

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 337**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088	(2006.01)	G01N 33/15	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01)	C12Q 1/04	(2006.01)
A61K 31/575	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)	A61P 27/10	(2006.01)
A61K 31/472	(2006.01)	A61K 31/235	(2006.01)
A61K 31/4706	(2006.01)		
A61K 31/365	(2006.01)		
A61K 31/192	(2006.01)		
A61K 31/155	(2006.01)		
G01N 33/50	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2018** **PCT/JP2018/008554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018** **WO18164113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2018** **E 18764652 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 3593817**

54 Título: **Composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía**

30 Prioridad:

06.03.2017 JP 2017041349

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

17.02.2025

73 Titular/es:

TSUBOTA LABORATORY, INC. (100.00%)
CRUK Shinanomachi E7, Bldg. 2, 9th Fl.Keio
University Shinanomachi Campus35
Shinanomachi
Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, JP

72 Inventor/es:

IKEDA SHINICHI;
JIANG XIAOYAN;
TSUBOTA KAZUO y
KURIHARA TOSHIHIDE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 997 337 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

Composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un agente para suprimir la miopía.

Técnica anterior

10 Se dice que las personas de Asia oriental tienen una mayor proporción de miopía que los occidentales y que para los japoneses, al menos aproximadamente 1/3 de la población, es decir, aproximadamente 40 millones de personas tienen miopía. No obstante, el mecanismo molecular de aparición y progresión de la miopía no se ha aclarado en absoluto, y se realizan correcciones con gafas o lentes de contacto aunque el tratamiento radical no está disponible.

15 La miopía se refiere a una condición en la que una imagen se enfoca delante de la retina y, por tanto, no se puede ver con claridad. La miopía se puede clasificar ampliamente en dos tipos: miopía refractiva provocada por un índice de refracción demasiado alto de la córnea y el cristalino; y miopía axial causada por una longitud axial demasiado larga del ojo, que es una longitud en la dirección de ida y vuelta del globo ocular. La miopía refractiva se refiere a una condición en la que una imagen se enfoca frente a la retina debido a que el grosor del cristalino, que funciona como una lente, no está correctamente ajustado. La miopía axial se refiere a una condición en la que una imagen se enfoca delante de la retina incluso cuando el cristalino se ajusta suficientemente delgado debido a una longitud axial demasiado larga del ojo (véase "Miopía axial" en la figura 1). La mayoría de los pacientes con miopía sufren de miopía axial.

25 La miopía axial fuerte, es decir, una condición llamada miopía excesiva aumenta el grado de extensión del eje ocular. Como resultado, la retina y la coroides se alargan hacia atrás y, por tanto, se aumenta la carga sobre ellas, causando diversas anomalías en el fondo de ojo. Una condición en la que se produce una anomalía en el fondo de ojo se denomina miopía patológica y es la principal causa de ceguera en los países desarrollados. El Ministerio de Sanidad, Trabajo y Bienestar Social informó de que en Japón, la cuarta enfermedad causante de la ceguera es la miopía patológica (2005 MHLW Retinal Choroidal Optic Atrophy Research Report). Aunque la miopía patológica puede provocar ceguera, actualmente no se dispone de un tratamiento eficaz y existe la necesidad de establecer un tratamiento.

35 Las investigaciones convencionales sobre la miopía se han llevado a cabo induciendo la miopía a animales como el pollito, la musaraña arborícola y el conejillo de Indias (Documento de no patente 1). Entre otros, el pollito se usa con frecuencia como animal modelo para la investigación de la miopía porque tiene ventajas como ser diurno, ojos relativamente grandes y fáciles de manejar. El pollito se sigue utilizando actualmente como el principal modelo de miopía incluso después de que hayan pasado más de 35 años desde que se introdujo el modelo de miopía que utiliza pollitos. Además del pollito, se utilizan diversos animales en la investigación de la miopía, incluyendo la musaraña arborícola, tití, conejillo de indias, mono rhesus o similares. Sin embargo, no es fácil realizar manipulación génica para ninguno de estos animales y, por tanto, ninguno de ellos es adecuado para la investigación de elementos genéticos para la miopía. Debido a que la frecuencia de aparición de miopía tiene una diferencia étnica como se ha descrito anteriormente, se considera que la aparición de miopía depende en gran medida del elemento ambiental, así como del elemento genético. Sin embargo, la falta de animales para modelos de miopía inducida que permitan la investigación de elementos genéticos contribuye al hecho de que aún no se ha establecido un tratamiento para suprimir la miopía.

50 En los últimos años, se han informado modelos de miopía de ratón, y se espera el progreso de la investigación genética de la miopía. Aunque inicialmente se dudaba de si era posible inducir la miopía en un ratón usando una lente negativa como en el pollito porque el ratón es nocturno, se han preparado modelos de miopía inducida en ratones usando una lente negativa (documento de no patente 2).

55 ZHOU, S. y col.: "ER stress mediate crystalline alpha A alteration in high myopia related cataract", Investigative Ophthalmology and Visual Science, vol. 55, n.º 13, 2014, página 4054, El documento XP009516554, se refiere a la mediación de la alteración del cristalino alfa A en la catarata relacionada con la alta miopía. El documento de patente 3 divulga agentes para la prevención del alargamiento del globo ocular y la prevención de la miopía. El documento de patente 4 divulga inhibidores de Rho quinasa para su uso en la prevención y el tratamiento de la miopía axial.

60 **Documentos de patente**

Documento de patente 1: WO2015/064768

Documento de patente 2: Traducción al japonés de la solicitud internacional PCT n.º 2013-534902

Documento de patente 3: WO2016/171282 Documento de patente 4: WO2010/010702

65

Documentos de no patente

Documento de no patente 1: Schaeffel F. y Feldkaemper M., 2015, Clin. Exp. Optom., Vol. 98, páginas 507-517
 Documento de no patente 2: Tkatchenko T. V. y col., 2010, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., Vol. 51, páginas 1297-1303
 Documento de no patente 3: Kolb P. S. y col., 2015, Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 61, páginas 45-52
 Documento de no patente 4: Chen Y. y col., 2016, Scientific Reports, 6: 27486, DOI: 10. 1038/srep 27486
 Documento de no patente 5: Hatz C. y col., 2013, Nature Rev. Drug Discov. Vol. 12, páginas 703-719
 Documento de no patente 6: Hetz C., 2012, Nature Rev. Mol. Cell Biol., Vol. 13, páginas 89-102
 Documento de no patente 7: Guillén C., 2016, Ann. Transl. Med. Supl. 1, S45
 Documento de no patente 8: Gu Y. y col., 2012, Acta Pharmacol. Sinica, Vol. 33, páginas 941-952
 Documento de no patente 9: Liu H. y col., 2016, Evidence-Based Comple. Alter. Med., Vol. 2016, ID de artículo 7831282

Sumario de la invención

Problemas a resolver por la invención

Sin embargo, los modelos de ratón informados actualmente no satisfacen todos los síntomas conocidos como los síntomas de la miopía humana excesiva. En otras palabras, los modelos no satisfacen los síntomas tales como el grado de extensión de la longitud del eje ocular, el índice de refracción, o que la esclerótica sea más fina que en el estado normal. Por tanto, los modelos están incompletos como un modelo de miopía. La presente invención tiene como objetivo preparar un modelo de ratón que tenga miopía que se parezca mucho a los síntomas de la miopía humana excesiva. Como se describe en el modelo en el documento de no patente 2, los modelos de ratón convencionales incluyen una lente suturada a la piel, y además reforzada y fijada con adhesivo para que no se pueda separar fácilmente. Por tanto, es difícil observar el cambio a lo largo del tiempo asociado con la progresión de la miopía. La presente invención también tiene como objetivo analizar el proceso de progresión de la miopía usando el modelo de ratón con miopía inducida, buscar un agente terapéutico para la miopía basándose en el conocimiento obtenido, y obtener un agente terapéutico para suprimir la miopía.

Medios para resolver los problemas

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía como se especifica en la reivindicación 1.

La composición de acuerdo con la presente invención puede ser opcionalmente como se especifica en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

Efecto de la invención

Se ha preparado un modelo de ratón con miopía inducida que incluye síntomas similares a los observados en la miopía excesiva humana. Debido a que las tecnologías de manipulación de genes están más disponibles para un ratón en comparación con otros animales, se puede proporcionar una buena herramienta para investigar los factores genéticos de la miopía. Además, los resultados del análisis del ratón modelo han revelado que la inducción de miopía provoca estrés reticular endoplásmico en la esclerótica. Asimismo, se ha demostrado que el estrés reticular endoplásmico induce la miopía porque la provisión de estrés reticular endoplásmico induce la miopía. De forma adicional, los experimentos que utilizan el modelo de ratón con miopía inducida han revelado que el supresor de estrés reticular endoplásmico es eficaz para la supresión de la miopía. Por lo tanto, se ha hecho posible proporcionar un agente terapéutico para la miopía en el que no había estado disponible previamente ningún tratamiento eficaz.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 son vistas esquemáticas que muestran un método para preparar un modelo de ratón con miopía inducida.

La figura 2 son gráficos que muestran cambios en un valor refractivo, una longitud axial del ojo y la esclerótica en el modelo de ratón con miopía inducida.

La figura 3 son imágenes de microscopía electrónica que muestran cambios en la esclerótica en el modelo de ratón con miopía inducida.

La figura 4 son gráficos que muestran los efectos del fenilbutirato de sodio (4-PBA) como supresor de estrés reticular endoplásmico en la inducción de miopía, mostrando la figura 4A cambios en el valor refractivo, mostrando la figura 4B cambios en la longitud axial del ojo, y mostrando la figura 4C cambios en la longitud axial del ojo una semana y tres semanas después de llevar puesta la lente.

La figura 5 son gráficos que muestran los efectos del ácido tauroursodesoxicólico como supresor de estrés reticular endoplásmico en la inducción de miopía.

La figura 6 son gráficos que muestran los efectos del fenilbutirato de sodio en la inducción de la miopía mediante gotas para los ojos.

La figura 7 son gráficos que muestran los resultados del análisis de la miopía inducida por el inductor de estrés reticular endoplásmico.

La figura 8 son gráficos que muestran los efectos de los compuestos que inhiben las trayectorias de señal de diferentes sensores de estrés reticular endoplásmico, mostrando la figura 8A resultados del análisis de un valor refractivo, y mostrando la figura 8B resultados del análisis de la longitud axial del ojo.

Realizaciones de la invención

Los inventores han demostrado por primera vez que la inducción de miopía provoca estrés reticular endoplásmico en la esclerótica. Se ha sabido previamente que el estrés reticular endoplásmico afecta a las células endoteliales corneales, lo que causa diversas enfermedades (Documento de Patente 1). Sin embargo, no se ha informado previamente que la miopía se correlacione con el estrés reticular endoplásmico y que el estrés reticular endoplásmico induzca la miopía. Asimismo, los inventores han descubierto por primera vez el hecho de que el supresor de estrés reticular endoplásmico suprime la progresión de la miopía.

Además, los modelos de miopía inducida en se han preparado previamente con diversos animales, y también se ha informado de un modelo de ratón con miopía inducida (Documentos de no patente 1 y 2). Sin embargo, no se ha informado previamente de un modelo que muestre todos los síntomas equivalentes a los de la miopía humana, es decir, cambios en el valor refractivo, en la longitud axial del ojo y en la esclerótica. Un modelo de ratón que muestra síntomas similares a los de humanos se ha preparado por el método de los inventores por primera vez. Por tanto, se ha vuelto posible investigar factores genéticos de la miopía que no se han revelado previamente, permitiendo la detección de medicamentos para el tratamiento radical de la miopía. En realidad, los inventores han descubierto que el supresor de estrés reticular endoplásmico suprime la inducción de miopía en el modelo de ratón.

En la detección del agente de prevención y supresión de la miopía, los compuestos candidatos pueden administrarse en cualquier momento. En otras palabras, la administración de los compuestos candidatos puede iniciarse justo después de iniciar la inducción de miopía, o después de iniciar la inducción de miopía y después de que se reconozca un cierto grado de síntoma de miopía axial. Además, el período y el momento de administración también se pueden determinar según sea apropiado dependiendo de los compuestos candidatos.

El supresor de la miopía se administra en este caso mediante administración intraperitoneal y gotas para ojos, aunque puede adoptarse cualquier forma de administración. Específicamente, la administración por inyección, puede usarse la aplicación mediante gotas para los ojos o ungüentos para los ojos, o la administración oral. Por lo tanto, la forma de dosificación puede incluir, además de la inyección, gotas para ojos, ungüentos para ojos, o aquellas adecuadas para medicina interna, tales como comprimidos o cápsulas. Particularmente, son preferibles las gotas para ojos o los ungüentos para ojos porque se pueden aplicar directamente en los ojos.

Además, el supresor de estrés reticular endoplásmico incluye aquí fenilbutirato de sodio (ácido 4-fenilbutírico; 4-PBA), aunque pueden usarse sales farmacológicamente aceptables distintas de este compuesto. Las sales farmacológicamente aceptables incluyen una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo y una sal de adición de una amina o de un aminoácido básico.

Fuera del alcance de la invención reivindicada, se puede usar cualquier agente que pueda suprimir el estrés reticular endoplásmico. Se dice que los acompañantes químicos, tales como fenilbutirato de sodio, ácido tauroursodesoxicólico y trehalosa, que contribuyen a la formación y estabilización de la estructura de orden superior de la proteína, pueden reducir el estrés reticular endoplásmico. De forma adicional, las señales aguas abajo de los sensores de estrés reticular endoplásmico pueden inhibirse para suprimir la señal de estrés reticular endoplásmico (Documentos de no patente 3 a 5). Sin embargo, a pesar de tener diferentes mecanismos de acción, cualquier compuesto que tenga acciones para reducir el estrés reticular endoplásmico o suprimir las señales de los sensores de estrés reticular endoplásmico puede actuar como agentes de prevención y supresión de la miopía.

El estrés reticular endoplásmico es detectado por tres sensores de estrés que luego transmiten las señales aguas abajo para que las proteínas desplegadas no se acumulen en exceso. Se sabe que los sensores de estrés reticular endoplásmico incluyen tres trayectorias: trayectoria PERK (quinasa de retículo endoplásmico similar a PKR); trayectoria IRE1 (Inositol que requiere 1); y trayectoria ATF6 (Factor de transcripción activador 6) (Documento de no patente 6). Por lo tanto, se puede usar un agente que reduzca el estrés reticular endoplásmico inhibiendo la transferencia de señal en cualquiera de esas trayectorias.

Un agente de este tipo incluye Salubrinal, Guanabenz, GSK2606414, GSK2656157, inhibidor de respuesta al estrés integrado (ISRIB), STF-083010, MKC-3946, Toyocamicina, Nelfinavir, Sunitinib, 4μ8C (7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopiran-8-carboxaldehído), o similares (Documento de no patente 5). Entre otros, los agentes de la trayectoria PERK y la trayectoria ATF6 son efectivos como se describe en los ejemplos. Por lo tanto, los inhibidores de la trayectoria PERK tales como Salubrinal, Guanabenz, GSK2606414, GSK2656157 e ISRIB pueden funcionar como supresores de miopía eficaces. De forma adicional, el Documento de patente 2 divulga inhibidores de PERK que incluyen GSK2606414 y GSK2656157. Debería apreciarse que también pueden usarse los inhibidores descritos en el Documento de Patente 2. Sin embargo, la presente invención se limita a los compuestos reivindicados.

Además, se cree que la azoramida y la arctigenina pueden inhibir el estrés reticular endoplásmico más aguas arriba (Documentos de no patente 7 y 8). Por lo tanto, fuera del alcance de la invención reivindicada, también se considera que estos agentes actúan como supresores de la miopía.

Además, fuera del alcance de la invención reivindicada, los compuestos naturales incluidos en una planta o similares, tales como Astragalósido IV, Baicaleína, Berberina, Crosina, Elatósido C, Ginsenósido Rb1, Honokiol, Ikariin, Mangiferina, Notoginsenosido R1 y Pterostilbeno pueden ser los compuestos que suprimen el estrés reticular endoplásmico (Documento de no patente 9).

[Ejemplo 1] Preparación del modelo de ratón con miopía inducida

En primer lugar, a continuación se proporcionará una descripción con respecto a un método para preparar un modelo de ratón de la presente invención. La figura 1 muestra esquemáticamente un mecanismo en el que se lleva una lente negativa para inducir la miopía axial. La emetropía se refiere a una condición en la que los rayos paralelos que entran en los ojos se enfocan en una imagen en la retina y, por tanto, se pueden ver imágenes claramente. Por otra parte, la miopía axial se refiere a una condición en la que los rayos paralelos que entran en los ojos se enfocan en una imagen delante de la retina debido a la larga longitud axial del ojo y, por tanto, no se puede ver con claridad. Los ojos de los animales, incluyendo un ser humano, se agrandan con la edad. Si se usa un ratón joven con una lente negativa, el eje ocular se extenderá hasta la posición en la que se enfoca una imagen cuando se usa la lente negativa, es decir, la condición en la que se puede ver claramente con la lente negativa puesta. Como resultado, el eje ocular se extiende, resultando en una condición ocular similar a la miopía axial.

Específicamente, el modelo de ratón con miopía inducida se prepara de la siguiente manera. Debido a que es más fácil inducir la miopía en un ratón joven, es preferible montar la lente negativa lo antes posible después del destete. Aquí se usa un C57BL6J de 3 semanas. El ratón se anestesia con tres tipos de anestesia mixta de Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), Betorphan (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.) y Midazolam (Sandoz K. K.). A continuación, el cráneo se abre con unas tijeras. Se erige un poste 1 en el cráneo y se fija con cemento dental (Super-Bond, Sun Medical Co., Ltd.). El poste se rosca para fijar un instrumento de ajuste descrito más adelante con una tuerca.

Para inducir la miopía, en un lado se monta una lente negativa de -30 dioptrías (D) (Rainbow contact, Rainbow Optical Laboratory Co., Ltd.) 2, y en el otro lado se monta una lente de 0D o sólo una montura 3 como control. Un protector 4 que tiene una forma proyectada lateralmente está montado en una parte de montura en la porción inferior de la lente para evitar que el ratón dañe la lente con sus patas delanteras o similares cuando se monta la lente en el ratón. El protector 4 evita que el ratón toque la lente, sin causar daños en la lente. El protector 4 utilizado aquí está montado en la parte de montura e integrado a la misma, aunque no es necesario que esté integrado en la lente siempre que el comportamiento del ratón no dañe la lente. Por ejemplo, puede tener una forma como un collar isabelino usado por animales heridos.

Un instrumento de ajuste 5 está unido a una parte de montura en la parte superior de la lente para ajustar la anchura y el ángulo de la lente montada en respuesta al crecimiento del ratón. El instrumento de ajuste 5 se pliega en forma de pata de perro. El instrumento de ajuste 5 incluye un lado montado con la lente y el otro lado provisto de una ranura 6 para montar el instrumento de ajuste 5 en el poste 1 erigido en la cabeza. Poner el poste 1 sobre la ranura 6 y atornillarlo con una tuerca 7 puede adherir y fijar el instrumento de ajuste 5 a la piel sin comprimir la periferia de ambos ojos del ratón.

Un mecanismo de ajuste que incluye tres partes, el poste 1, la tuerca 7 y el instrumento de ajuste 5 puede ajustar la anchura y el ángulo para llevar la lente a la posición del ojo del ratón en respuesta al crecimiento del ratón. Además, debido a que la lente es desmontable, es posible medir el cambio a lo largo del tiempo de la longitud axial del ojo y el valor refractivo. Como se ha descrito anteriormente, en los modelos convencionales, es imposible observar el cambio a lo largo del tiempo en la progresión de la miopía, mientras que en este modelo de miopía inducida, la lente se puede separar fácilmente y, por tanto, es posible analizar la progresión de la miopía con más detalle.

El ojo izquierdo se usó solo con una montura como control y el ojo derecho se usó con una lente de -30 D durante tres semanas. El valor refractivo, la longitud axial del ojo y el grosor de la esclerótica se midieron para encontrar las diferencias entre antes y después de usarlos. El valor refractivo se midió con un refractómetro (fotorrefractor infrarrojo para ratones, fabricado por el profesor Schaeffel, Universidad de Tubinga). La longitud axial del ojo se midió con un SD-OCT (tomografía de coherencia óptica de dominio espectral, Envisu R4310, Biophtigen Inc.). El espesor de la esclerótica se midió obteniendo una imagen óptica de una pieza de parafina teñida con hematoxilina y eosina (HE) mediante un microscopio óptico (BX53, Olympus Corporation) y luego usando un software de formación de imágenes cellSens. Los resultados se analizaron con ANOVA, Turkey HSD.

Como se muestra en la figura 2, se reconocieron diferencias significativas en cualquiera del valor refractivo, la longitud axial del ojo y el grosor de la esclerótica para los ojos con miopía inducida con la lente de -30 D frente al control (en la figura, * indica $p < 0,05$ y ** indica $p < 0,01$, lo mismo en las siguientes figuras también). También para el grosor de la esclerótica, se observó que, independientemente de la distancia desde el disco óptico, los ojos miopes tienen un grosor

de esclerótica más fino que los ojos normales.

Los modelos de miopía inducida informados anteriormente no satisfacen todos los síntomas de la miopía excesiva informados en un ser humano, tales como cambios en el valor refractivo, en la longitud axial del ojo y en la esclerótica.

- 5 Por el contrario, el modelo de miopía inducida preparado en este ejemplo incluye todas las características de la miopía axial humana, indicando que puede ser un modelo excelente. Puede deberse a que en este modelo de miopía inducida, es posible ajustar con precisión la posición de la lente en asociación con el crecimiento, y además inducir la miopía axial de manera más significativa con un protector para proteger la lente para evitar daños en la lente.

10 [Ejemplo 2] Detección del agente terapéutico usando el modelo de ratón con miopía inducida

Para investigar la condición patológica del modelo de miopía inducida con más detalle, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (TEM) para el análisis. Un globo ocular que se usó con una lente negativa durante tres semanas y al que se le indujo miopía axial y un globo ocular que se usó solo con una montura como control se
15 extrajeron de un ratón y luego se fijaron en glutaraldehído al 2,5 %/solución salina fisiológica durante una hora a 4 °C. La córnea se extrajo y se fijó posteriormente en glutaraldehído al 2,5 %/solución salina fisiológica durante la noche. A continuación, se incrustó en Epok 812 (Okenchoji Co., Ltd.) y se seccionó finamente para su observación bajo TEM (JEM-1400 plus, JEOL Ltd.). En la figura 3, la parte superior muestra el control y la parte inferior muestra la esclerótica de la muestra del ratón que llevaba la lente de -30 D y al que se le indujo la miopía. La escala es de 1,0 µm, 500 nm
20 y 500 nm de izquierda a derecha.

La imagen superior del control muestra que la mayor parte de la esclerótica de ratón consiste en fibra de colágeno y fibroblastos. El fibroblasto en el control es rico en mitocondrias y en retículo endoplásmico de superficie rugosa (indicado por las flechas superiores). Por otra parte, se observó un número de retículo endoplásmico vacuolar (ER)
25 extendido (indicado por las flechas inferiores) en la esclerótica del ratón con miopía inducida usando la lente negativa, lo que sugiere que se produce el estrés reticular endoplásmico.

(1) Efectos del fenilbutirato de sodio como supresor de estrés reticular endoplásmico

30 Los resultados de la observación bajo el microscopio electrónico sugirieron que la inducción de la miopía provoca el estrés reticular endoplásmico. Después, se realizó un análisis para comprobar la supresión de la inducción de miopía mediante la administración del supresor de estrés reticular endoplásmico. Como supresor de estrés reticular endoplásmico, se administró fenilbutirato de sodio (Cayman Chemical Company) en una dosis de 200 mg/kg/día por vía intraperitoneal diariamente desde dos días hasta 21 días después de llevar puesta la lente, y en el día 21 se midió
35 el valor refractivo y la longitud axial del ojo. Obsérvese que solo se administró solución salina tamponada con fosfato (PBS) al grupo de control.

La figura 4A muestra la variación en el valor refractivo. En el grupo al que se administró PBS como control, cuando se usó la lente de -30 D, se reconocieron cambios significativos en el valor refractivo. No obstante, en el grupo al que se
40 administró fenilbutirato de sodio (4-PBA), no se reconocieron cambios en el valor refractivo entre los ojos que llevaban la lente de -30 D y los ojos que solo llevaban montura, lo que indica que el fenilbutirato de sodio tiene un efecto de supresión de la miopía.

La figura 4B muestra cambios en la longitud axial del ojo. En el grupo administrado con fenilbutirato de sodio, cuando se comparó la longitud axial del ojo entre los ojos que llevaban la lente negativa y los ojos que solo llevaban montura como control, no se reconoció ninguna diferencia en la extensión. Por otra parte, en el grupo al que se administró PBS,
45 la longitud axial del ojo de los ojos que llevaban la lente negativa se extendió significativamente incluso frente al grupo que usó la lente negativa en el grupo al que se administró fenilbutirato de sodio.

A continuación, se mostrará que la longitud axial del ojo se extiende en respuesta al crecimiento, mientras que el fenilbutirato de sodio no suprime la extensión del eje ocular asociada con el crecimiento. La figura 4C muestra la longitud axial del ojo una semana y tres semanas después de llevar puesta la lente. Los ojos que llevaban la lente negativa en el grupo al que se administró PBS mostraron, una semana después de usar la lente, extensiones
50 significativas frente a los ojos de control que no llevaban la lente y los ojos que llevaban la lente y los ojos que no llevaban la lente en el grupo al que se administró fenilbutirato de sodio. La longitud axial del ojo a las tres semanas después de comenzar a usar la lente se extendió más que la longitud axial del ojo una semana después de comenzar a montar la lente, en cualquier grupo también. Incluso el grupo al que se administró fenilbutirato de sodio mostró el mismo grado de extensión que la longitud axial del ojo en los ojos con solo montura en el grupo al que se administró
55 PBS, lo que indica que el fenilbutirato de sodio no afecta a la extensión de la longitud axial normal del ojo asociada con el crecimiento.

El fenilbutirato de sodio es un agente que ya se permite aplicar al trastorno del ciclo de la urea y, por tanto, también se verifica su seguridad para un ser humano. Además, dado que también es obvio, como se ha descrito anteriormente,
60 que el fenilbutirato de sodio no impide la extensión de la longitud axial normal del ojo, es muy prometedor como agente para suprimir la progresión de la miopía excesiva.

(2) Efectos del ácido tauroursodesoxicólico como supresor de estrés reticular endoplásmico (ejemplo de referencia)

A continuación, se analizaron los efectos del ácido tauroursodesoxicólico, también conocido como supresor de estrés reticular endoplásmico. Como en el Ejemplo 1, se usó un ratón C57BL6J macho de 3 semanas de edad para el análisis. El ojo derecho del ratón llevó una lente de -30 D y el ojo izquierdo llevó solo con una montura. Desde el día en que se usó la lente, se administraron 100 mg/kg de ácido tauroursodesoxicólico (Sigma-Aldrich Co. LLC) una vez al día mediante administración intraperitoneal ($n = 4$), y se administró intraperitonealmente la misma cantidad de PBS al grupo de control ($n = 4$). Antes y una semana después de usar la lente, se midieron la longitud axial del ojo y el valor refractivo para calcular la variación. La figura 5 muestra cambios en el valor refractivo a la izquierda y cambios en la longitud axial del ojo a la derecha.

En el grupo al que se administró PBS como control, se reconocieron cambios en el valor refractivo entre los ojos que llevaban la lente de -30 D y los ojos que solo llevaban montura. No obstante, en el grupo al que se administró ácido tauroursodesoxicólico, no se reconocieron diferencias entre ambos tipos de ojos, lo que indica que el ácido tauroursodesoxicólico tiene un efecto de supresión de la miopía. Además, se reconocieron cambios significativos en la longitud axial del ojo de los ojos con miopía inducida entre el grupo al que se administró ácido tauroursodesoxicólico y el grupo al que se administró PBS, lo que indica que el ácido tauroursodesoxicólico también tiene un efecto sobre los cambios en la longitud axial del ojo.

(3) Efectos del supresor de estrés reticular endoplásmico mediante gotas para ojos

Como agente para suprimir la miopía, es preferible usar una forma de dosificación tal como gotas para ojos o ungüentos para ojos que se puedan administrar directamente en los ojos, porque se espera que sea altamente eficaz y pueda ser administrado por los propios pacientes. Después, se preparó un modelo de ratón con miopía inducida como en el Ejemplo 1 para el análisis de los efectos del fenilbutirato de sodio mediante gotas para ojos.

Se usó una lente en un ratón C57BL6J macho de 3 semanas de edad. Desde el día en que se usó la lente, a ambos ojos se les administró diariamente una vez al día mediante gotas para ojos una solución de fenilbutirato de sodio de fenilbutirato de sodio disuelto en PBS para proporcionar 0,2 % ($n = 4$) o 2 % ($n = 4$). Al grupo de control ($n = 4$) se le administraron gotas para ojos con PBS. Antes y tres semanas después de usar la lente, se midieron el valor refractivo (a la izquierda de la figura 6) y la longitud axial del ojo (a la derecha de la figura 6) para calcular la variación.

Para los ojos que llevaban la lente y con miopía inducida, se reconocieron diferencias significativas en el valor refractivo y la longitud axial del ojo en el grupo al que se administró fenilbutirato de sodio al 2 % en comparación con el grupo al que se administró PBS. Por lo tanto, se indica que el fenilbutirato de sodio también tiene un efecto sobre la supresión de la miopía mediante la administración de gotas para ojos. Además, el grupo al que se administró fenilbutirato de sodio al 0,2 % también mostró una tendencia a suprimir los cambios en el valor refractivo y la longitud axial del ojo, aunque no se reconocieron diferencias significativas frente al grupo al que se administró PBS.

[Ejemplo 3] Efectos de la inducción de estrés reticular endoplásmico en la miopía

Debido a que el supresor de estrés reticular endoplásmico tiene un efecto de supresión en la inducción de miopía como se ha descrito anteriormente, se considera que el estrés reticular endoplásmico participa directamente en la inducción de la miopía. Después, se realizó un análisis para comprobar la inducción de miopía mediante la administración de un agente para inducir estrés reticular endoplásmico. El sujeto era un ratón C57BL6J macho de 3 semanas de edad ($n = 12$). Al ojo derecho del ratón se le administró una vez gotas para ojos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina (Tm) (Sigma-Aldrich Co. LLC) o 10 μM de tapsigargina (TG) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y al ojo izquierdo se le administró una vez gotas para ojos con PBS (Veh). Antes y una semana después de la administración de tunicamicina y tapsigargina, se midieron el valor refractivo y la longitud axial del ojo para calcular la variación (figura 7).

Mediante la administración de cualquiera de los agentes de tunicamicina y tapsigargina, que se conocen como inductores de estrés reticular endoplásmico, del mismo modo, se reconocieron diferencias significativas tanto en el valor refractivo como en la longitud axial del ojo frente a los ojos a los que se les administró PBS, lo que indica que se indujo la miopía. En otras palabras, se muestra que el estrés reticular endoplásmico induce directamente la miopía.

[Ejemplo 4] Efectos del inhibidor de la trayectoria de estrés reticular endoplásmico en la inducción de miopía

Como se ha descrito anteriormente, se sabe que el estrés reticular endoplásmico tiene tres trayectorias: una trayectoria IRE1; una trayectoria PERK; y una trayectoria ATF6, aguas abajo del mismo. Se realizó un análisis para comprobar un efecto de supresión de la inducción de miopía de los inhibidores para las tres trayectorias de estrés reticular endoplásmico.

STF-083010 (STF) se usó como inhibidor de la trayectoria IRE1, GSK265615 (GSK) como inhibidor de la trayectoria PERK y Nelfinavir (NFV) como inhibidor de la trayectoria ATF6. Al modelo de ratón con miopía inducida se le administraron estos agentes para su análisis para comprobar la supresión de la inducción de miopía.

Como en el Ejemplo 1, se usó un ratón C57BL6J macho de 3 semanas de edad, y su ojo derecho llevaba una lente de -30 D y el ojo izquierdo llevaba solo una montura. Desde el día en que se usó la lente, a ambos ojos se les administraron diariamente una vez al día gotas para ojos con 60 μ M de STF-083010 (Sigma-Aldrich Co. LLC) (n = 3), 50 μ M de GSK2656157 (Cayman Chemical Company) (n = 3), o 50 μ M de Nelfinavir (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (n = 3) disuelto en PBS. Al grupo de control (n = 3) se le administraron gotas para ojos con DMSO al 0,1 % (Sigma-Aldrich Co. LLC) disuelto en PBS. Antes y una semana después de usar la lente, se midieron el valor refractivo y la longitud axial del ojo para calcular la variación (figura 8). La figura 8 muestra, en el gráfico de la izquierda, las diferencias (variación) en el valor refractivo (figura 8A) y la longitud axial del ojo (figura 8B) entre antes y después de llevar puesta la lente. La figura 8 también compara, en el gráfico de la derecha, la diferencia de variación en cada individuo encontrando la diferencia de variación entre los ojos que llevaban la lente y los ojos de control.

Al igual que el DMSO, el STF-083010 mostró cambios significativos tanto en el valor refractivo como en la longitud axial del ojo frente al ojo de control que no usó lente, lo que indica que no suprimió la inducción de miopía. Por otra parte, los grupos con gotas para ojos de GSK2656157 y Nelfinavir mostraron cambios en el valor refractivo y una extensión de la longitud axial del ojo incluso en el ojo de control que no usó lente. Sin embargo, los grupos mostraron una disminución significativa en la diferencia de variación del ojo que llevaba la lente y el ojo con miopía inducida (en los gráficos de la derecha de las figuras 8A y 8B) y, por tanto, se considera que tienen un efecto de supresión en la inducción de miopía.

Los resultados anteriores muestran que el estrés reticular endoplásmico induce la miopía y la supresión del estrés reticular endoplásmico puede suprimir la inducción de la miopía. Además, se muestra que la miopía puede suprimirse usando agentes tales como fenilbutirato y ácido tauroursodesoxicólico (ejemplo de referencia) que suprimen el propio estrés reticular endoplásmico, así como inhibiendo las señales aguas abajo que también transmiten el estrés reticular endoplásmico. Particularmente, se muestra que la inhibición de las señales provocadas por los sensores de estrés reticular endoplásmico PERK y ATF6 suprimen la miopía de manera eficaz.

Aplicabilidad industrial

Se revela que un supresor de estrés reticular endoplásmico suprime la progresión de la miopía en la que no ha habido previamente ningún tratamiento eficaz disponible. Por lo tanto, el supresor de estrés reticular endoplásmico puede actuar como un agente terapéutico para la miopía. Además, se ha preparado un modelo de miopía inducida que incluye síntomas similares a los de los humanos usando un ratón en el que se realiza fácilmente el análisis genético. En el futuro, el modelo de ratón con miopía inducida se puede utilizar para aclarar el mecanismo molecular de la aparición de miopía y desarrollar un fármaco molecular objetivo.

Descripciones de los números de referencia

- 1 Poste
- 2 Lente negativa
- 3 Montura
- 4 Protector
- 5 Instrumento de ajuste
- 6 Ranura
- 7 Tuerca

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía, conteniendo la composición fenilbutirato, Salubrinol, Guanabenz, GSK2606414, GSK2656157, inhibidor de respuesta al estrés integrado, Nelfinavir, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos como ingrediente activo.
5
2. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
10 el ingrediente activo es fenilbutirato o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.
3. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sal farmacológicamente aceptable es una sal de metal alcalino, una sal de metal alcalinotérreo o una sal adicional de una amina o de un aminoácido básico.
15
4. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ingrediente activo es fenil butirato de sodio.
5. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
20 la miopía es miopía axial.
6. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
25 la miopía es miopía patológica.
7. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
30 la forma de dosificación es una inyección, unas gotas para ojos, un ungüento para ojos, una tableta o una cápsula.
8. La composición para su uso en la prevención o en la supresión de la miopía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde
35 la forma de dosificación es en gotas para ojos.

Fig. 1

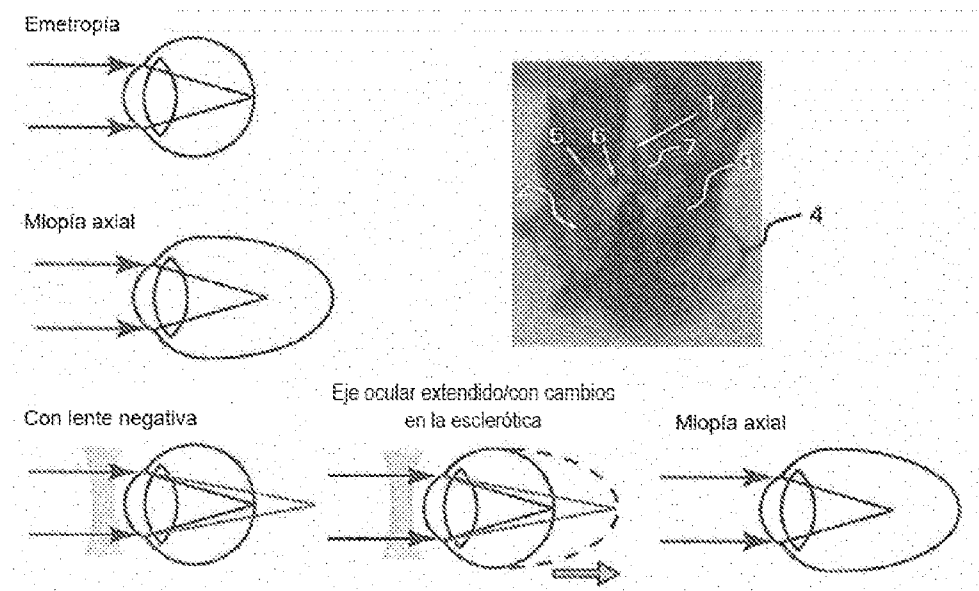


Fig. 2

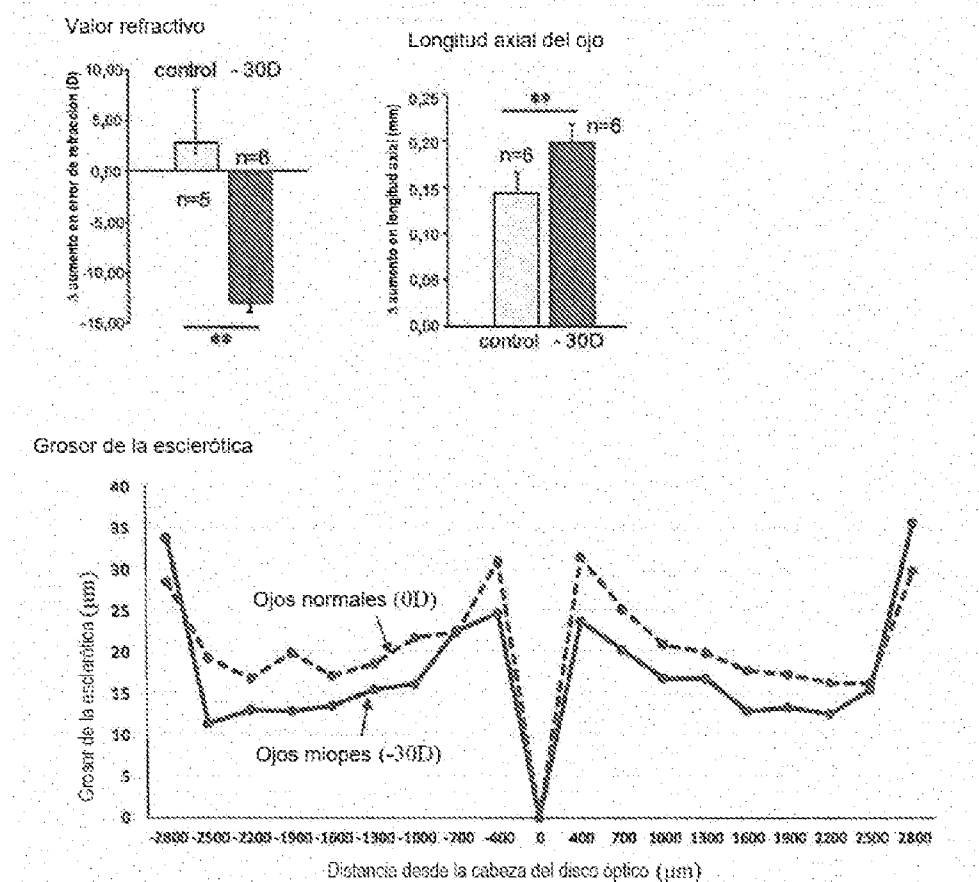


Fig. 3

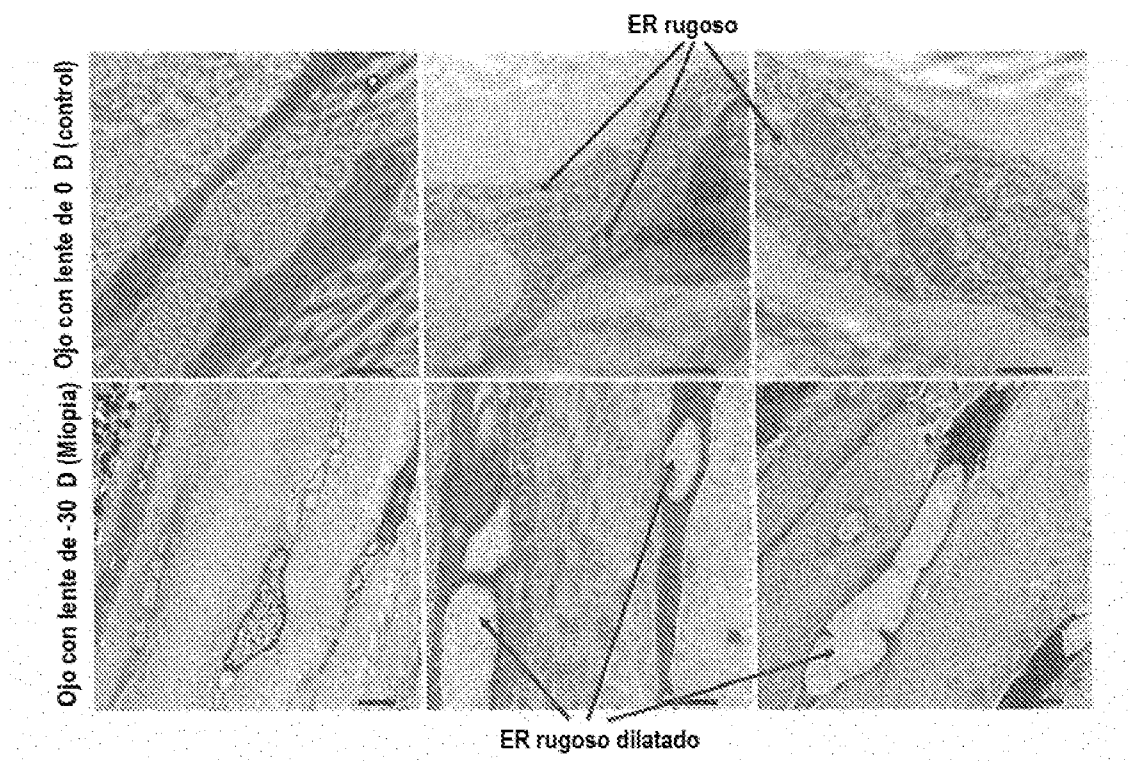


Fig. 4A

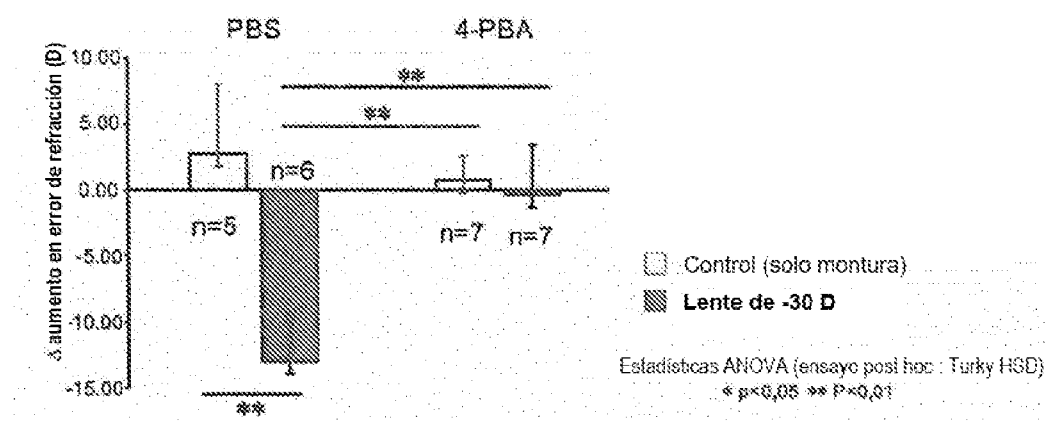


Fig. 4B

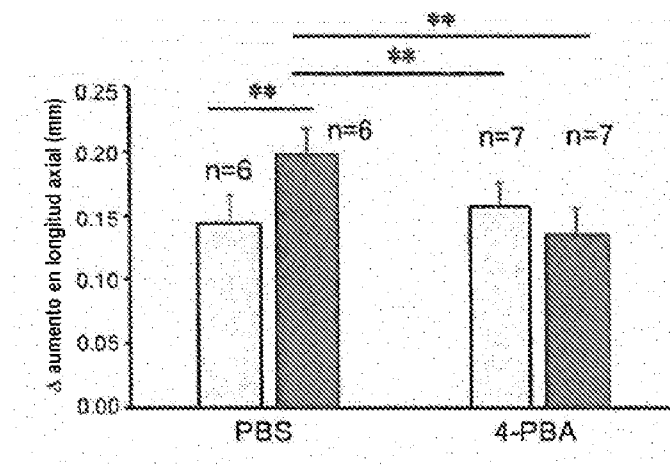


Fig. 4C

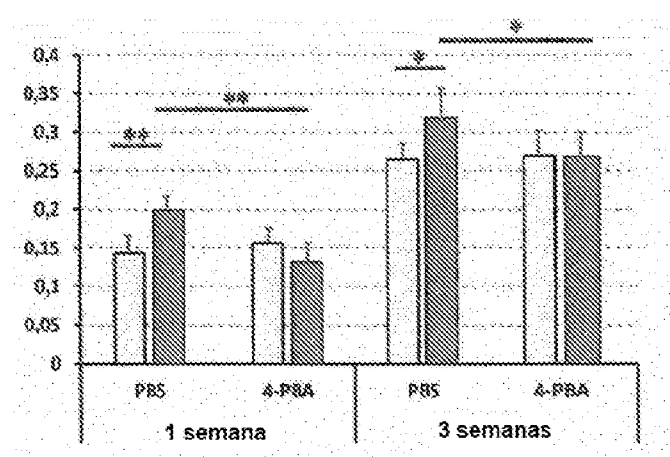


Fig. 5

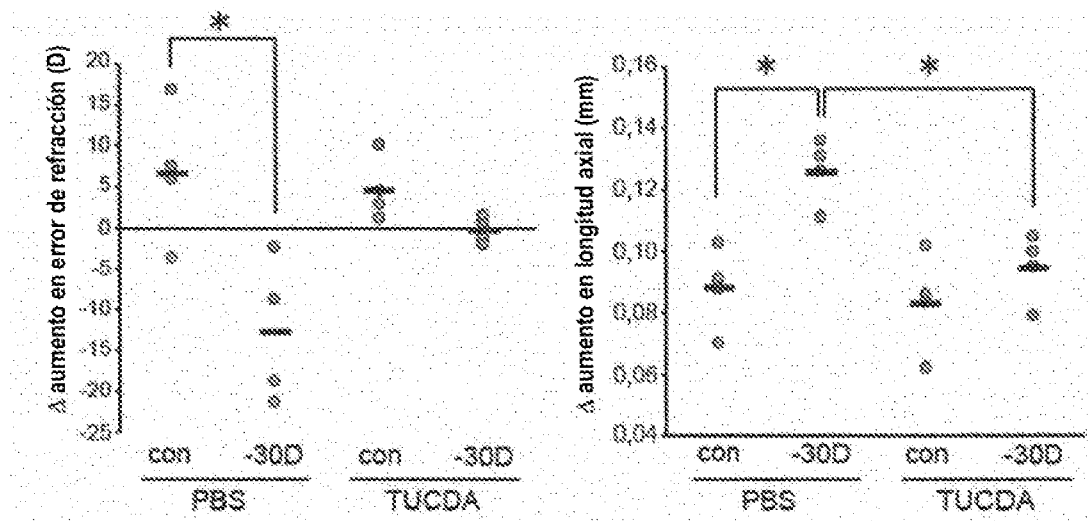


Fig. 6

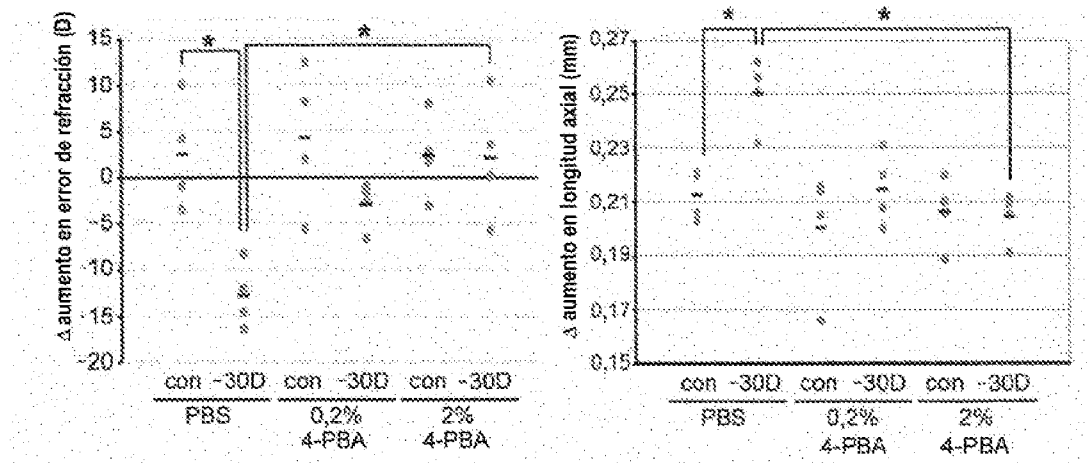


Fig. 7

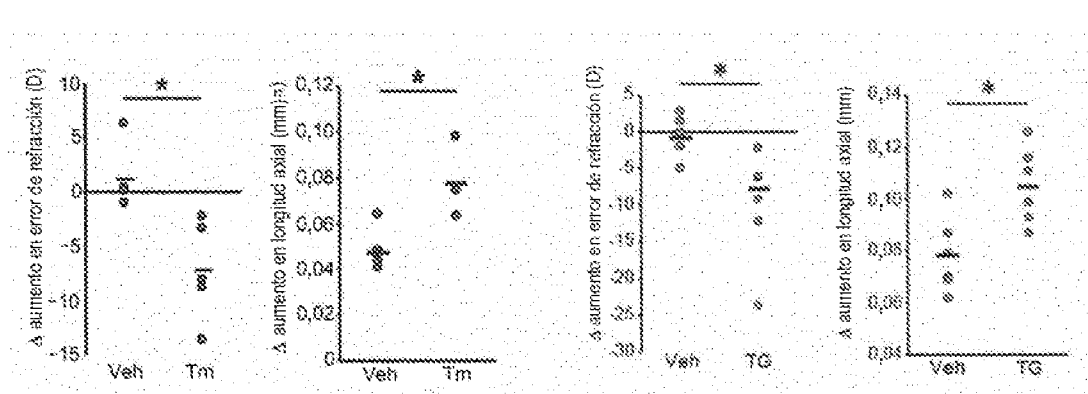


Fig. 8A

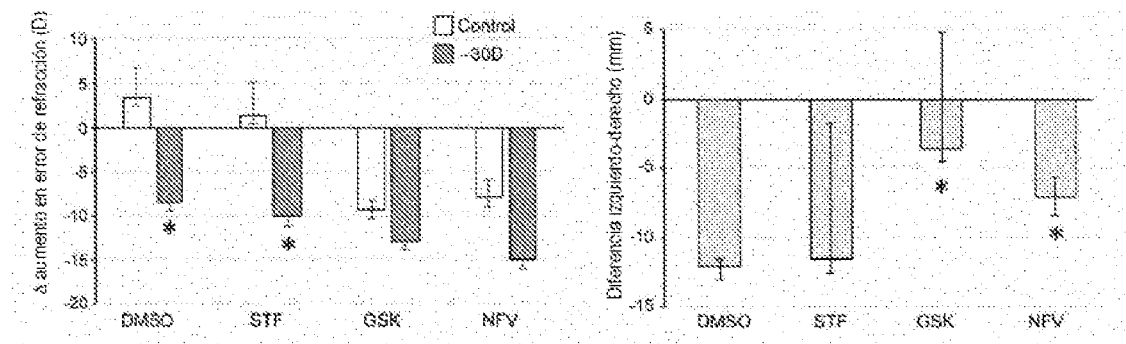


Fig. 8B

