides presente fuera de la retina para extirparla. Actualmente, no existe ningún tratamiento eficaz para el tipo atrófico. Para el tipo exudativo, existe un tratamiento farmacológico que utiliza un inhibidor de la angiogénesis y un procedimiento quirúrgico; sin embargo, no se puede conseguir una recuperación normal de la vista. Se desea desarrollar un tratamiento eficaz.

Como inhibidor de la angiogénesis para su uso en el tratamiento de la degeneración macular exudativa asociada a la edad, se conocen fármacos de anticuerpos (Literatura de Patente 1) y fármacos de ácidos nucleicos (Literatura de Patente 2). Además, se ha informado de que un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico (en lo que sigue denominado a veces "RAR") tiene una actividad inhibidora de la neovascularización coroidea en ratones (literatura no de Patente 6). Sin embargo, en esta bibliografía no se ha descrito el efecto de inducir un aumento de las células de bastón.

La distrofia macular es un grupo de enfermedades degenerativas de la retina asociadas a la degeneración de los fotorreceptores. En este grupo de enfermedades, la mácula está ablacionada por una causa hereditaria, con el resultado de que se produce un deterioro significativo de la visión y una anomalía del campo visual. La distrofia macular se subdivide, por ejemplo, en enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central. En la actualidad, no existen tratamientos eficaces.

Lista de citas

Literatura de Patente

Literatura de patente 1: Publicación internacional No. WO1998/045331

Literatura de patente 2: Publicación internacional No. WO1998/018480

Literatura no de Patente

Literatura no de Patente 1: Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective., Prog Retin Eye Res., 2015; 48: 62-81.

Literatura no de Patente 2: "Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy", TRENDS in Molecular Medicine., 2005; 11: 177-185.

Literatura no de Patente 3: Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P., "On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention", EMBO J., 2002; 21 (5): 857-864.

Literatura no de Patente 4: He Y, Zhang Y, Liu X et al., "Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa", Int. J. Mol. Sci., 2014; 15 (8): 14456-14474.

Literatura no de Patente 5: Yu H, Vu TH, Cho K., "Mobilizing endogenous stem cells for retinal repair", Transl. Res., 2014; 163 (4): 387-398.

Literatura no de Patente 6: Kami J, Takahashi H et al., "Retinoic acid receptor agonist Am90 inhibits experimental choroidal neovascularization", Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2004; 45: 1856. (ARVO Annual Meeting Abstract, May 2004) Literatura no de Patente 7: AKIMOTO, MASAYUKI: "Regenerative Medicine : Toward Curative Therapy for Retinal Degenerative Diseases", Journal of the eye, vol. 23, no. 9, 2006, pages. 1153-1160

Sumario de la invención

Cualquier referencia en la descripción a procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es obtener un compuesto de bajo peso molecular para simplemente tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria no mediante un enfoque tal como la terapia génica y la medicina regenerativa, sino administrando un medicamento a través de una vía de administración convencional. Otro

objeto se dirige a un tratamiento simple y/o a la prevención de una enfermedad degenerativa de la retina asociada a la degeneración de los fotorreceptores.

Solución al problema

Los presentes inventores han considerado que el tratamiento y/o la prevención de la retinosis pigmentaria puede lograrse induciendo la regeneración de células de bastón, aumentando así el número de células de bastón; y que si la regeneración de células de bastón puede inducirse mediante un compuesto de bajo peso molecular, el compuesto puede administrarse en la misma forma de dosificación que un fármaco convencional, y de este modo, la retinosis pigmentaria puede tratarse y/o prevenirse de manera sencilla. Sin embargo, no se disponía de un sistema de evaluación de la inducción de la regeneración de las células de bastón que permitiera cribar muchos compuestos. A continuación, los actuales inventores han llevado a cabo intensos estudios. Como resultado, se consiguió preparar un modelo transgénico de pez cebra, cuyas células de bastón pueden ser específicamente ablacionadas y cuya regeneración puede ser evaluada por luminiscencia. Se buscaron compuestos de bajo peso molecular con actividad inductora de la regeneración utilizando el modelo y, a continuación, se examinaron *in vivo* utilizando un sistema de evaluación de la regeneración de células de bastón. Como resultado, se descubrió que un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico contribuye a la inducción de la regeneración de las células de bastón. Además, se ha confirmado que el compuesto que tiene una actividad agonística RAR induce la regeneración de las células de varilla también en un modelo de enfermedad de retinosis pigmentaria.

Más específicamente, se ha descubierto que la regeneración de células de bastón puede inducirse mediante la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR; y que el compuesto que tiene una actividad agonista de RAR es eficaz para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria. Basándose en los resultados obtenidos, se ha llevado a cabo la presente invención.

Puesto que el compuesto que tiene una actividad agonista de RAR de la presente invención tiene una actividad para inducir la regeneración de células de bastón, el compuesto es eficaz para tratar y/o prevenir enfermedades, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de células de bastón (por ejemplo, una enfermedad degenerativa de la retina asociada a la degeneración de los fotorreceptores, tal como la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad, la distrofia macular (enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central)), como se describe más adelante.

La invención se limita a las reivindicaciones adjuntas.

Más específicamente, la presente invención se refiere, por ejemplo, a lo siguiente:

[1] Un agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria, que contiene un compuesto con actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.

[2] El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [1], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.

[3] El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [1], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.

[4] El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [1], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.

[5] El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [1], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es el tamibaroteno.

[6] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [1] a [5], en el que el agente se administra por vía tópica en el ojo.

[7] Una composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria que contiene un compuesto con actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

[8] La composición según [7], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.

- [9] La composición según [7], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- 5 [10] La composición según [7], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- [11] Un compuesto o una sal del mismo que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico para su uso en el tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria.
- [12] El compuesto o una sal del mismo según [11], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 10 [13] El compuesto o una sal del mismo según [11], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- 15 [14] El compuesto o una sal del mismo según [11], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- [15] Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un medicamento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria.
- 20 [16] El uso según [15], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- [17] El uso según [15], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- 25 [18] El uso según [15], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- [19] Un procedimiento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria, que comprende la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.
- 30 [20] El procedimiento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [19], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- [21] El procedimiento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [19], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- 35 [22] El procedimiento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según [19], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- [23] Un inductor de la regeneración de las células de bastón que contiene un compuesto con actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.
- 40 [24] El inductor de la regeneración de células de bastón según [23], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- [25] El inductor de la regeneración de células de bastón según [23], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- 45 [26] El inductor de la regeneración de células de bastón según [23], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 50 [27] El inductor de la regeneración de las células de bastón según [23], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es el tamibaroteno.

- [28] El inductor de la regeneración de células de bastón según uno cualquiera de [23] a [27], en el que el inductor de la regeneración de células de bastón se administra por vía tópica al ojo.
- 5 [29] Una composición para su uso en la inducción de la regeneración de células de bastón, que contiene un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- [30] La composición según [29], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 10 [31] La composición según [29], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- [32] La composición según [29], en la que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 15 [33] Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en la inducción de la regeneración de células de bastón.
- [34] El compuesto o una sal del mismo según [33], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 20 [35] El compuesto o una sal del mismo según [33], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- [36] El compuesto o una sal del mismo según [33], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 25 [37] Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un medicamento para inducir la regeneración de células de bastón.
- [38] El uso según [37], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 30 [39] El uso según [37], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- [40] El uso según [37], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 35 [41] Un procedimiento para inducir la regeneración de células de bastón, que comprende la administración de un compuesto que tiene una actividad agonística del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.
- [42] El procedimiento para inducir según [41], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 40 [43] El procedimiento para inducir según [41], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- [44] El procedimiento para inducir según [41], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 45 [45] Un agente para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, que contiene un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.
- 50 [46] El agente para tratar y/o prevenir según [45], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central.

- [47] El agente para tratar y/o prevenir según [45], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es la retinosis pigmentaria o la degeneración macular asociada a la edad.
- 5 [48] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [45] a [47], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.
- 10 [49] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [45] a [47], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.
- [50] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [45] a [47], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
- 15 [51] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [45] a [47], en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico es el tamibaroteno.
- [52] El agente para tratar y/o prevenir según uno cualquiera de [45] a [51], en el que el agente se administra por vía tópica en el ojo.
- 20 [53] Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón.
- 25 [54] El compuesto o una sal del mismo según [53], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central.
- [55] El compuesto o una sal del mismo según [53], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es la retinosis pigmentaria o la degeneración macular asociada a la edad.
- 30 [56] Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un agente para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón.
- 35 [57] El uso según [56], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central.
- [58] El uso según [56], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es la retinosis pigmentaria o la degeneración macular asociada a la edad.
- 40 [59] Un procedimiento para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, que comprende la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.
- 45 [60] El procedimiento para tratar y/o prevenir según [59], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central.
- 50 [61] El procedimiento para tratar y/o prevenir según [59], en el que la enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, es la retinosis pigmentaria o la degeneración macular asociada a la edad.
- [62] Un procedimiento para producir un tejido retiniano, que comprende la adición de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo a células madre cultivadas.

[63] Un procedimiento para producir un tejido retiniano para medicina regenerativa, que comprende la adición de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo a células madre cultivadas.

[64] Pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

5 [65] Un procedimiento de cribado de un agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria utilizando el pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

[66] Un procedimiento de cribado de un inductor para la regeneración de células de bastón utilizando pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

[67] Plásmido pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2.

10 Otras realizaciones de la presente invención son las siguientes:

(1a) Un agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria que contiene un compuesto con actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.

15 (2a) El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según (1a), en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es un compuesto retinoide o un compuesto agonista similar al retinoide.

(3a) El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según (1a), en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, tazaroteno, ácido tazaroténico, adapaleno, palovaroteno, retinol, isotretinoína, alitretinoína, etretinato, acitretina o bexaroteno.

20 (4a) El agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria según (1a), en el que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico es tamibaroteno o éster metílico de tamibaroteno.

(5a) Una composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria que contiene un compuesto con actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

25 (6a) Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria.

(7a) Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un medicamento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria.

30 (8a) Un procedimiento para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria, que comprende administrar un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico o una sal del mismo.

(9a) Un inductor de la regeneración de células de bastón que contiene un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.

35 (10a) Una composición para inducir la regeneración de células de bastón, que contiene un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo y un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

(11a) Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en la inducción de la regeneración de células de bastón.

(12a) Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un medicamento para inducir la regeneración de células de bastón.

40 (13a) Un procedimiento para inducir la regeneración de células de bastón, que comprende administrar un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.

(14a) Un agente para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, que contiene un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.

45 (15a) Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón.

(16a) Uso de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para producir un agente para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón.

5 (17a) Un procedimiento para tratar y/o prevenir una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, que comprende la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo.

(18a) Un procedimiento para producir un tejido retiniano, que comprende agregar un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo a células madre cultivadas.

10 (19a) Un procedimiento para producir un tejido retiniano para medicina regenerativa, que comprende agregar un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo a células madre cultivadas.

(20a) Pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

(21a) Un procedimiento de cribado de un agente para tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria utilizando pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

15 (22a) Un procedimiento de cribado de un inductor de la regeneración de células de bastón utilizando pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2).

Efectos ventajosos de la invención

20 Según la presente invención, el número de células de bastón puede aumentarse induciendo la regeneración de las células de bastón mediante la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico, y la retinosis pigmentaria puede tratarse y/o prevenirse de forma sencilla.

Además, una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de células de bastón, puede tratarse y/o prevenirse administrando un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico según la presente invención.

25 Además, se puede cribar un agente para tratar o prevenir la retinosis pigmentaria usando pez cebra transgénico según la presente invención y un procedimiento para cribar un inductor para la regeneración de células de bastón usando el pez cebra.

Breve descripción de los dibujos

30 [Figura 1] La figura 1 muestra que, en los globos oculares del pez cebra transgénico, Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2), producido en el ejemplo 2, se confirmó la expresión específica del gen ntr-nanoluc en la capa granular externa en la que están presentes las células de bastón, mediante hibridación *in-situ*. El símbolo de referencia, AS, representa la expresión del gen ntr-nanoluc mediante una sonda de ARN antisentido, y las flechas blancas señalan las señales positivas. El símbolo de referencia, S, representa el fondo por una sonda de ARN sensorial.

35 [Figura 2] La figura 2 muestra que las células de bastón del pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) producidas en el ejemplo 2 se ablacionaron tratando a los peces con 10 mM de metronidazol (MTZ) durante 24 horas y el número de células de bastón se redujo al 13,5 % por muerte celular. El eje vertical representa la cantidad de luminiscencia. El símbolo * indica $p < 0,001$ en la prueba t de Student.

40 [Figura 3] La figura 3 muestra que la regeneración gradual de las células de bastón se confirmó en 48 horas mediante el lavado del pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) producidas en el ejemplo 2 y cuyas células de bastón han sido ablacionadas con agua de cría para eliminar un radical tóxico. El eje vertical representa la cantidad de luminiscencia y el eje horizontal el tiempo transcurrido tras la eliminación del radical.

45 [Figura 4] La figura 4 muestra los resultados de una prueba de reproducibilidad y una prueba de dependencia de la concentración en relación con la regeneración de células de bastón con TTNPB en el ejemplo 3. El eje vertical representa la Activación, que se calculó con base en el aumento de la cantidad de luminiscencia y sirve como índice de la actividad inductora de la regeneración de las células de bastón. El símbolo * representa $p < 0,05$ en la prueba de comparación múltiple de Dunnett y el símbolo ** representa $p < 0,01$ en la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

50 [Figura 5] La figura 5 muestra los efectos (resultados de verificación) de un agonista RAR, compuesto (RA), y un antagonista RAR, compuesto (BMS493) sobre la inducción de la regeneración de células de bastón según el ejemplo 4. El eje vertical representa la Activación, que se calculó con base en el aumento de la cantidad de luminiscencia y sirve como índice de la actividad inductora de la regeneración de las células de bastón. El símbolo *** representa $p < 0,001$ en la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

[Figura 6] La figura 6 muestra el estado del efecto de regeneración de las células de bastón en el modelo de retinosis pigmentaria del ejemplo 7. El estado de los peces obtenidos mediante el cruce de pez cebra Tg (rho: EGFP) que expresan específicamente EGFP en las células de bastón (control) con peces cebra de tipo salvaje se muestra en (A); y el estado de los peces obtenidos cruzando peces cebra Tg (rho: EGFP) con pez cebra modelo de retinosis pigmentaria y no tratado con un fármaco se muestra en (B). En (B) se observó pérdida de células de bastón en comparación con (A). Se observó la recuperación de las células de bastón en (C) utilizando el mismo modelo administrado con TTNPB en comparación con el pez (B) no tratado con un fármaco.

[Figura 7] La figura 7 muestra que la actividad de inducción de la regeneración de células de bastón mediante la administración de TTNPB y tamibaroteno al modelo de retinosis pigmentaria según el ejemplo 8 aumenta de forma dependiente de la concentración. El eje vertical representa la cantidad de luminiscencia. El símbolo ** representa $p < 0,01$ en la prueba de comparación múltiple de Dunnett y el símbolo *** representa $p < 0,001$ en la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Descripción de las realizaciones

A continuación, se describirán realizaciones preferidas para llevar a cabo la presente invención.

La presente invención se refiere al tratamiento y/o prevención de una enfermedad que incluye retinosis pigmentaria (en lo que sigue denominada "retinosis pigmentaria, etc."), cuyo síntoma se mejora induciendo la regeneración de células de bastón basándose en el aumento del número de células de bastón induciendo la regeneración de células de bastón mediante un compuesto. Más específicamente, la presente invención se refiere al tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria, etc. mediante la regeneración de células de bastón una vez degeneradas/perdidas, induciendo la regeneración de células de bastón mediante la administración de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico para aumentar el número de células de bastón.

En primer lugar, los presentes inventores construyeron un modelo para evaluar la inducción de la regeneración de células de bastón. Más concretamente, el pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) se prepararon introduciendo el plásmido pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2 de acuerdo con un procedimiento de introducción de genes utilizando la meganucleasa I-SceI (Ejemplos 1 y 2). Pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2), en el que una proteína fluorescente, DsRed2, que se expresa específicamente en el tejido cardíaco mediante el promotor myl7 específico de los cardiomiocitos, puede detectarse de forma sencilla utilizando dsRed2 como marcador bajo un estereomicroscopio de fluorescencia. En el pez cebra transgénico, además de la expresión específica del tejido cardíaco de DsRed2, una reductasa, es decir, la nitrorreductasa (NTR), y una fotoproteína, es decir, la proteína de fusión NanoLuc (NTR-NanoLuc), se expresan mediante un promotor rho específico de la célula de bastón, de forma específica para la célula de bastón. NTR-NanoLuc expresado sólo en las células de bastón no afecta a la salud general de los peces en condiciones generales de cría. Sin embargo, si se agrega un profármaco, el metronidazol, el metronidazol no tóxico se convierte en un radical tóxico por NTR. En este mecanismo, al exponer al pez cebra transgénico al metronidazol, la ablación se dirige específicamente a las células de bastón sin afectar a la salud general del pez. Tras la ablación de las células de bastón mediante el tratamiento con metronidazol, los peces cebra transgénicos se lavaron con agua de cría para eliminar el radical tóxico. A partir de entonces, las células de bastón se regeneran gradualmente en el pez cebra. En el pez cebra transgénico, las células de bastón pueden determinarse cuantitativamente midiendo la cantidad de luminiscencia derivada de la expresión de NanoLuc específica de las células de bastón. Tras la ablación de las células de bastón, los peces cebra transgénicos se exponen a un compuesto de ensayo. La actividad del compuesto de ensayo para inducir la regeneración de las células de bastón puede evaluarse cuantitativamente midiendo la cantidad de luminiscencia derivada de NanoLuc y específica de las células de bastón.

Los peces cebra alevines pueden criarse en, por ejemplo, una placa de 96 pocillos. Gracias al uso del pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2), se estableció un procedimiento para el cribado cuantitativo de un compuesto que tiene una actividad de inducción de regeneración de bastones en la placa de 96 pocillos con un alto rendimiento. Este sistema de evaluación es un primer procedimiento de cribado que permite la evaluación cuantitativa de la regeneración tisular *in-vivo* con un alto rendimiento.

La validación del pez cebra transgénico se llevó a cabo mediante varios procedimientos. En primer lugar, se llevó a cabo la hibridación *in situ*. Como resultado, se confirmó que ntr-nanoluc se expresaba específicamente en la capa granular externa en la que están presentes las células de bastón (Figura 1). A continuación, el pez cebra transgénico se trató con 10 mM de metronidazol durante 24 horas. Como resultado, se confirmó la ablación de células de bastón, y el número de células de bastón se redujo al 13,5 % por muerte celular (Figura 2). Tras la ablación, los peces cebra transgénicos se lavaron con agua de cría para eliminar un radical tóxico derivado del metronidazol. Como resultado, se confirmó que las células de bastón se regeneran gradualmente a lo largo de 48 horas (Figura 3). En esta fase, si se agrega un compuesto de prueba, se puede confirmar la actividad de inducción de la regeneración de las células de bastón del compuesto.

Luminiscencia del pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2), incluso de un solo individuo, pueden detectarse suficientemente. En el cribado con pez cebra transgénico según la presente invención, si se utilizan 4 o más muestras en el cribado y se lleve a cabo además un ensayo de dependencia de la concentración en combinación, la actividad de inducción de la regeneración de las células de bastón puede confirmarse con mayor certeza.

Como resultado del cribado usando pez cebra transgénico, los presentes inventores descubrieron que el ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB) es eficaz para inducir la regeneración de células de bastón, aumentando así el número de células de bastón. Se ha confirmado que el TTNPB mostró una actividad de inducción de la regeneración de células de bastón estadísticamente significativa en comparación con el control DMSO a cualquier concentración predeterminada en una prueba de dependencia de la concentración. Obsérvese que se determinó que el efecto medicinal del TTNPB ya alcanzaba el punto de saturación incluso a una concentración de 0,3 μ M, y de este modo, se determina que el TTNPB es un compuesto con una elevada actividad (Ejemplo 3; Figura 4). Se sabe que el TTNPB es un agonista del receptor del ácido retinoico (RAR). Más concretamente, dado que se confirmó que el TTNPB tiene una actividad inductora de la regeneración de células de bastón, se presumió la relevancia de la inducción de la regeneración de células de bastón para una señal de ácido retinoico.

Basándose en este hallazgo, se evaluó un agonista endógeno de una señal de ácido retinoico, es decir, ácido All-trans retinoico. Como resultado, el ácido All-trans retinoico mostró una actividad significativa de inducción de la regeneración de forma dependiente de la concentración. A partir de ahí, se puso de manifiesto la importancia de la inducción de la regeneración de las células de bastón para una señal de ácido retinoico (Ejemplo 4; Figura 5). Además, el 4-[(1E)-2-[5,6-dihidro-5,5-dimetil-8-(2-feniletil)-2-naftalenil]etenil]benzoato (BMS493), conocido como un antagonista del RAR que inhibe el RAR, no muestra actividad inductora de la regeneración de las células de bastón y fue inferior a un control DMSO. A partir de esto, se consideró que el antagonista RAR inhibe la regeneración natural de las células de bastón en presencia de un agonista RAR. A partir de los resultados anteriores, se sugirió que la activación de la señal del ácido retinoico a través del RAR contribuye a la inducción de la regeneración de las células de bastón (Ejemplo 4; Figura 5).

A continuación, se examinó la actividad agonista de RAR para tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno, éster etílico de tamibaroteno, adapaleno, tazaroteno, ácido tazaroténico y palovaroteno. Como resultado, se confirmó que todos los compuestos tienen actividades agonistas de RAR α , RAR β y RAR γ (Tabla 2).

Estos compuestos, que se utilizaron como ejemplos representativos de agonistas de RAR, se sometieron a evaluación de la actividad de inducción de regeneración de células de bastón. Como resultado, se confirmó que todos los compuestos presentan actividad inductora de la regeneración de células de bastón de forma dependiente de la concentración (Ejemplo 6; Tabla 3). De estos agonistas RAR, el tamibaroteno y el éster etílico de tamibaroteno mostraron una fuerte actividad de inducción de la regeneración de células de bastón.

Pez cebra transgénico Tg (rho: hRHO (Q344X), omp: EGFP), conocido como modelo patológico de retinosis pigmentaria, se cruzaron con peces cebra transgénicos Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) preparado por los presentes inventores. De esta manera, se preparó un nuevo modelo patológico con la propiedad de emitir luz a partir de células de bastón regeneradas para realizar una evaluación cuantitativa de la regeneración de células de bastón. Pez cebra transgénico Tg ((rho: hRHO (Q344X), omp: EGFP), que es un nombre bajo otro sistema de nomenclatura de un modelo de retinosis pigmentaria, es decir, pez cebra RH1: hRhodopsin (Q344X) (Nakao T, Tsujikawa M, Notomi S, Ikeda Y, Nishida K., "The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa", PLoS One., 2012; 7 (4): e32472)), pueden expresar un mutante de la rodopsina, hRHO (Q344X), del que se informó como mutación genética causal de la retinosis pigmentaria en humanos, de forma específica para las células de bastón; se confirma que presentan expresión ectópica de la rodopsina y degeneración/pérdida de células de bastón; y tienen un fenotipo idéntico al de la retinosis pigmentaria humana.

Utilizando el nuevo modelo patológico pez cebra, se evaluó cuantitativamente la actividad de inducción de regeneración de células de bastón de los agonistas de RAR, es decir, TTNPB y tamibaroteno. Como resultado, se confirmó que tanto el TTNPB como el tamibaroteno inducen una regeneración estadísticamente significativa de las células de bastón de forma dependiente de la dosis (Ejemplo 8, Figura 7).

Utilizando Tg (rho: EGFP) que expresan específicamente EGFP (proteína fluorescente verde mejorada) en las células de bastón, se observó el estado de las células de bastón en un modelo de retinosis pigmentaria mediante un microscopio láser confocal. Como resultado, se descubrió que el número de células de bastón estaba aparentemente reducido en el modelo de retinosis pigmentaria en comparación con el tipo salvaje. En cambio, en el grupo tratado con TTNPB, se observó que el número de células de bastón se recuperó en comparación con el control (Ejemplo 7, Figura 6).

Como se ha confirmado mediante verificación usando pez cebra como se ha mencionado anteriormente, un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR puede inducir la regeneración de células de bastón y puede tratar y/o prevenir la retinosis pigmentaria, etc.

Para el tratamiento y/o prevención de la retinosis pigmentaria, etc., que es un objeto de la presente invención, puede usarse un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico (actividad agonista de RAR). En la presente invención, el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico se refiere a un compuesto que puede unirse a un receptor de ácido retinoico (RAR) para activarlo.

5 Ejemplos de dicho compuesto incluyen un compuesto retinoide y un compuesto agonista similar al retinoide. El compuesto retinoide se refiere a un retinoide natural o sintético. El retinoide natural representa colectivamente la vitamina A y los derivados de la vitamina A. Algunos ejemplos son el ácido retinoico, el retinol, el retinal y los 3-dehidro derivados de éstos. El retinoide sintético se refiere a un compuesto obtenido sintéticamente a partir de un retinoide y que tiene una actividad agonística RAR. Un compuesto agonista tipo retinoide es un
10 compuesto que tiene una actividad agonista RAR, aunque no tenga la estructura de la vitamina A. Si un compuesto tiene o no una actividad agonista RAR puede determinarse, por ejemplo, mediante el procedimiento de medición de la actividad agonista RAR descrito más adelante en el ejemplo 5.

Ejemplos del compuesto que tiene una actividad agonista de RAR de la presente invención incluyen tamibaroteno (por ejemplo, Combi-Blocks, Cat. No. QA-6963), éster metílico de tamibaroteno (por ejemplo,
15 Sundia meditech, Cat. No. 82569), éster etílico de tamibaroteno (sintetizado por el procedimiento descrito, por ejemplo, en Org. Lett., 15, 3678-3681 (2013)), tazaroteno (por ejemplo, Tokyo Kasei, Cat. No. T3108), ácido tazaroténico (obtenido, por ejemplo, por hidrólisis de tazaroteno con referencia al procedimiento descrito en US6344463), adapaleno (por ejemplo, Tokyo Kasei, Cat. No. A2549), palovaroteno (por ejemplo, Haoyuan Chemexpress Co., Ltd., Cat. No. HY-14799), retinol (por ejemplo, Sigma-Aldrich, Cat. No. R7632-25MG),
20 isotretinoína (por ejemplo, Sigma-Aldrich, Cat. No. 1353500-200MG), alitretinoína, etretinato (por ejemplo, Sigma-Aldrich, Cat. No. 1011029-20MG), acitretina (por ejemplo, Sigma-Aldrich, Cat. No. 44707-25MG), bexaroteno (por ejemplo, Sigma-Aldrich, Cat. No. S ML0282-10MG) y TTNPB (Sigma-Aldrich, Cat. No. T3757-10MG). Preferiblemente, se menciona el tamibaroteno, el éster metílico de tamibaroteno o el éster etílico de tamibaroteno; y aún más preferiblemente, se menciona el tamibaroteno.

25 El compuesto que tiene una actividad agonista de RAR que se va a usar en la presente invención, si se desea, se puede usar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable se refiere a una sal sin toxicidad significativa y utilizable como medicamento. Los compuestos que tienen una actividad agonística RAR para ser utilizados en la presente invención a veces tienen una fracción ácida, en particular, un grupo carboxilo. De acuerdo con lo anterior, los compuestos se tratan con una base para obtener
30 sales de los mismos.

Ejemplos de sales basadas en sustituyentes ácidos incluyen una sal de metal alcalino tal como una sal de sodio, una sal de potasio y una sal de litio; una sal de metal alcalinotérreo tal como una sal de calcio y una sal de magnesio; una sal metálica tal como una sal de aluminio y una sal de hierro; una sal inorgánica tal como
35 una sal de amonio; una sal orgánica de amina, tal como una sal de t-octilamina, una sal de dibencilamina, una sal de morfolina, una sal de glucosamina, una sal de éster alquílico de fenilglicina, una sal de etilendiamina, una sal de N-metilglucamina, una sal de guanidina, una sal de dietilamina, una sal de trietilamina, una sal de dicitlohexilamina, una sal de N,N'-dibencilendiamina, una sal de cloroprocaína, una sal de procaína, una sal de dietanolamina, una sal de N-bencilfenetilamina, una sal de piperazina, una sal de tetrametilamonio y una sal de tris(hidroximetil)aminometano; y una sal de aminoácido tal como una sal de glicina, una sal de lisina, una
40 sal de arginina, una sal de ornitina, un glutamato y un aspartato.

Un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR o una sal del mismo que se va a usar en la presente invención a veces absorbe y adsorbe agua y se convierte en un hidrato cuando se deja al aire o se recristaliza. Dicho hidrato también está incluido en el compuesto o en una sal del mismo de la presente invención.

45 Un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR o una sal del mismo que se va a usar en la presente invención a veces absorbe un disolvente y se convierte en un solvato. Dicho solvato también está incluido en el compuesto o en una sal del mismo de la presente invención.

El disolvente que puede formar un solvato no está particularmente limitado siempre que no presente toxicidad significativa y pueda usarse como medicamento. Algunos ejemplos de disolventes son etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, acetona, metiletilcetona, metilisobutilcetona, dimetilsulfóxido, formiato de etilo,
50 acetato de etilo, acetato de propilo, éter dietílico, tetrahidrofurano, ácido fórmico, ácido acético, pentano, heptano, cumeno y anisol.

Si un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR que se va a usar en la presente invención tiene un átomo de carbono asimétrico dentro de la molécula, están presentes isómeros ópticos. Estos isómeros y mezclas de estos isómeros pueden utilizarse para alcanzar un objeto de la presente invención. De acuerdo con
55 lo anterior, los compuestos que tienen una actividad agonística RAR para ser utilizados en la presente invención, isómeros ópticos individuales, y mezclas de isómeros ópticos que los contienen en cualquier proporción están todos incluidos en el alcance de la presente invención.

Los isómeros ópticos mencionados anteriormente pueden obtenerse sintetizando un compuesto según la presente invención usando un compuesto de partida ópticamente activo o usando síntesis asimétrica o un

procedimiento de inducción asimétrica. Alternativamente, se puede aislar un isómero óptico sometiendo los compuestos sintetizados según la presente invención, por ejemplo, a resolución o separación óptica utilizando un portador ópticamente activo.

Un compuesto que tiene una actividad agonista de RAR para ser utilizado en la presente invención puede contener un isótopo de al menos un átomo constituyente en una proporción no natural. Como isótopo atómico pueden mencionarse, por ejemplo, el deuterio (^2H), el tritio (^3H), el yodo-125 (^{125}I) o el carbono-14 (^{14}C). El compuesto puede marcarse con un radioisótopo tal como tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Los compuestos radiomarcados son útiles como agentes terapéuticos o preventivos y como reactivos tales como reactivos de ensayo y agentes de diagnóstico, por ejemplo, agentes de diagnóstico por imagen *in vivo*. Todas las variantes isotópicas del compuesto de la presente invención se incluyen en el alcance de la presente invención, tanto si está radiomarcado como si no.

Se espera que el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico según la presente invención, puesto que tiene una actividad para inducir la regeneración de células de bastón, tenga un excelente efecto terapéutico y/o un efecto preventivo en enfermedades, cuyos síntomas mejoran por la actividad, tales como retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, distrofia macular (enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central) o en los síntomas asociados a estas enfermedades. Se sabe que la condición patológica primaria de estas enfermedades es la degeneración de las células fotorreceptoras, incluidos las células de bastón (véase, por ejemplo, la bibliografía siguiente: retinosis pigmentaria (A, E), degeneración macular asociada a la edad (B), enfermedad de Stargardt (C, E), distrofia de conos y bastones (E), enfermedad de Best (D, E), segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X (E), distrofia macular oculta (F), distrofia coroidea anular central (G)). Por otra parte, se ha dilucidado que el estado de enfermedad causado por la degeneración de las células fotorreceptoras puede mejorarse mediante el suministro de células de bastón por trasplante (X). De este modo, según la presente invención, la regeneración endógena de las células de bastón se induce administrando un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico, aumentando así el número de células de bastón. De este modo, la presente invención es eficaz en el tratamiento y/o prevención de enfermedades que cursan con degeneración de los fotorreceptores (preferentemente, las enfermedades mencionadas anteriormente).

A, Exp Eye Res. 2016 Sep; 150: 149-165.

B, Am J Ophthalmol. 2016 Aug; 168: 260-268.

C, Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipid. 2009 Jul; 1791 (7): 573-583.

D, Prog Retin Eye Res. 2017 May; 58: 70-88.

E, Dev Ophthalmol. 2014; 53: 44-52.

F, Jpn J Ophthalmol. 2015 Mar; 59 (2): 71-80.

G, J Optom. 2013 Apr; 6 (2): 114-122.

X, Nature. 2006 Nov 9; 444 (7116): 203-207.

En la presente invención, la degeneración macular relacionada con la edad se define para incluir tanto un tipo atrófico como un tipo exudativo de degeneración macular relacionada con la edad, y preferentemente el tipo atrófico de degeneración macular relacionada con la edad.

El compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico según la presente invención, puesto que tiene una actividad de inducción de regeneración de células de bastón, es eficaz en el tratamiento y/o prevención tanto del tipo atrófico como del tipo exudativo (preferentemente, del tipo atrófico) de la degeneración macular relacionada con la edad.

La distrofia macular en la presente invención se refiere a un grupo de enfermedades degenerativas retinianas que tienen daño macular asociado con degeneración de fotorreceptores debido a una causa hereditaria y una progresión de deterioro de la visión/anomalías del campo visual; y más específicamente, se refiere a la enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia coroidea anular central.

El tratamiento en la presente invención se refiere a un tratamiento que se va a aplicar a la retina que pierde función debido a la degeneración o pérdida de células de bastón con el fin de recuperar la función visual. Para la recuperación, por ejemplo, es necesario aumentar el número de células de bastón o inducir un aumento de células de bastón y proteger aún más las células de bastón de la pérdida de función. El compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico puede aplicarse adecuadamente a este fin.

La prevención de la presente invención se refiere a eliminar un riesgo de aparición de retinosis pigmentaria, etc. facilitando o induciendo la regeneración de células de bastón y previniendo además la pérdida funcional de células de bastón en las condiciones en las que la degeneración y pérdida de células de bastón procede con una alta probabilidad y el riesgo de aparición de retinosis pigmentaria, etc. se hace alto. Para la prevención, puede aplicarse adecuadamente el compuesto que tiene una actividad agonista del receptor del ácido retinoico.

El mecanismo subyacente tanto al tratamiento como a la prevención para la retinosis pigmentaria, etc. es inducir la regeneración de las células de bastón administrando un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico.

El compuesto de la presente invención, una sal farmacéuticamente aceptable, un hidrato o un solvato del mismo puede administrarse en diversas formas de dosificación. La forma de dosificación es preferiblemente una forma de dosificación administrada por vía tópica al ojo. Para la administración tópica en el ojo, por ejemplo, puede utilizarse un fluido (por ejemplo, solución oftálmica e inyección) y una pomada.

En el caso del fluido, puede utilizarse un líquido, una emulsión o una suspensión. El líquido, la emulsión o la suspensión se esterilizan preferentemente y se ajustan para que sean isotónicos con respecto a la sangre. El disolvente utilizado en la producción del líquido, emulsión o suspensión no está especialmente limitado, siempre que pueda utilizarse como diluyente para uso médico. Algunos ejemplos de disolvente son el agua, el etanol, el propilenglicol, el alcohol isostearílico etoxilado, el alcohol isostearílico polioxilado y el éster de ácido graso polioxietileno sorbitán. Obsérvese que, en este caso, el preparado puede contener una cantidad suficiente de sal, glucosa o glicerina para preparar una solución isotónica, así como un solubilizante, un tampón y un agente calmante habitualmente utilizados. Una solución oftálmica puede prepararse, por ejemplo, utilizando aditivos seleccionados, según proceda, entre un agente tonificante tal como el cloruro sódico y la glicerina concentrada; un regulador del pH tal como el ácido clorhídrico y el hidróxido sódico; un agente amortiguador tal como el fosfato sódico y el acetato sódico; un tensioactivo, tal como monooleato de sorbitán polioxietilenado, estearato de polioxilo 40 y aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado; un estabilizante, tal como citrato sódico y edetato sódico; y un conservante, tal como cloruro de benzalconio y parabeno. El pH de la solución oftálmica puede ser suficiente para estar dentro del intervalo aceptable de las preparaciones oftálmicas, y preferiblemente está dentro del intervalo de 4 a 8.

La pomada puede prepararse utilizando una base de pomada para una pomada ocular y un coadyuvante tal como parafina líquida. En la preparación mencionada, si es necesario, puede contener, por ejemplo, un colorante y un conservante, y además, puede contener otro medicamento.

El contenido de un compuesto que sirve como ingrediente activo en la preparación mencionada anteriormente no está particularmente limitado y puede seleccionarse apropiadamente de una amplia gama. El contenido suele estar comprendido entre el 0,5 y el 70 % en peso y, preferiblemente, entre el 1 y el 30 % en peso.

La cantidad de uso de la misma varía en función del síntoma y de la edad del paciente (animal de sangre caliente, en particular ser humano). En el caso de un colirio líquido o una inyección intravítrea, el límite superior de la cantidad de uso por día y por ojo es de 10 mg (preferiblemente 1 mg) y el límite inferior del mismo es de 0,001 mg (preferiblemente 0,01 mg). La cantidad de uso (cantidad de dosificación) se administra deseablemente en envases de una dosis a seis dosis por adulto y día, dependiendo del síntoma. La cantidad de dosificación y la pauta posológica son aplicables a las pomadas oftálmicas.

Un tejido retiniano tal como un tejido retiniano similar a una lámina, similar a un organoide y similar a una suspensión puede producirse eficazmente, *in vitro*, agregando un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico a células madre cultivadas tales como células madre embrionarias, células madre adultas y células madre pluripotentes inducidas. El tejido retiniano producido *ex vivo* como se ha mencionado anteriormente puede ser sometido a medicina regenerativa mediante su trasplante en el globo ocular.

Ejemplos

La presente invención se describirá más específicamente mediante los ejemplos que se muestran a continuación.

(Ejemplo 1) Preparación del plásmido pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2

Para preparar el pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2), en primer lugar, se preparó el plásmido pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2 utilizando un kit de clonación HD de In-Fusion (marca registrada). El procedimiento para formar un vector se llevó a cabo de acuerdo con el manual adjunto al kit. Las secuencias de nucleótidos en la presente memoria introducidas se muestran en SEQ ID NOs: 1 a 4.

(Ejemplo 2) Preparación de pez cebra transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) y validación de la evaluación de la inducción de la regeneración de células de bastón

[Preparación del pez cebra transgénico]

Usando el plásmido pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2 preparado en el ejemplo 1, se obtuvieron peces cebra transgénicos Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) se prepararon mediante el procedimiento de introducción de genes utilizando la meganucleasa I-SceI (Soroldoni D, Hogan BM, Oates AC., "Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish", Methods Mol. Biol., 2009; 546: 117-130.). El procedimiento específico fue el siguiente:

1) Se preparó una solución de inyección mezclando 1 µl de pcDNA3.1-rho-ntr-nanoluc-myl7-dsred2 (712 ng/µl), 1,5 µl de tampón Meganucleasa (10X), 0,6 µl de I-SceI (New England Biolab Japan Co, Ltd.; 5.000 unidades/ml), 1,5 µl de rojo fenol al 0,5 % (Sigma-Aldrich Japón) y 10,4 µl de dH₂O.

2) En el citoplasma de un embrión unicelular (óvulo fecundado) obtenido de un pez cebra de tipo salvaje, se inyectó la solución de inyección (1 nl) utilizando FemtoJet (marca registrada) (Eppendorf).

3) Por la tarde del día de la inyección, se retiraron los huevos muertos. El día 3 después de la fecundación, se seleccionó al microscopio de fluorescencia un pez transgénico que presentara temporalmente expresión utilizando como índice la expresión de DsRed2 en el corazón.

4) El pez transgénico que expresaba temporalmente DsRed2 en el corazón se crió hasta que pudo poner huevos y se cruzó con peces cebra de tipo salvaje para obtener huevos fecundados. Los óvulos fecundados resultantes se observaron al microscopio de fluorescencia. Si se encontraba un óvulo fecundado que expresara DsRed2 en el corazón, se demostraba que su progenitor podía transmitir el gen introducido a un hijo. El pez transgénico se aisló como fundador.

5) Los alevines obtenidos durante y después de la etapa 4) mediante el cruce del fundador con peces cebra de tipo salvaje son peces transgénicos que tienen una expresión génica estable. Los peces transgénicos fueron sometidos, como progenitores, a fecundación cruzada, y se utilizaron peces transgénicos alevines para el experimento.

[Validación de la evaluación de la inducción de la regeneración de células de bastón mediante pez cebra transgénico]

Cuando se comprobó la expresión de ARNm del gen ntr-nanoluc en el tejido retiniano de peces cebra alevines mediante el uso de un procedimiento de hibridación *in situ*, se observó una señal clara en la capa granular externa de la retina donde están presentes las células de bastón. De acuerdo con lo anterior, se confirmó que el gen ntr-nanoluc se expresaba específicamente en un tejido deseado, y que se producía un recombinante deseado (Figura 1). La figura 1 muestra una sección de un globo ocular izquierdo de pez cebra. La parte superior de la sección es la cara dorsal del pez cebra y la inferior es su cara ventral. El símbolo de referencia S representa un control negativo (sonda de ARN sentido). La expresión del gen ntr-nanoluc se observó en la figura marcada con "AS" (sonda de ARN antisentido).

El día 3 después de la fecundación, los peces cebra transgénicos se trataron con metronidazol 10 mM (Sigma-Aldrich Japón) durante 24 horas y se les practicó la eutanasia agregando metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma-Aldrich Japón). La luminiscencia derivada de las células de bastón se midió de acuerdo con el manual adjunto al Nano-Glo (marca registrada) Luciferase Assay System (Promega Corporation). Como resultado, se confirmó que las células de bastón fueron ablacionadas por el tratamiento con 10 mM de metronidazol durante 24 horas y reducidas en número al 13,5 % por muerte celular (Figura 2). Los peces ablacionados transgénicos resultantes se lavaron con agua de cría y se eliminó un radical tóxico derivado del metronidazol. Se midió la luminiscencia derivada de las células de bastón después de 24 y 48 horas. Como resultado, se confirmó que las células de bastón se regeneran gradualmente a lo largo de 48 horas (Figura 3).

(Ejemplo 3) Cribado del compuesto y evaluación de la actividad del compuesto encontrado1. Cribado de compuestos[Procedimiento]

Los compuestos se sometieron a cribado mediante el uso de pez cebra transgénico obtenido en el ejemplo 2.

El procedimiento del cribado fue el siguiente:

1) El día anterior a la recogida de los huevos, una pareja de pez cebra macho y hembra, es decir, un pez transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) y una de tipo salvaje, se colocaron en un tanque para el apareamiento y se aislaron mediante un divisor.

2) A la mañana siguiente (8:00 - 11:00), se retiró el separador para que pudieran aparearse entre sí. Se recogieron los huevos fecundados. Por la tarde (16:00 - 18:00) del mismo día, sólo se seleccionaron los huevos fecundados normalmente desarrollados y se criaron en una placa para su crecimiento.

3) El tercer día después de la fecundación, los alevines se transfirieron al agua de cría, que contenía 10 mM de metronidazol (Sigma-Aldrich, Japón) y 1 % de DMSO (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), (preparado disolviendo 60 mg de océano instantáneo (Napco Limited (Japón)) en 1 l de agua destilada), y se criaron en condiciones de oscuridad durante 24 horas. De este modo, la ablación se aplicó específicamente a las células de bastón de los alevines. En cambio, los alevines no ablacionados, que debían utilizarse como control, se transfirieron a un tanque con agua de cría, que contenía una solución de DMSO al 1 %, y se criaron.

4) En una placa de ensayo (se utilizó Tissue Culture Treated Black Isoplate-96 TC (PerkinElmer Co., Ltd. Japón)), se dispensaron un compuesto de ensayo y DMSO como control en una cantidad de 2,5 µl/pocillo cada uno, y además se agregó agua de huevo en una cantidad de 147,5 µl/pocillo.

5) Los alevines ablacionados de 4 días después de la fecundación se lavaron bien con agua de huevo y se dispensaron en pocillos de la placa de ensayo que contenía un compuesto junto con 100 µl de agua de huevo, de forma que hubiera 2 individuos de alevines por pocillo.

6) Después de criar los alevines durante 2 días, se retiraron 200 µl de agua de huevo y se agregó metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma-Aldrich Japón; 0,4 mg/ml, 10 µl) para realizar la eutanasia a los peces.

7) Se agregó Nano-Glo (marca registrada) Luciferase assay Substrate (Promega Corporation) a Nano-Glo (marca registrada) Luciferase assay buffer (Promega Corporation) en una proporción de 1:50 y se agregaron 100 µl de la solución resultante a cada uno de los pocillos.

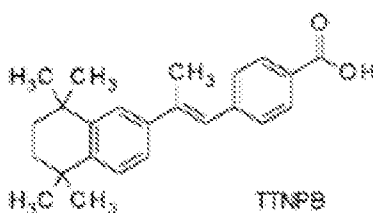
8) Se agitó con BIO-Mixer (Biotech Japan Co., Ltd.) durante una hora y se midió la luminiscencia de NanoLuc (marca registrada) con Envision (PerkinElmer Co., Ltd., Japón).

[Resultados]

La tasa de activación (denominada activación (%)) de la luciferasa por estimulación del compuesto se calculó de acuerdo con la siguiente expresión.

Como resultado del cribado anterior, el ácido 4-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahidro-5,5,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-1-propenil]benzoico (TTNPB) representado por la siguiente fórmula mostró una activación (%) de 150 o más a una concentración de trabajo eficaz de 2,5 µM.

[Fórmula 1]



2. Evaluación de la actividad del compuesto encontrado

[Procedimiento]

Se llevó a cabo un ensayo de evaluación para el efecto de inducción de regeneración de células de bastón de un compuesto cribado, es decir, TTNPB, a concentraciones de trabajo eficaces de 0,3, 1, 3, 10 y 30 µM, de la misma manera que en la sección 1 anterior y se repitió 4 veces (N = 4).

[Procedimiento de tratamiento de datos]

El procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el uso de Microsoft Excel 2010 (Microsoft Japan Co., Ltd.). La prueba de comparaciones múltiples de Dunnett se llevó a cabo mediante SAS9.3 para Microsoft Windows Workstation de 32 bits y el sistema cooperativo EXSUS Ver. 8.0.

En la evaluación de la actividad de inducción de regeneración de células de bastón del compuesto, se calculó la tasa de activación (denominada activación (%)) de la luciferasa por estimulación de un compuesto de acuerdo con la siguiente expresión y se mostraron un valor medio y un error estándar.

Activación (%) = (valor de medición del pocillo de muestra ÷ valor promedio del control DMSO) X 100

Los grupos de concentración individual se compararon con el grupo de control DMSO mediante la prueba de Dunnett.

[Resultados]

Los resultados se muestran en la figura 4. El TTNPB mostró una actividad de inducción de la regeneración de células de bastón estadísticamente significativa en todas las concentraciones en comparación con el control DMSO; sin embargo, no se observó dependencia de la concentración dentro del intervalo de concentración de la prueba. A partir de esto, se consideró que el efecto medicinal del TTNPB ya alcanzaba una saturación a una concentración mínima de 0,3 µM.

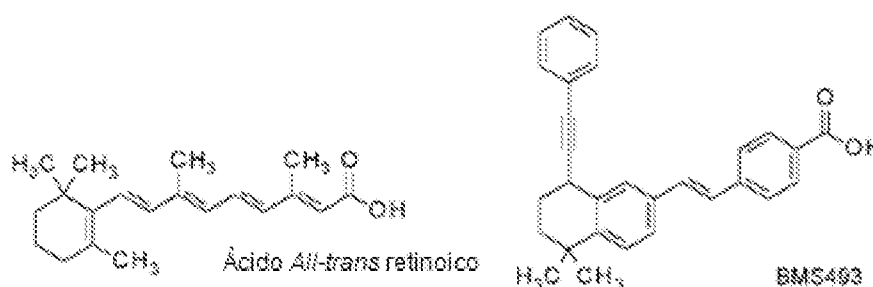
(Ejemplo 4) Validación de la relevancia entre la actividad agonística RAR y la actividad de inducción de la regeneración de las células de bastón

[Procedimiento]

A partir de los resultados del ejemplo 3, se descubrió que TTNPB tiene una actividad de inducción de regeneración de células de bastón. El TTNPB se conoce como agonista RAR. A continuación, se llevó a cabo la validación de compuestos de los que se sabía que actuaban sobre el RAR. El ensayo de verificación se realizó según el procedimiento del ejemplo 3 "1. Cribado del compuesto" en N = 8.

Los compuestos a verificar son un agonista del receptor de ácido retinoico endógeno, ácido *All-trans* retinoico (Sigma-Aldrich, Cat. No. R2625-50MG) y un antagonista de RAR, BMS493 (Sigma-Aldrich, Cat. No. B6688-5MG). A continuación se muestran sus estructuras químicas:

[Fórmula 2]



[Procedimiento de tratamiento de datos]

El procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el uso de Microsoft Excel 2010 (Microsoft Japan Co., Ltd.). La prueba de comparaciones múltiples de Dunnett se llevó a cabo mediante SAS9.3 para Microsoft Windows Workstation de 32 bits y el sistema cooperativo EXSUS Ver. 8.0. En la evaluación de la actividad de regeneración de las células de bastón, la tasa de activación (denominada activación (%)) de la luciferasa por estimulación de un compuesto se calculó de acuerdo con la siguiente expresión, y se mostraron un valor medio y un error estándar.

$$\text{Activación (\%)} = (\text{valor de medición del pocillo de muestra} \div \text{valor promedio del control DMSO}) \times 100$$

[Resultados]

Los resultados del ejemplo 5 se muestran en la figura 5. Un agonista endógeno del RAR, el ácido *All-trans* Retinoico (RA), mostró una actividad significativa de inducción de la regeneración de las células de bastón de forma dependiente de la concentración; mientras que el BMS493 inhibidor del RAR no mostró actividad de inducción de la regeneración de las células de bastón y su valor fue inferior al del control DMSO. En el caso del BMS493, el compuesto precipitó a una concentración de 30 µM y todos los peces murieron (de paro cardíaco) a una concentración de 100 µM. El BMS493 resultó ser tóxico.

(Ejemplo 5) Procedimiento para medir la actividad agonística de los RAR

[Procedimiento]

La actividad agonística de RAR se midió en el siguiente procedimiento. Los compuestos utilizados para la evaluación fueron tamibaroteno (Combi-Blocks, Cat. No. QA-6963), éster metílico de tamibaroteno (Sundia meditech, Cat. No. 82569), éster etílico de tamibaroteno (descrito en Org. Lett., 15, 3678-3681 (2013)), tazaroteno (Tokyo Kasei, Cat. No. T3108), ácido tazaroténico (obtenido por hidrólisis de tazaroteno con

referencia al procedimiento descrito en US6344463), adapaleno (Tokyo Kasei, Cat. No. 2549) y palovaroteno (Haoyuan Chemexpress Co., Ltd., Cat. No. HY-14799).

5 1) Las células HEK293A (Invitrogen), que coexpresan funcionalmente RAR α humano, RAR β humano y RAR γ humano, se prepararon agregando Lipofectamina (marca registrada) 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) a una construcción reportera de luciferasa de elemento de respuesta sintético RAR (3xDR5: luc) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual adjunto al kit. Los genes introducidos se muestran en la tabla 1.

10 2) Las células con los genes introducidos en ellas se recuperaron y se sembraron en una placa de 384 pocillos para obtener 2×10^5 células/ml; al mismo tiempo, se permitió que las células entraran en contacto con un compuesto (se repitió 10 veces la dilución cuádruple en serie a partir de una concentración máxima de 25000 nM).

3) Veinticuatro horas después de la exposición a un compuesto, se midió la luminiscencia de las células utilizando el kit de luminiscencia PICCA JEAN (marca registrada) (TOYO B-Net CO., LTD.) y Envision (PerkinElmer Corporation, Japón) (N = 4).

15 [Análisis]

El valor medio y la EC de luminiscencia (cps) se calcularon mediante el uso de Microsoft Excel 2010.

[Tratamiento de datos]

20 En la evaluación de la actividad agonística RAR, siempre que el valor de medición (Control negativo) de la luminiscencia de las células sin adición de un compuesto se determinara como 100 %, la actividad agonística RAR (%) de una sustancia de prueba se calculó de acuerdo con la siguiente expresión. Su valor medio se ha representado gráficamente en función de la concentración de una sustancia de prueba.

Activación agonística (%) = (valor de medición del pocillo de muestra + valor promedio del control DMSO) X 100

25 El índice para la intensidad de la actividad agonística de RAR se definió como sigue: para RAR α y RAR β , la concentración que presenta una cantidad de luminiscencia del 1000 % se definió como EC₁₀₀₀ basada en la luminiscencia del control Negativo; mientras que para RAR γ , la concentración que presenta una cantidad de luminiscencia del 500 % se definió como EC₅₀₀ basada en la luminiscencia del control Negativo. La EC₁₀₀₀ o la EC₅₀₀ se calculó a partir de la función GROWTH (regresión exponencial) utilizando concentraciones en dos puntos a cada lado de un punto que presentaba una cantidad de luminiscencia y actividad agonística RAR (%) por la sustancia de prueba del 1000 % o del 500 %.

30 [Resultados]

Los resultados de medición de los compuestos del ejemplo 5 se muestran en la tabla 2. Los compuestos presentaron actividades agonistas a cualquiera de los PARs de una manera dependiente de la concentración.

[Tabla 1]

	RAR α humano	RAR β humano	RAR γ humano
Proteína	receptor alfa del ácido retinoico	receptor beta del ácido retinoico	receptor gamma del ácido retinoico
Gen	RARA	RARB	RARG
Tipo	ADN	ADN	ADN
Origen	Homo sapiens	Homo sapiens	Homo sapiens
Secuencia	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7

35

[Tabla 2]

	RAR α EC1000 (nM)	RAR β EC1000 (nM)	RAR γ EC500 (nM)
Tamibaroteno	1,9	79	248
Éster metílico de tamibaroteno	0,91	29,1	72,8
Éster etílico de tamibaroteno	21,8	514	714
Tazaroteno	115	32	1858
Ácido tazaroténico	12	4,4	48
Adapaleno	12	6,9	54
Palovaroteno	101	132	34,9

(Ejemplo 6) Evaluación del efecto inductor de la regeneración de células de bastón de diversos agonistas RAR

5 **[Procedimiento]**

La actividad de inducción de regeneración de células de bastón de compuestos que presentan actividad agonística de RAR se evaluó en los siguientes procedimientos. A partir de la evaluación, se verificó la generalidad. Los compuestos utilizados para la evaluación fueron tamibaroteno (Combi-Blocks, Cat. No. QA-6963), éster metílico de tamibaroteno (Sundia meditech, Cat. No. 82569), éster etílico de tamibaroteno (descrito en Org. Lett., 15, 3678-3681 (2013)), tazaroteno (Tokyo Kasei, Cat. No. T3108), ácido tazaroténico (obtenido por hidrólisis de tazaroteno con referencia al procedimiento descrito en US6344463), adapaleno (Tokyo Kasei, Cat. No. 2549) y palovaroteno (Haoyuan Chemexpress Co., Ltd., Cat. No. HY-14799).

1) El día anterior a la recogida de los huevos, una pareja de pez cebra macho y hembra, es decir, un pez transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) y una de tipo salvaje, se colocaron en un tanque para la fecundación cruzada y se aislaron mediante un divisor.

2) A la mañana siguiente (8:00 - 11:00), se retiró el separador para que pudieran aparearse entre sí. Se recogieron los huevos fecundados. Por la tarde (16:00 - 18:00) del mismo día, sólo se seleccionaron los huevos fecundados normalmente desarrollados y se criaron en una placa para su crecimiento.

3) El tercer día después de la fecundación, los alevines se transfirieron al agua de cría, que contenía 10 mM de metronidazol (Sigma-Aldrich, Japón) y 1 % de DMSO (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), (preparado disolviendo 60 mg de océano instantáneo (Napco Limited (Japón)) en 1 l de agua destilada) y se criaron en condiciones de oscuridad durante 24 horas. De esta manera, la ablación se aplicó específicamente a las células de bastón de los alevines. En cambio, los alevines no ablacionados, que debían utilizarse como control, se transfirieron a un tanque con agua de cría, que contenía una solución de DMSO al 1 %, y se criaron.

4) En una placa de ensayo (se utilizó Tissue Culture Treated Black Isoplate-96 TC (PerkinElmer Co., Ltd. Japón)), se dispuso un compuesto de prueba, que se diluyó en serie para obtener datos a dos concentraciones a cada lado del 50 %, y DMSO como control, cada uno en una cantidad de 2,5 μ l/pocillo y se agregó además agua de huevo en una cantidad de 147,5 μ l/pocillo.

5) Los alevines ablacionados del día 4 después de la fecundación se lavaron bien con agua de huevo y se dispensaron en pocillos de la placa de ensayo que contenía un compuesto junto con 100 μ l de agua de huevo de forma que hubiera 2 individuos de alevines por pocillo.

6) Después de criar los alevines durante 2 días, se retiraron 200 μ l de agua de huevo y se agregó metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma-Aldrich Japón; 0,4 mg/ml, 10 μ l) para practicarles la eutanasia.

7) Se agregó Nano-Glo (marca registrada) Luciferase assay Substrate (Promega Corporation) a Nano-Glo (marca registrada) Luciferase assay buffer (Promega Corporation) en una proporción de 1:50 y se agregaron 100 μ l de la solución resultante a cada uno de los pocillos.

8) Se agitó con BIO-Mixer (Biotech Japan Co., Ltd.) durante una hora y se midió la luminiscencia de NanoLuc (marca registrada) con EnVision (PerkinElmer Co., Ltd. Japón).

[Análisis]

La tasa de aumento (denominada activación (%)) de la actividad luciferasa y un valor medio y EC₅₀ se calcularon mediante Microsoft Excel 2010.

[Tratamiento de datos]

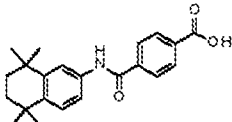
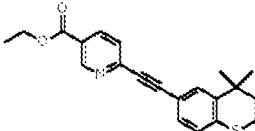
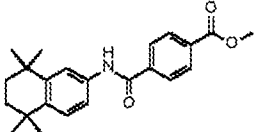
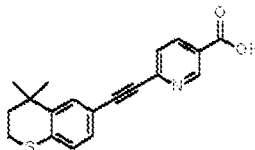
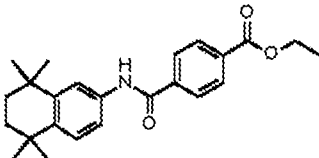
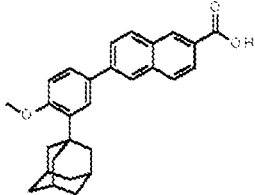
- 5 Al evaluar la actividad de regeneración de células de bastón, siempre que el valor de medición de la luminiscencia del pez cebra tratado con DMSO (compuesto de un control negativo) se especificara como 0 %, mientras que el valor de medición de la luminiscencia del pez cebra tratado con 1 µM de TTNPB (compuesto de un control positivo) se especificara como 100 %, la activación (% del control) se calculó como un índice de actividad de acuerdo con la siguiente expresión y se trazó un valor medio de la misma frente a la concentración de una sustancia de prueba. La concentración a la que se mostró una activación (% del control) del 50 % se definió como EC₅₀. La EC₅₀ se calculó por regresión lineal entre 2 puntos situados a ambos lados de un punto que presentaba una actividad de la sustancia de prueba del 50 %.

Activación (% del control) = (valor de medición del pocillo de muestra - valor promedio del control negativo) ÷ (valor promedio del control positivo - valor promedio del control negativo) X 100

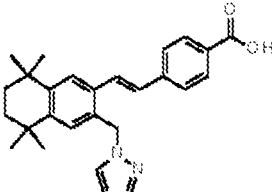
[Resultados]

- 15 Los resultados de ensayo del ejemplo 6 se muestran en la tabla 3. Todos los agonistas RAR presentaron una actividad significativa de inducción de la regeneración de forma dependiente de la concentración. Obsérvese que el valor de Adapaleno con un asterisco significa que la activación (% del control) a una concentración de 1000 nM (la concentración máxima evaluada) no alcanzó el 50 %. La activación a la concentración fue del 39 %.
- 20 De los agonistas RAR evaluados, el tamibaroteno y el éster etílico de tamibaroteno presentaron una fuerte actividad inductora de la regeneración de las células de bastón.

[Tabla 3]

Nombre	Estructura	EC ₅₀ (nM)	Nombre	Estructura	EC ₅₀ (nM)
Tamibaroteno		9,08	Tazaroteno		402
Éster metílico de tamibaroteno		85,4	Ácido tazaroténico		786
Éster etílico de tamibaroteno		4,90	Adapaleno		> 1000 *

(continuación)

Nombre	Estructura	EC50 (nM)	Nombre	Estructura	EC50 (nM)
Palovaroteno		1210			

(Ejemplo 7) Evaluación del efecto de regeneración de las células de bastón en el modelo de retinosis pigmentaria (confirmación del efecto)

- 5 Se prepararon peces modelo patológicos, en los que se puede observar la regeneración de células de bastón, utilizando pez cebra conocido como modelo de retinosis pigmentaria. El efecto de un compuesto se confirmó de acuerdo con el siguiente procedimiento. Como compuesto a evaluar, se utilizó TTNPB (Sigma-Aldrich, Cat. No. T3757-10MG).

10 [Preparación de un modelo patológico de pez cebra en el que se pueda observar la regeneración de las células de bastón].

- 1) Para preparar un modelo patológico, en el que se pueda observar la regeneración de las células de bastón, se utilizó el pez cebra Tg (rho: EGFP) (Hamaoka T1, Takechi M, Chinen A et al., Visualization of rod photoreceptor development using GFP-transgenic zebrafish. Genesis. 2002; 34 (3): 215-220; utilizado como pez informador de células de bastón) se cruzaron con peces cebra Tg (rho: hRHO (Q344X), omp: EGFP), que es un nombre bajo otro sistema de nomenclatura de un modelo de retinosis pigmentaria, es decir, pez cebra RH1: hRhodopsin (Q344X) (Nakao T, Tsujikawa M, Notomi S, Ikeda Y, Nishida K., "The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa", PLoS One., 2012; 7 (4): e32472). Los peces cebra obtenidos se especificaron como pez cebra (pez cebra patológico 1). Los peces cebra de control (peces cebra no patológicos) se obtuvieron cruzando peces cebra Tg (rho: EGFP) con peces cebra de tipo salvaje. El día anterior a la recogida de los huevos, se colocaron machos y hembras de pez cebra en un tanque para su cruce y se aislaron mediante un separador.

- 2) A la mañana siguiente (8:00 - 11:00), se retiró el separador para que pudieran aparearse entre sí. Se recogieron los huevos fecundados. Por la tarde (16:00 - 18:00) del mismo día, sólo se seleccionaron los huevos fecundados normalmente desarrollados y se criaron en una placa para su crecimiento.

- 3) En una placa de ensayo, se dispensaron un compuesto de ensayo y DMSO utilizado como control en una cantidad de 2,5 µl/pocillo (concentración final de DMSO 1 %), y además, se agregó agua de huevo en una cantidad de 147,5 µl/pocillo. Se repitió una prueba de cribado 8 veces (N = 8) con cada concentración.

- 4) Se dispensaron alevines del día 3 después de la fecundación de forma que hubiera 2 individuos de alevines por pocillo de una placa de ensayo que contenía un compuesto, junto con 100 µl de agua de huevo.

- 5) Después de criar los alevines durante 2 días, se retiraron 200 µl de agua de huevo y se agregó metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma-Aldrich Japón; 0,4 mg/ ml, 10 µl) para practicarles la eutanasia.

[Confirmación de la regeneración de células de bastón mediante microscopio láser confocal].

- La luminiscencia de EGFP expresada específicamente en células de bastón se observó mediante un microscopio láser confocal en el siguiente procedimiento.

- 1) Los peces cebra eutanasiados anteriormente se transfirieron a un tubo Eppendorf que contenía una solución tampón fosfato de paraformaldehído al 4 % y se agitaron a 4 °C durante toda la noche y se inmovilizaron.

- 2) Los peces cebra inmovilizados se transfirieron a un tubo Eppendorf que contenía agarosa al 0,75 % SeaPlaque (marca registrada) calentada hasta su disolución e incrustada en un portaobjetos de vidrio junto con agarosa al 0,75 % SeaPlaque (marca registrada).

3) Una vez solidificada la agarosa, se agregó un medio de montaje y se cubrió con un cubreobjetos para preparar una muestra que se observaría con un microscopio láser confocal.

4) Se tomó una imagen con un microscopio láser confocal en las siguientes condiciones:

Formato: 1024 × 1024

5 Velocidad: 400 Hz

Modo: Recuento de fotones

Tamaño de la etapa z: 3 µm

Volumen z: 250 µm

[Resultados]

10 Los resultados se muestran en la figura 6.

(A) muestra los resultados en peces cebra no patológicos (control). (B) muestra los resultados en el pez cebra no tratado con un fármaco. En (B) se observó una pérdida de las células de bastón en comparación con (A). (C) muestra los resultados en peces cebra patológicos aplicados con 1 µM de TTNPB. La recuperación del número de células de bastón se confirmó en (C) en comparación con (B).

15 **(Ejemplo 8) Evaluación del efecto de regeneración de las células de bastón en el modelo de retinosis pigmentaria (evaluación cuantitativa)**

Se prepararon recientemente modelos patológicos de pez cebra, en los que se puede evaluar cuantitativamente la regeneración de células de bastón, utilizando pez cebra conocido como modelo de retinosis pigmentaria. El efecto de los compuestos se verificó cuantitativamente de acuerdo con el siguiente procedimiento. Los compuestos utilizados para la evaluación fueron tamibaroteno (Combi-Blocks, Cat. No. QA-6963) y TTNPB (Sigma-Aldrich, Cat. No. T3757-10MG).

20 [Preparación de peces modelo patológicos en los que pueda realizarse una evaluación cuantitativa y procedimiento de evaluación del compuesto].

25 1) La evaluación cuantitativa de la regeneración de las células de bastón se llevó a cabo con el pez cebra (pez cebra patológico 2) obtenido mediante el cruce transgénico Tg (rho: NTR-NanoLuc, myl7: DsRed2) y Tg (rho: hRHO (Q344X), omp: EGFP). El día anterior a la recogida de los huevos, se colocaron machos y hembras de pez cebra en un tanque para la fecundación cruzada y se aislaron mediante un separador.

30 2) A la mañana siguiente (8: 00-11: 00), se retiró el separador para permitir que se acoplaran entre sí. Se recogieron los huevos fecundados. Por la tarde (16:00 - 18:00) del mismo día, sólo se criaron los huevos fecundados normalmente desarrollados y se criaron en una placa para su crecimiento.

3) En una placa de ensayo, se agregaron un compuesto de ensayo y DMSO como control, cada uno en una cantidad de 2,5 µl/pocillo (concentración final de DMSO: 1 %) y además se agregó agua de huevo en una cantidad de 147,5 µl/pocillo. Se repitió una prueba de cribado 8 veces (N = 8) con cada concentración.

35 4) Se dispensaron alevines del día 3 después de la fecundación de forma que hubiera 2 individuos de alevines por pocillo de una placa de ensayo que contenía un compuesto, junto con 100 µl de agua de huevo.

5) Después de criar los alevines durante 2 días, se retiraron 200 µl de agua de huevo y se agregó metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (Sigma-Aldrich Japón; 0,4 mg/ ml, 10 µl) para practicarles la eutanasia.

[Evaluación cuantitativa de la regeneración de las células de bastón.]

40 1) Ensayo de luciferasa Nano-Glo (marca registrada) Se agregó sustrato al tampón de ensayo de luciferasa Nano-Glo (marca registrada) en una proporción de 1: 50 y la mezcla se agregó a pocillos individuales de la placa preparada según el ejemplo 3, en una cantidad de 100 µl por pocillo.

2) Tras agitar durante una hora utilizando BIO-Mixer, se midió la luminiscencia de NanoLuc (marca registrada) utilizando Envision.

45 [Análisis]

El procesamiento de datos se llevó a cabo mediante el uso de Microsoft Excel 2010 (Microsoft Japan Co., Ltd.). Se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett utilizando SAS9.3 para Microsoft Windows Workstation de 32 bits y el sistema cooperativo EXSUS Ver. 8.0.

Se calcularon y mostraron el valor medio y el error estándar de luminiscencia (cps, recuento por segundo).

[Resultados]

Se confirmó que TTNPB y tamibaroteno inducen ambos una regeneración estadísticamente significativa de células de bastón de forma dependiente de la dosis en el modelo de retinosis pigmentaria (Figura 7).

5 **(Ejemplo de preparación 1) Preparación líquida**

Tamibaroteno (6 g), dextrosa monohidrato (cantidad adecuada para obtener isotonicidad), ácido cítrico monohidrato (1,05 g), hidróxido sódico (0,18 g) y agua para inyección (cantidad adecuada hasta que la solución completa alcance 1000 ml) se mezclan de acuerdo con un procedimiento rutinario.

(Ejemplo de preparación 2) Ungüento para los ojos

- 10 Al tamibaroteno (0,6 g) se le agrega y se mezcla una cantidad adecuada de parafina líquida. A la mezcla se le agrega vaselina oftálmica de forma que la cantidad total alcance los 100 g y se mezcla.

Aplicabilidad industrial

- 15 El número de células de bastón puede aumentarse induciendo la regeneración de células de bastón mediante la adición de un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico, con el resultado de que la retinosis pigmentaria, etc., puede tratarse y/o prevenirse de forma sencilla. El compuesto es útil como medicamento.

Lista de secuencias Texto libre

SEQ ID NO: 1: Secuencia de nucleótidos del sitio promotor de rho del pez cebra

SEQ ID NO: 2: Secuencia de nucleótidos del sitio promotor de myl7 del pez cebra

- 20 SEQ ID NO: 3: Secuencia de nucleótidos de la proteína NTR-NanoLuc

SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos de la proteína DsRed2

SEQ ID NO: 5: Secuencia de nucleótidos del RAR α humano

SEQ ID NO: 6: Secuencia de nucleótidos del RAR β humano

SEQ ID NO: 7: Secuencia de nucleótidos del RAR γ humano

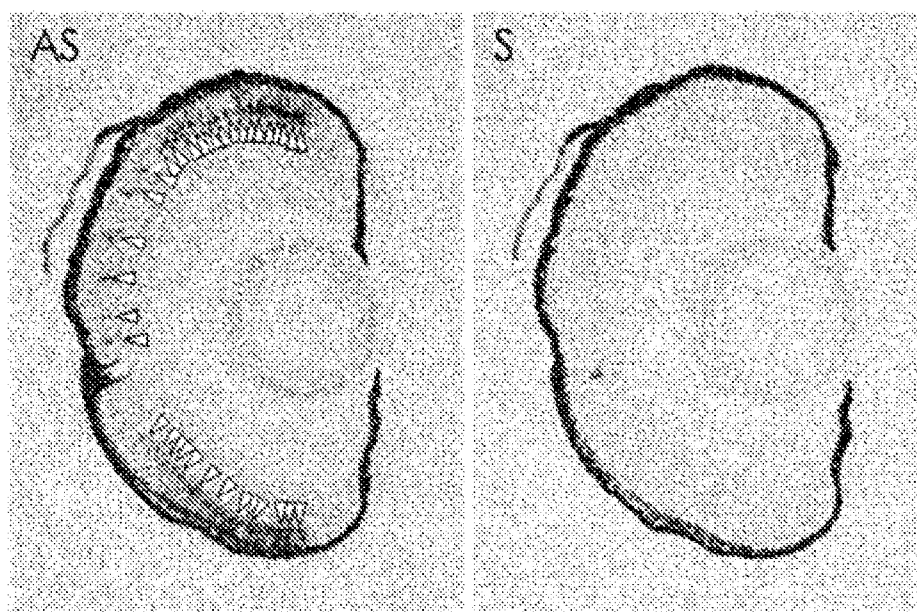
25

REIVINDICACIONES

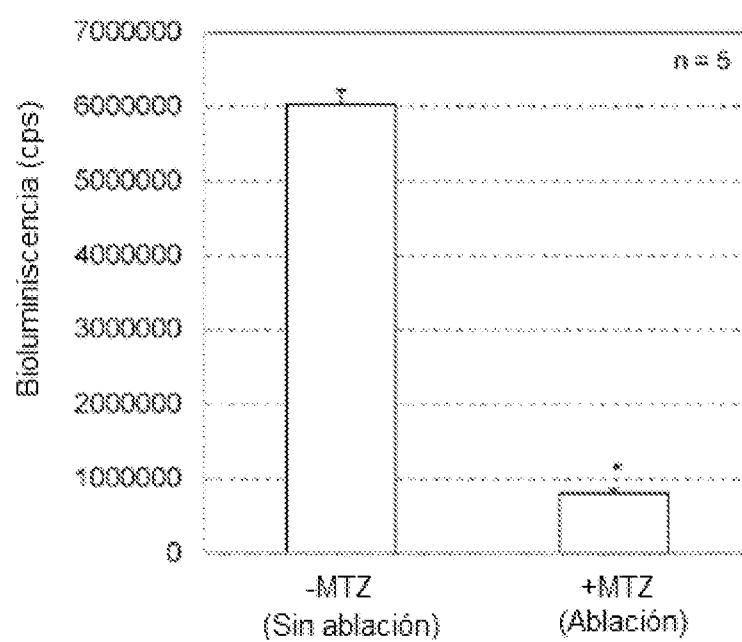
1. Un compuesto que tiene una actividad agonista del receptor de ácido retinoico o una sal del mismo para su uso en la inducción de la regeneración de células de bastón, en el que:

- 5 el compuesto o sal del mismo es para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, cuyo síntoma se mejora mediante la inducción de la regeneración de las células de bastón, en la que la enfermedad es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, enfermedad de Best, segregación retiniana juvenil ligada al cromosoma X, distrofia macular oculta y distrofia corioidea anular central; y
- 10 el compuesto es tamibaroteno, éster metílico de tamibaroteno o éster etílico de tamibaroteno.
2. El compuesto o sal del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad es retinosis pigmentaria o degeneración macular asociada a la edad.
3. El compuesto o sal del mismo para su uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad es retinosis pigmentaria.
- 15 4. El compuesto o sal del mismo para su uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el compuesto es tamibaroteno.
5. El compuesto o sal del mismo para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el compuesto se administra por vía tópica al ojo.
- 20 6. El compuesto o sal del mismo para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el compuesto se administra en combinación con un componente de formulación farmacéuticamente aceptable.

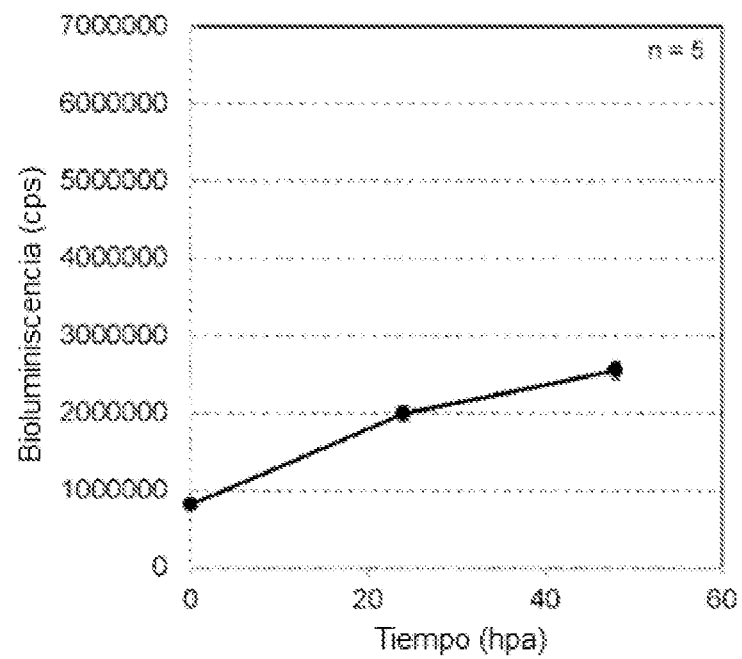
[Figura 1]



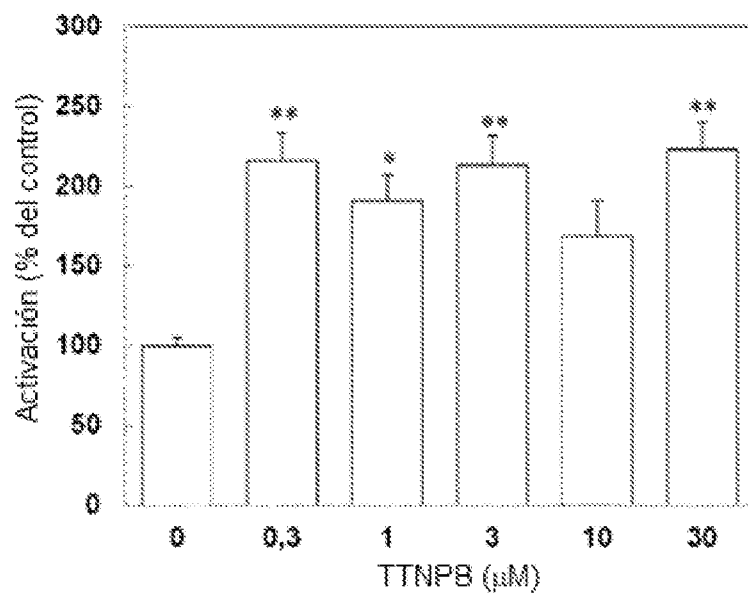
[Figura 2]



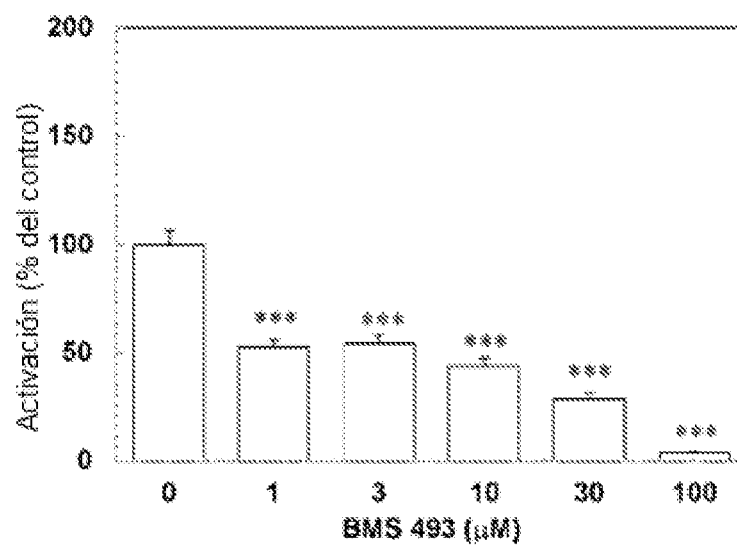
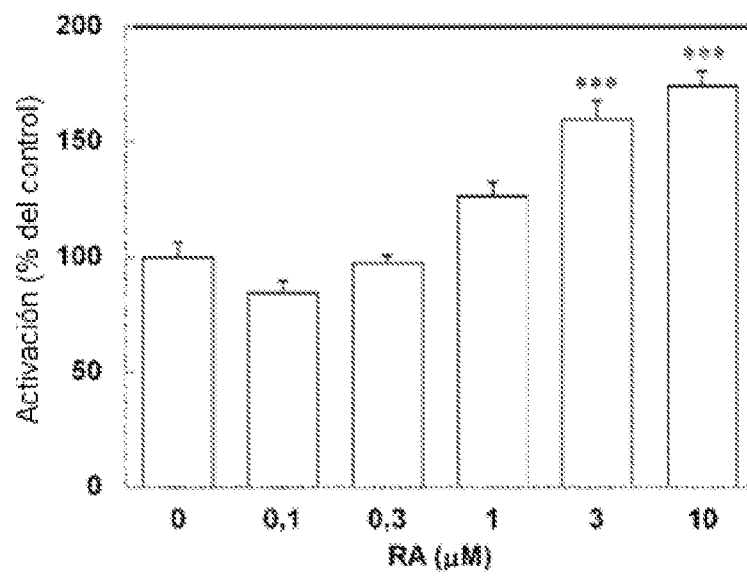
[Figura 3]



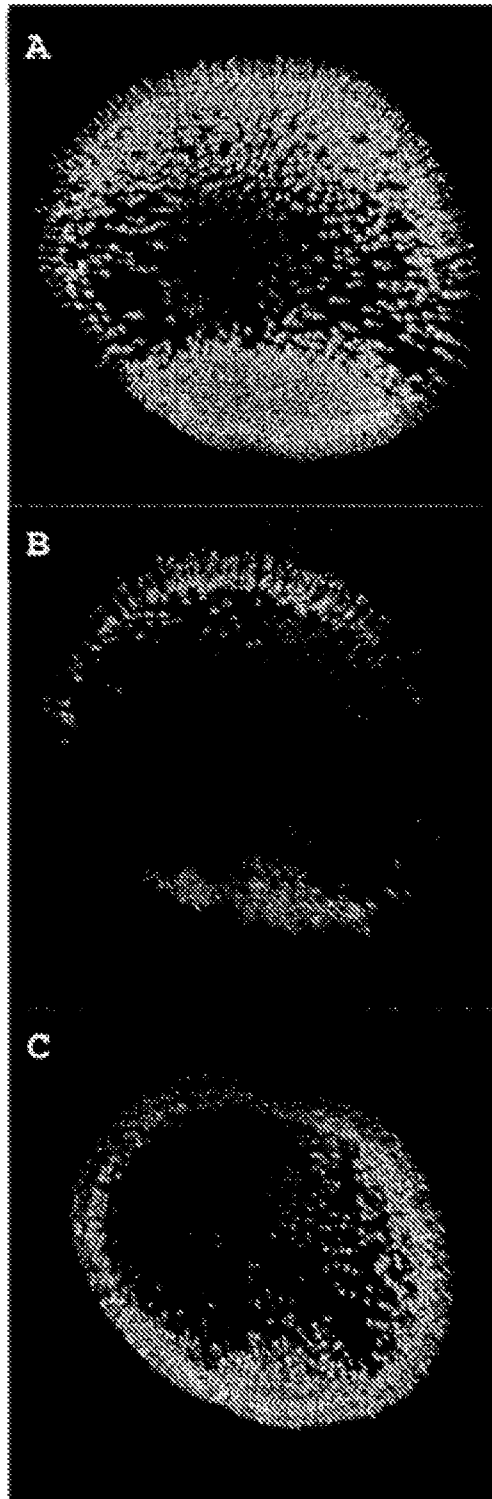
[Figura 4]



[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]

