

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 424**

51 Int. Cl.:

C07D 263/32 (2006.01) **C07D 417/06** (2006.01)
A61K 31/421 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/04 (2006.01)
A61P 27/14 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 277/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08764395 .3**
96 Fecha de presentación: **20.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2151438**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2010**

54 Título: **Agente farmacéutico que contiene un agonista de PPAR-delta**

30 Prioridad:

21.05.2007 JP 2007134183

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73 Titular/es:

SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
5-8, HIRANOMACHI 2-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 541-0046, JP y
NIPPON CHEMIPHAR CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

NAKAMURA, YOSHIKUNI;
HANANO, IKUKO y
INOUE, JUN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 424 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

Agente farmacéutico que contiene un agonista de PPAR-delta.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a agonistas PPAR y un agente para promover la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana o células epiteliales de la córnea, que contiene dicho agonista δ PPAR (Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisoma) como un ingrediente activo.

Técnica Precedente

- 10 Una glándula meibomiana es una glándula productora de lípidos encerrada en los párpados tanto superior como inferior (pálpebra), y secreta un lípido a través de una abertura situada en un lado de la conjuntiva desde las pestañas de los párpados. Una capa de lípido que constituye un fluido lacrimal contiene un lípido suministrado desde las glándulas meibomianas como un componente, y evita que el fluido lacrimal se evapore de una superficie ocular. Se sabe que los pacientes con disfunción de la glándula meibomiana o meibomitis desarrollan ojo seco hiperevaporativo, trastorno epitelial queratoconjuntival, erosión epitelial de la córnea y úlcera corneal, que se asocian con ojo seco y similar, ya que la glándula meibomiana muestra deterioro funcional y secreta un lípido a un menor nivel.

- 15 Además, la córnea consiste en epitelio y una membrana limitante externa (membrana de Bowman), estroma, una membrana limitante interna (membrana de Descemet) y endotelio. Como la córnea se localiza en la parte más frontal del globo ocular, es susceptible a la influencia medioambiental externa, a consecuencia de lo cual se desarrollan diversos trastornos. Ejemplos de las enfermedades asociadas con herida o defecto de células epiteliales de la córnea incluyen síndrome del ojo seco, úlcera corneal, queratitis punteada superficial, erosión epitelial de la córnea, enfermedades alérgicas oculares asociadas con lesión corneal tal como conjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica, etc., y similares.

- 20 Por otro lado, PPAR es una clase de receptores intranucleares expresados en la mayoría de vertebrados, y se considera que es un grupo de factor de transcripción relacionada íntimamente con el metabolismo del azúcar o lípido intracelular y la diferenciación celular. Como el subtipo, se conocen los tipos α , δ y γ . El PPAR δ se indica algunas veces como PPAR β (documento 1 que no es patente).

- 25 Con respecto a la distribución de PPAR en el tejido ocular, se conoce la expresión de PPAR α y β en las células epiteliales de la córnea de conejo (documento 2 que no es patente).

- 30 Se han presentado que la 5-[4-(6-metoxi-1-metil-1H-benzimidazol-2-ilmetoxi)bencil]tiazolidin-2,4-diona, considerada por tener principalmente una acción de activación de PPAR γ , puede utilizarse como un agente terapéutico para trastornos queratoconjuntivales (documentos de patente 1 y 2), y se administra agonista de PPAR α , δ o γ para el tratamiento de enfermedades oculares (conjuntivitis, síndrome del ojo seco, queratitis, etc.) (documento de patente 3). Además, se sabe que PPAR α se distribuye en el hígado, riñón y similares, y actúa en el metabolismo y transporte de lípidos. Además, se ha presentado también que un agonista del mismo puede utilizarse como un agente terapéutico para enfermedades corneales (documento de patente 4). Se ha presentado que los agonistas de PPAR δ promueven la proliferación y diferenciación de las células epiteliales de la glándula sebácea de rata (documento 3 que no es patente) y promueven la curación de heridas de la piel (documento 4 que no es patente). Además de lo anterior, se conoce un método de estimulación de la proliferación de células β mediante la administración de un ligando PPAR distinto de tiazolidindiona y un derivado GLP-1 (documento de patente 5), inhibición de la proliferación de células de leucemia, células de cáncer de próstata y similares mediante pioglitazona (agonista de PPAR γ) (documento de patente 6) y similares.

- 35 Sin embargo, muchos aspectos de la expresión y función de PPAR α , δ o γ en cada especie animal y cada tejido o célula aún se tienen que aclarar, y si un agonista de PPAR δ es útil para enfermedades oculares en seres humanos no se conoce correctamente.

- 45 Documento de patente 1: documento WO2005/039574

Documento de patente 2: documento JP-A-2001-39976

Documento de patente 3: documento WO2002/076177

Documento de patente 4: documento JP-A-2005-008570

Documento de patente 5: documento WO2002/69994

- 50 Documento de patente 6: documento WO1998/25598

Documento 1 que no es patente: J Med Chem 2000, 43: 527-550

Documento 2 que no es patente: J Biol Chem 2000, 275: 2837

Documento 3 que no es patente: Molecular Genetic and Metabolism 2001, 74: 362-369

Documento 4 que no es patente: Am J Clin Dermatol 2003, 4(8): 523-530

Descripción de la Invención

5 Problemas a Resolver mediante la Invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un medicamento capaz de promover la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana y células epiteliales de la córnea, que puede ser un tratamiento fundamental de enfermedades oculares tales como ojo seco y similares, y un agente terapéutico que usa el promotor para enfermedades oculares tales como disfunción de la glándula meibomiana, trastorno epitelial de la córnea, ojo seco y similares.

Medios de Resolver los Problemas

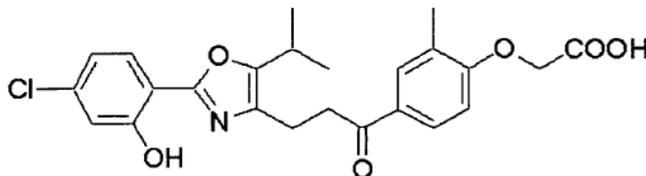
Los actuales inventores han llevado a cabo estudios intensivos en vista de los problemas mencionados anteriormente y han encontrado que un agonista PPAR δ específico muestra una acción superior en la estimulación de la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana y células epiteliales de la córnea, que da por resultado la finalización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención incluye al menos los siguientes aspectos.

- 20 1. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la glándula meibomiana.
- 25 2. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la córnea.
- 30 3. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de disfunción de la glándula meibomiana.
- 35 4. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de un trastorno epitelial de la córnea.
- 40 5. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento del ojo seco.
- 45 6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde el ojo seco es un ojo seco hiperevaporativo.
7. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la glándula meibomiana.
8. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la córnea.
9. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de disfunción de la glándula meibomiana.
- 50 10. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-

contenido en el promotor de la presente invención como un ingrediente activo es un compuesto que tiene una actividad agonista PPAR δ y se describe en el documento WO2003/016291 (particularmente el Ejemplo 3).

Ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético (CAS núm. 500581-27-1):



5 contenido en el promotor de la presente invención como un ingrediente activo es un compuesto que tiene una actividad agonista PPAR δ y se describe en el documento WO2003/016291 (particularmente el Ejemplo 6).

Ejemplos de las sales farmacológicamente aceptables de estos compuestos incluyen sales metálicas con metales alcalinos tales como sodio, potasio, etc.; metales alcalinotérreos tales como calcio, magnesio, etc.; y similares. Además, el compuesto de la presente invención además incluye un solvato de los mismos.

10 El agonista PPAR δ en la presente invención es una sustancia que enlaza a un dominio de unión del ligando (LBD) de PPAR δ , activa el receptor, y regula la transcripción de un gen diana de PPAR. La actividad agonista PPAR δ puede medirse mediante un método de dos híbridos de levadura usando un receptor quimérico de LBD y GAL4 de levadura, y un gen indicador, para excluir la influencia de otros receptores nucleares presentes de forma inherente en células de mamíferos. Ejemplos específicos del método de medida incluyen ensayos PPAR-GAL4 descritos en los documentos de referencia, T.M. Willson et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, vol. 43, Núm. 4, p. 528-550 y J.M. Lehmann et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, vol. 270, Núm. 22, p. 12953-12956. Se ha confirmado que el compuesto de la presente invención tiene una actividad agonista PPAR δ según los métodos descritos en el documento WO2003/033493, Ejemplo 12 y documento WO2003/016291, Ejemplo 51.

15 El compuesto de la presente invención puede sintetizarse según las descripciones del documento WO2003/033493 (particularmente el Ejemplo 5) y el documento WO2003/016291 (particularmente los Ejemplos 3, 6).

20 En el promotor de la presente invención, el contenido del ingrediente activo es generalmente 0,000001 – 1% en peso, preferiblemente 0,00001 – 1% en peso, lo más preferiblemente 0,0001 – 0,1% en peso.

25 El promotor de la presente invención puede contener cualquier vehículo además de los ingredientes activos mencionados anteriormente. Ejemplos de dichos vehículos incluyen disolventes (por ejemplo, agua, alcohol, etc.), tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, ácido glutámico, ácido épsilon aminocaproico, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, gluconato de clorexidina, clorobutanol, alcohol bencílico, deshidroacetato sódico, ésteres de ácido paraoxibenzoico, edetato sódico, ácido bórico, etc.), agentes de isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, glucosa, propilenglicol, etc.) y similares.

30 El promotor de la presente invención puede usarse in vivo o in vitro como un medicamento o reactivo de ensayo y similares.

Cuando el promotor de la presente invención se usa como un reactivo de ensayo, puede utilizarse como un reactivo de ensayo en los campos de la fisiología y bioquímica y en diversas realizaciones.

35 Cuando el promotor de la presente invención se usa como un medicamento, es útil como un agente terapéutico para una enfermedad asociada con daño o atrofia de células epiteliales de la glándula meibomiana, y una enfermedad provocada por la hipofunción de células epiteliales de la glándula meibomiana, ya que el agente promueve la proliferación de las células epiteliales de la glándula meibomiana. Ejemplos de las enfermedades incluyen disfunción de la glándula meibomiana, meibomianitis y similares. Además, como las células epiteliales de la glándula meibomiana secretan un componente lípido en un fluido lacrimal, y el lípido evita la evaporación del fluido lacrimal y estabiliza la capa de fluido lacrimal, el agente terapéutico de la presente invención es útil para una enfermedad asociada con anomalía de lípido (secreción disminuida, cambio de componente) en el fluido lacrimal. Los ejemplos de la enfermedad incluyen ojo seco hiperevaporativo.

45 Además, el promotor de la presente invención también es útil como un agente terapéutico para una enfermedad asociada con daño de células epiteliales de la córnea (esto es, herida o defecto), ya que promueve la proliferación de células epiteliales de la córnea. El promotor de la presente invención es útil como un agente terapéutico para trastornos epiteliales de la córnea, específicamente, los asociados con enfermedades endógenas tal como síndrome Sjogren, síndrome Stevens-Johnson, queratoconjuntivitis sicca (ojo seco) y similares; los asociados con enfermedades exógenas tales como post-operatorio, uso de fármacos, trauma, úlcera corneal, meibomianitis, enfermedades exógenas durante el uso de lentes de contacto y similares; las asociadas con enfermedades alérgicas oculares que acompañan a la lesión corneal tal como conjuntivitis vernal, queratoconjuntivitis atópica y similares. El

50

promotor de la presente invención también es útil para el tratamiento de queratitis punteada superficial y erosión epitelial de la córnea. Además, el promotor de la presente invención también es útil como un promotor para curar heridas de la córnea.

5 Además, el promotor de la presente invención es útil como un agente para tratar el ojo seco, particularmente, altamente útil como un agente para tratar el ojo seco hiperevaporativo, ya que el agente muestra de forma simultánea una acción de estimulación en la proliferación de células epiteliales de la córnea y una acción proliferativa de las células epiteliales de la glándula meibomiana y proporciona un efecto actuando directamente en los tejidos corneales y un efecto de mejora de la función del fluido lacrimal actuando en las células de la glándula meibomiana.

10 En el agente terapéutico de la presente invención, el contenido del ingrediente activo es generalmente 0,000001 – 1% en peso, preferiblemente 0,00001 – 1% en peso, lo más preferiblemente 0,0001 – 0,1% en peso.

Ejemplos del sujeto de administración del promotor o agente terapéutico de la presente invención incluye mamíferos (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono, etc.).

15 El agente terapéutico de la presente invención puede usarse en una forma de dosificación de, por ejemplo, gotas oculares, parche, pomada, loción, crema, agente oral, y similares, y puede contener, además de los ingredientes activos anteriormente mencionados, cualquier vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Aunque la ruta de administración del agente terapéutico de la presente invención no está limitada particularmente mientras que el efecto de tratamiento mencionado anteriormente se proporcione, preferiblemente se administra tópicamente al ojo. Ejemplos de la forma de dosificación de una administración tópica al ojo incluye gotas oculares y pomada oftálmica.

25 Por ejemplo, cuando el agente terapéutico de la presente invención se usa como una gota ocular o pomada oftálmica, pueden añadirse estabilizadores (por ejemplo, bisulfato sódico, tiosulfato sódico, edetato sódico, citrato sódico, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno, etc.), agentes de solubilización (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, macrogol, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, etc.), agentes de suspensión (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etc.), emulsionantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona, lecitina de soja, lecitina de yema de huevo, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, polisorbato 80, etc.), tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, ácido glutámico, ácido épsilon aminocaproico, etc.), agentes viscosos (por ejemplo, derivado de celulosa soluble en agua tal como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, etc., sulfato de condroitina sódica, hialuronato sódico, polímero de carboxivinilo, alcohol de polivinilo, polivinilpirrolidona, macrogol, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, gluconato de clorexidina, clorobutanol, alcohol bencílico, deshidroacetato sódico, ésteres de ácido paraoxibenzoico, edetato sódico, ácido bórico, etc.), agentes de isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, glucosa, propilenglicol, etc.), ajustadores de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico, ácido acético, etc.), refrescantes (por ejemplo, 1-mentol, d-alcanfor, d-borneol, esencia de menta, etc.), bases de pomada (vaselina blanca, lanolina purificada, parafina líquida, aceite vegetal (aceite de oliva, aceite de camelia, aceite de cacahuete, etc.), etc.), y similares, como aditivos. Mientras la cantidad de los aditivos varía dependiendo de la clase de aditivo, uso y similares, pueden añadirse en cantidades tales que proporciona una concentración capaz de alcanzar el objeto del uso del aditivo.

40 Cuando el agente terapéutico de la presente invención se usa en forma de una gota ocular o pomada oftálmica, el agente puede producirse según un método usado generalmente en el campo farmacéutico y, por ejemplo, en base al método descrito en la Japanese Pharmacopoeia, 14ª Edición, Preparation General Rules, sección de la gota ocular y sección de la pomada oftálmica.

45 Ejemplos de la forma de una gota ocular incluyen gotas oculares acuosas (instilación acuosa, instilación de suspensión acuosa, instilación viscosa, etc.), gotas oculares no acuosas (instilación no acuosa, instilación de suspensión no acuosa, etc.), gotas oculares en emulsión y similares.

Mientras el pH de la gota ocular se determina de forma apropiada según la forma de la gota ocular, está generalmente dentro del intervalo de 4 – 8. Cuando la gota ocular es una instilación acuosa, preferiblemente el pH se ajusta de forma particular a pH 6 – 8 desde el aspecto de solubilidad del ingrediente activo.

50 La gota ocular es generalmente un preparado esterilizado por un método tal como esterilización por filtración, esterilización por irradiación (por ejemplo, esterilización electrónica, esterilización ultravioleta, esterilización gamma, etc.), esterilización en autoclave, esterilización por aire caliente, y similares.

55 Cuando el agente se formula en una gota ocular, el líquido se llena preferiblemente en un envase de instilación provisto con una abertura de goteo de líquido que tiene un pequeño diámetro que permite el control de la cantidad del goteo para facilitar la instilación en el ojo. El material a usar para el envase es resina sintética, cristal, celulosa, pulpa y similares, y se selecciona de forma apropiada según la propiedad y la cantidad de uso del ingrediente activo y la base. A partir de los aspectos de capacidad de escurrido y durabilidad, el envase se hace preferiblemente de

una resina sintética. Ejemplos específicos del material de la resina sintética incluyen resina de polietileno (por ejemplo, polietileno de baja densidad o polietileno de alta densidad), resina de polipropileno, resina de copolímero de etileno-propileno, resina de poli(tereftalato de etileno) y similares.

5 Ejemplos del envase de instilación incluyen un envase en donde un miembro de guía se ajusta en un cuerpo de envase, que están moldeados de forma independiente, un envase moldeado de forma integral en donde un líquido se sella fuertemente de forma simultánea con el moldeo del envase (por ejemplo, documento WO2004/006826) y similar. Cuando se emplea un envase moldeado de forma integral, el envase es superior en los aspectos de coste o higiene, ya que el envase y el líquido se producen de forma continua. El envase de instilación puede ser un envase tipo dosis unitaria que se coloca después de cada momento de uso (por ejemplo, documento JP-A-9-207959).
10 Cuando se usa este envase, puede formularse un preparado sin conservantes, que es altamente seguro para la córnea. Además, dichos envases pueden empaquetarse por adhesión con una película bloqueante de UV. Además, los envases pueden colorearse (marrón, verde, azul, amarillo, etc.) para mejorar la realización del bloqueo de UV.

15 La presente descripción proporciona un método para promover la proliferación de una célula epitelial de la glándula meibomiana, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención a un sujeto que necesita la estimulación de la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana. El método se lleva a cabo de forma deseable para el tratamiento de la disfunción de la glándula meibomiana.

20 Además, la presente descripción proporciona un método para promover la proliferación de una célula epitelial de la córnea, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención a un sujeto que necesita la estimulación de la proliferación de células epiteliales de la córnea. El método se lleva a cabo de forma deseable para el tratamiento de un trastorno epitelial de la córnea.

Además, la presente descripción proporciona un método para tratar el ojo seco, que comprende la administración de una cantidad eficaz del compuesto de la presente invención a pacientes que sufren de ojo seco.

25 La cantidad eficaz del compuesto de la presente invención no puede definirse de forma automática ya que varía dependiendo de la edad, peso corporal y dolencia del sujeto de administración, un objeto de tratamiento y similares. Cuando el promotor o agente terapéutico de la presente invención se administra al ser humano, por ejemplo, una disolución que contiene el compuesto de la presente invención a 0,000001 – 1% en peso, preferiblemente 0,00001 – 1% en peso, lo más preferiblemente 0,0001 – 0,1% en peso, se instila generalmente una – ocho veces al día mediante 1 – 2 gotas para un ojo/instilación, a saber, aproximadamente 50 – 200 μ L por instilación. La cantidad del compuesto contenido en una disolución que tiene una concentración y un volumen en dichos intervalos puede
30 ejemplificarse como una cantidad eficaz.

Ejemplos

La presente invención se explica en detalle a continuación por referencia a Ejemplos Experimentales, que no se van a construir como limitantes.

(Ejemplo Experimental 1)

35 Efecto en el aumento del número celular de células epiteliales de la córnea humana normal

1. Células usadas

Se usaron células epiteliales de la córnea humana normales (KURABO).

2. Método de preparación de disolución de la sustancia de ensayo

40 Como una sustancia de ensayo, se usó ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético (denominado en adelante como compuesto A). El compuesto A se disolvió en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a una concentración 200 veces la concentración final en un medio de cultivo, y la disolución se almacenó a -80°C hasta inmediatamente antes del uso.

45 Como un medio de cultivo celular para la consideración del efecto de aumento del número celular por el compuesto A, se usó un medio de cultivo (medio basal) obtenido por adición de insulina, hidrocortisona y transferrina contenida en el equipo aditivo de crecimiento HCGS (KURABO) a EpiLife (KURABO).

3. Método de ensayo

1) Cultivo celular y adición del compuesto A

50 Las células epiteliales de la córnea humana normales criopreservadas en nitrógeno líquido se descongelaron y se contó el número de células. La cantidad total de las mismas se transfirió a EpiLife añadido con todo el equipo de aditivos de crecimiento HCGS (insulina, mEGF de factor de crecimiento epidérmico derivado de ratón, hidrocortisona, transferrina, extracto de hipófisis de cerebro bovino) (4 mL, medio completo), y se suspendió bien en

el mismo. La suspensión celular se sembró en una placa de 24 pocillos recubierta de fibronectina (Becton Dickinson) a un número celular de 2×10^4 células/500 μ L/pocillo (1×10^4 células/ cm^2 ya que el área del fondo era 2 cm^2).

5 Después de completar el sembrado celular, la placa de cultivo se incubó en un equipo incubador a 37°C , 5% de CO_2 , 95% de aire y 100% de humedad durante 24 horas, y el medio de cultivo se cambió a 400 μ L del medio basal (EpiLife añadido con insulina, hidrocortisona y transferrina procedente de los aditivos de crecimiento HCGS).

Después de 24 horas a partir de entonces, el medio de cultivo se cambió al siguiente medio de cultivo (cada 400 μ L).

[1] medio basal solo (grupo sin adición)

[2] medio basal + mEGF (concentración final: 1 ng/mL; grupo de control positivo)

10 [3] medio basal + compuesto A (concentración final: 0,1 nM, 1 nM, 0,01 μ M, 0,1 μ M; grupo de adición del compuesto A)

Se añadió etanol (5 μ L) a 1 mL de cada medio de cultivo [1] y [2] para fijar uniformemente la concentración de etanol de todos los medios de cultivo a 0,5%.

2) Medida del número celular

15 Después de 24 horas desde el inicio de la estimulación con compuesto A, el sobrenadante del cultivo se eliminó de cada pocillo, y se dispensó un medio basal añadido con 10% de Kit-8 de Conteo Celular (DOJINDO) a cada pocillo por 200 μ L. Después de la dispensación, la placa de cultivo se transfirió a un equipo incubador a 37°C , 5% de CO_2 , 95% de aire y 100% de humedad y se incubó durante 2 horas. El sobrenadante (100 μ L) se transfirió a una placa de cultivo de 96 pocillos para el cultivo tisular (Corning), y se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm con un lector de microplaca (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), y se usó como un índice del aumento del número celular.

4. Análisis Estadístico

25 Los valores del grupo de control positivo y el grupo de adición del compuesto A se calcularon en base a la absorbancia promedio del grupo sin adición como 100%, y el grupo sin adición se comparó con el grupo de adición del compuesto A y el grupo de control positivo según el ensayo de comparación múltiple de Dunnett (de una cola). Un valor crítico de menos de 5% como un resultado del ensayo se juzgó como significativo.

5. Resultados de ensayo

30 El efecto de aumento del número celular de cada grupo se muestra en la Tabla 1. Las absorbancias medidas muestran que el número celular del grupo de control positivo y el grupo de adición del compuesto A es significativamente mayor que las del grupo sin adición donde el número celular del grupo sin adición es 100%, y se sugiere un aumento en el número celular en estos grupos ($p < 0,01$). A partir de los resultados de ensayo, se ha aclarado que el compuesto A aumenta el número celular de células epiteliales de la córnea humana normales.

Tabla 1

Grupo	Índice de aumento del número celular (%)	Diferencia significativa (al grupo sin adición)
Grupo sin adición	100,0 \pm 7,7	
mEGF	147,5 \pm 47,2	**
Compuesto A 10^{-10} M	177,4 \pm 20,8	**
Compuesto A 10^{-9} M	169,0 \pm 8,2	**
Compuesto A 10^{-8} M	187,4 \pm 10,2	**
Compuesto A 10^{-7} M	172,6 \pm 16,0	**

35 Los cambios en el número celular cuando se añadió el compuesto A a las células epiteliales de la córnea humana normales cultivadas se muestran en los valores respecto al valor promedio del grupo sin adición como 100% (media \pm desviación estándar, N = 3-4). ** en la Tabla muestra una diferencia significativa desde el grupo sin adición ($p < 0,01$).

(Ejemplo Experimental 2)

Estudio de acción de estimulación en la cura de herida epitelial de la córnea

1. Animal usado

5 Se usaron conejos blancos japoneses macho (KITAYAMA LABES Co., Ltd.). Los animales experimentales se usaron según el International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals.

2. Método de preparación de la instilación de la sustancia de ensayo

Se usó el compuesto A como una sustancia de ensayo. El compuesto A se disolvió en el siguiente vehículo a 0,0005% o se suspendió en el siguiente vehículo a 0,005% y se usó como una instilación.

	Dihidrato de fosfato de dihidrógeno sódico	0,05 g
10	Cloruro sódico	0,45 g
	Agua ultra-pura	e.q.
	Polisorbato 80	0,05 mL
	<u>Hidróxido sódico</u>	<u>e.q.</u>
	Cantidad total	50 mL (pH 7,0)

15 Como un control para el grupo de administración del compuesto A, se usó el grupo de instilación de vehículo mencionado anteriormente libre de medicamento.

3. Método experimental

1) Raspado epitelial de la córnea

20 Los animales recibieron una inyección intramuscular (1 mL/Kg) de una mezcla Selactal (2% de xilazina; Bayer, Ltd.) : Ketalar (5% de quetamina; DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) = 1:1 para anestesia sistémica, e instilación de hidrocloreuro de oxibuprocaina (instilación de benoxilo 0,4%; Santen Pharmaceutical CO., Ltd.) y después se expusieron los globos oculares. Usando un trépano con un diámetro de 10 mm, se estampó una marca (diámetro 10 mm) en el epitelio corneal en la parte central de la córnea, y la capa entera epitelial de la córnea en el círculo marcado se raspó con un arrancador manual bajo un estereomicroscopio. Después del raspado, la superficie corneal se lavó con solución salina fisiológica (OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.), y el tratamiento de raspado epitelial de la córnea se completó colocando el globo ocular de nuevo en la órbita.

2) Administración

30 La instilación del compuesto A o un vehículo de instilación se instiló mediante 50 µL cada vez en el ojo tratado con una micropipeta dos veces al día en el día de raspado epitelial de la córnea y cuatro veces al día desde el día siguiente hasta la finalización del ensayo.

3) Evaluación

35 Usando el punto temporal cuando se completó el raspado epitelial de la córnea en todos los animales como un tiempo de partida del ensayo (0 horas), el área del defecto del epitelio corneal se cuantificó 40, 48, 56 y 64 horas después, en base al que se evaluó la cura de heridas del epitelio corneal. Para ser preciso, se instiló disolución de sodio de fluoresceína al 0,1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (10 µL) en el ojo tratado en cada punto temporal, y el segmento ocular anterior de los animales se fotografió inmediatamente usando una lámpara de abertura con un filtro azul, por lo que se grabó la región deficiente epitelial de la córnea teñida con fluoresceína. La fotografía desarrollada se almacenó como imágenes digitales en un ordenador, y el área del defecto epitelial de la córnea teñida de fluoresceína se midió usando un software de análisis de imágenes (Image-Pro Plus).

40 4. Análisis estadístico

45 El área del defecto epitelial de la córnea teñida de fluoresceína medida en cada punto temporal se calculó en base al valor inicial de cada animal como 100%, y se tomó como la relación del defecto epitelial de la córnea restante. La relación del defecto epitelial de la córnea restante en cada punto temporal se comparó entre el grupo de instilación de vehículo y el grupo de instilación del compuesto A usando el ensayo t. Un valor crítico de menos que 5% como un resultado del ensayo se juzgó como significativo.

5. Resultados de ensayo

5 La relación del defecto epitelial de la córnea restante en el grupo de instilación vehículo, y grupos de instilación del compuesto A al 0,0005% y 0,005% a cada punto temporal de la medida se muestra en la Tabla 2. Se muestra que la relación del defecto epitelial de la córnea disminuyó significativamente en el grupo de instilación del compuesto A al 0,005% en 40 horas a partir del raspado epitelial de la córnea. La relación disminuyó significativamente en los grupos de instilación del compuesto A al 0,0005% y 0,005% 48 horas después. A partir de los resultados del ensayo, se ha aclarado que la instilación del compuesto A promueve la cura de heridas del defecto epitelial de la córnea.

Tabla 2

Grupo	Grupo de instilación vehículo (%)	Grupo de instilación de compuesto A al 0,0005% (%)	Grupo de instilación de compuesto A al 0,005% (%)
0 horas (valor inicial)	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
40 horas después	28,1±5,3	24,8±2,7	18,6±8,0*
48 horas después	18,1±6,1	11,8±2,9*	9,1±6,4*
56 horas después	11,1±8,1	3,8±2,8	3,4±3,7
64 horas después	5,1±6,9	0,8±1,4	0,9±1,3

10 La relación (%) del defecto epitelial de la córnea restante después del tratamiento de raspado epitelial de la córnea de los ojos de conejo se calculó para cada animal en base al valor inicial como 100% (media ± desviación estándar, N = 6). * en la Tabla muestra una diferencia significativa del grupo de instilación de vehículo ($p < 0,05$).

(Ejemplo Experimental 3)

Efecto en el aumento del número celular en células epiteliales de la glándula meibomiana

15 1. Preparación de célula epitelial de la glándula meibomiana de mono

Un párpado de mono aislado y almacenado en D-PBS se transfirió a un banco sanitario, y el preparado celular se realizó de forma aséptica como sigue.

20 El párpado aislado se sumergió en etanol al 80% durante 30 seg., se lavó tres veces con D-PBS añadido con penicilina-estreptomycinina al 1% (Invitrogen), y se transfirió a un medio esencial mínimo (MEM; Invitrogen). El tejido adiposo y el tejido muscular de alrededor del tejido glandular meibomiano del párpado se eliminaron bajo un estereomicroscopio. Se transfirieron a MEM que contiene colagenasa A 0,3 U/mL (Roche Diagnostics) y dispasa II 2,4 U/mL (Roche Diagnostics), y se agitó a 37°C durante 4 horas y a 4°C toda la noche. El tejido tratado con enzima se colocó bajo un estereomicroscopio, y los tejidos conectivos de la pestaña y el párpado se eliminaron para aislar el tejido glandular meibomiano. Se añadió tripsina-EDTA (4 mL, Invitrogen) al tejido glandular aislado, y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 min. Después de la incubación, se añadió MEM (5 mL) que contiene FBS al 10% (Invitrogen) se añadió al mismo para parar la reacción enzimática, y las células que constituyen el tejido se dispersaron por succión repetida y descarga de la mezcla 5 veces usando una jeringa de inyección equipada con una aguja de inyección 21G. La dispersión celular se pasó a través de filtros de nailon de 100 µm y 40 µm (Cell Strainer; Falcon), y se eliminó la masa celular y similar contenida en ella que no podrían tratarse con la enzima. La suspensión celular pasada a través de los filtros se recogió en un tubo centrífugo (50 mL) y se centrifugó a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min. A las capas celulares que contienen las células objeto obtenidas por el centrifugado se añadieron 80 µL de D-PBS que contiene albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA; Sigma-Aldrich), y las células se suspendieron suficientemente en él. Se añadieron Microgotas de Anti-Fibroblasto (Militenyi Biotec, 20 µL), y la mezcla se dejó estar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la finalización de la reacción con un anticuerpo, se añadieron 2 mL de D-PBS que contenía BSA al 0,5%, y la mezcla se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min. A las capas celulares que contienen las células objeto obtenidas por el centrifugado se añadió 1 mL de D-PBS que contiene BSA al 0,5%, y las células se suspendieron suficientemente en él. La suspensión se añadió en gotas a la columna LD (Militenyi Biotec) equilibrada por adelantado con una disolución de lavado de columna (D-PBS que contiene EDTA 2 mM (DOJINDO LABORATORIES) y BSA al 0,5%). Entonces, se añadieron 2 mL de la disolución de lavado de la columna en gotas a la columna LD. Durante el periodo desde inmediatamente después de la adición en gotas de la suspensión celular a la finalización de la adición en gotas de la disolución de lavado de la columna, las células objeto no marcadas con anticuerpo (no fibroblasto) que no se adsorbieron a la columna se recuperaron en un tubo centrífugo de 50 mL. Las células recogidas en el tubo centrífugo se centrifugaron a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se eliminó. El sedimento se suspendió en Medio Libre de Suero de Queratinocito Definido (5 mL), se centrifugó a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min, y se eliminó el sobrenadante. De nuevo, el residuo se

suspendió en DK-SFM (3 mL), se centrifugó a temperatura ambiente y 1.500 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se eliminó. Las células se suspendieron en DK-SFM (2 mL), y se sembraron en una placa multi-pocillos de 6 pocillos para el cultivo celular, que se había tratado con colágeno. Las células sembradas se cultivaron en Medio Libre de Suero de Queratinocito Definido (DK-SFM; Invitrogen, se añadió Suplemento unido como se instruye en el protocolo de preparación), se cultivaron en un equipo incubador (SANYO) a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire, 100% de humedad, y el medio de cultivo se intercambiaba con uno nuevo cada 48 horas hasta que las células se vuelvan subconfluentes

2. Método de preparación de disolución de la sustancia de ensayo

Como una sustancia de ensayo se usó, compuesto A, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético (en adelante denominado como compuesto B) o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético (en adelante denominado como compuesto C). La sustancia de ensayo se disolvió en etanol (Nacalai Tesque) a una concentración 200 veces de la concentración final en un medio de cultivo, y la disolución se almacenó a -80°C hasta inmediatamente antes del uso.

Para la consideración del efecto de estimulación de la proliferación celular mediante la sustancia de ensayo, se usó un medio de cultivo obtenido eliminando el suplemento unido a DK-SFM desde DK-SFM como un medio basal (DK-SFM basal). Como un control positivo para la confirmación del efecto de estimulación de la proliferación celular, se usó un medio de cultivo (DK-SFM completo), que se obtuvo añadiendo el suplemento unido al medio basal.

3. Método de ensayo

1) Tratamiento de colágeno de la placa de cultivo

El día antes de usar una placa de cultivo, se dispensaron 50 µL de colágeno tipo I al 0,01% (Nitta Gelatin Inc.) a cada pocillo de la placa de cultivo, y se dejó recubrir el pocillo a 4°C hasta inmediatamente antes del ensayo. En el día del ensayo, la disolución de colágeno tipo I se eliminó y el fondo de la placa de cultivo se lavó tres veces con D-PBS, y se usó para el ensayo como una placa de cultivo tratado con colágeno.

2) Cultivo celular y adición de sustancia de ensayo

Para el ensayo, se usaron células epiteliales de la glándula meibomiana de mono, que se habían cultivado para ser sub-confluyente en una placa de cultivo (diámetro 3,5 cm) y se criopreservó en nitrógeno líquido. Las células suspendidas en Cellbanker (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) y criopreservadas se descongelaron y se transfirieron a un tubo centrífugo de 50 mL, y se añadió una cantidad de 10 veces de DK-SFM completo. Las capas de células se recogieron por centrifugado a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min. Se añadió una cantidad adecuada de DK-SFM completo a una concentración de las células obtenidas de 3×10^6 células/mL. La suspensión celular se dispensó a cada pocillo mediante 64 µL de manera que el número celular fue 6×10^4 células/cm² por el área del fondo (0,32 cm²) de la placa de cultivo de 96 pocillos tratada con colágeno para el cultivo tisular. Después de la finalización del sembrado celular, la placa de cultivo se transfirió a un equipo incubador a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire, 100% de humedad y se cultivó durante 24 horas. El medio de cultivo se intercambiaba con DK-SFM basal (100 µL) y se cultivó adicionalmente durante 24 horas. Entonces, el medio de cultivo en cada pocillo de la placa de cultivo se intercambiaba con 100 µL de cada uno de los siguientes medios de cultivo, la placa de cultivo se colocó de nuevo en la incubadora y se comenzó la estimulación celular.

[1] medio basal solo (DK-SFM basal, grupo sin adición)

[2] medio basal + suplemento (DK-SFM completo, grupo de control positivo)

[3] medio basal + compuesto A (concentración final: 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM; grupo de adición de compuesto A)

[4] medio basal + compuesto B (concentración final: 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM; grupo de adición de compuesto B)

[5] medio basal + compuesto C (concentración final: 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM; grupo de adición de compuesto C)

Se añadió etanol (5 µL) a 1 mL de cada medio de cultivo [1] y [2] para fijar de forma uniforme la concentración de etanol de todos los medios de cultivo a 0,5%.

2) Medida del número celular

Después de 48 horas desde la primera estimulación celular, el medio de cultivo se intercambiaba con el medio de cultivo de [1] – [5] mencionados anteriormente preparados de nuevo. Después de 48 horas, el medio de cultivo se intercambiaba de nuevo con el medio de cultivo de [1] – [5] mencionados anteriormente preparados de nuevo. Después de 48 horas, el sobrenadante del cultivo se eliminó de cada pocillo, y un medio basal añadido con Kit-8 de Conteo Celular al 10% (DOJINDO) se dispensó a cada pocillo por 100 µL. Después de la dispensación, la placa de cultivo se transfirió a un equipo incubador a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad y se incubó durante 2 horas. Después de la incubación durante 2 horas, se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplaca (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se usó como un índice del aumento del número celular.

4. Análisis estadístico

5 Los valores de cada uno del grupo de control positivo y el grupo de adición de sustancia de ensayo se calcularon en base a la absorbancia promedio del grupo sin adición como 100%, y el grupo sin adición se comparó con el grupo de adición de sustancia de ensayo y el grupo de control positivo según el ensayo de comparación múltiple de Dunnett (de una cola). Un valor crítico de menos que 5% como un resultado del ensayo se juzgó como significativo.

5. Resultados de ensayo

10 El efecto de estimulación del aumento del número celular de cada grupo se muestra en la Tabla 3. Las absorbancias medidas muestran que el aumento en el número celular de cada grupo de adición de sustancia de ensayo es significativamente mayor que el del grupo sin adición donde el número celular del grupo sin adición es 100%, y se sugiere un aumento en el número celular. En el grupo de control positivo para la confirmación del efecto de estimulación del aumento de número celular, se observó una tendencia hacia el aumento del número celular, aunque no significativa. A partir de los resultados del ensayo, se ha aclarado que cada sustancia de ensayo aumenta el número de células epiteliales de la glándula meibomiana de mono.

Tabla 3

Grupo	Índice de aumento del número celular (%)	Diferencia significativa (al grupo sin adición)
Grupo sin adición	100,0 ±7,1	
Suplemento	114,2±6,7	
Compuesto A 10 ⁻⁸ M	175,3±9,0	**
Compuesto A 10 ⁻⁷ M	177,1±9,7	**
Compuesto A 10 ⁻⁶ M	189,8±13,1	**
Compuesto B 10 ⁻⁸ M	155,0±28,0	**
Compuesto B 10 ⁻⁷ M	174,4±8,9	**
Compuesto B 10 ⁻⁶ M	158,8±15,2	**
Compuesto C 10 ⁻⁸ M	155,0±11,6	**
Compuesto C 10 ⁻⁷ M	175,2±7,8	**
Compuesto C 10 ⁻⁶ M	179,4±7,5	**

15 Los cambios en el número celular cuando se añadió cada sustancia de ensayo o suplemento (control positivo) a células epiteliales de la glándula meibomiana de mono cultivadas se muestran en valores basados en el valor promedio del grupo sin adición como 100% (media ± desviación estándar, N = 5 o 10). ** en la Tabla muestra una diferencia significativa desde el grupo sin adición (p<0,01).

20 (Ejemplo Experimental 4)

Efecto en el aumento del número celular de células epiteliales de la córnea humana normal

1. Células usadas

Se usaron células epiteliales de la córnea humana normal (KURABO).

2. Sustancia de ensayo y método de preparación

25 Como una sustancia de ensayo, se usó el compuesto B o el compuesto C. Cada uno de Compuesto B y Compuesto C se disolvió en etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) a una concentración 200 veces la concentración final en un medio de cultivo, y la disolución se almacenó a -80°C hasta inmediatamente antes del uso.

30 Como un medio de cultivo celular para la consideración del efecto de aumento del número celular por compuesto B y compuesto C, se usó un medio de cultivo (medio basal) obtenido añadiendo insulina, hidrocortisona y transferrina contenida en el equipo aditivo de crecimiento HCGS (KURABO) a EpiLife (KURABO).

3. Método de ensayo

1) Cultivo celular y adición de la sustancia de ensayo

5 Las células epiteliales de la córnea humana normales criopreservadas en nitrógeno líquido se descongelaron y el número celular se contó. La cantidad total de las mismas se transfirió a EpiLife añadido con todo el equipo aditivo de crecimiento HCGS (insulina, mEGF de factor de crecimiento epidérmico derivado del ratón, hidrocortisona, transferrina, extracto de hipófisis de cerebro bovino) (4 mL, medio completo), y se suspendió bien en él. La suspensión celular se sembró en una placa de 24 pocillos recubierta de fibronectina (Becton Dickinson) a un número celular de 2×10^4 células/500 μ L/pocillo (1×10^4 células/cm² ya que el área del fondo era 2 cm²). Después de la finalización del sembrado celular, la placa de cultivo se incubó en un equipo incubador a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad durante 24 horas, y el medio de cultivo se cambió a 400 μ L del medio basal (EpiLife añadido con insulina, hidrocortisona y transferrina de los aditivos de crecimiento HCGS). Después de 24 horas a partir de entonces, el medio de cultivo se cambió al siguiente medio de cultivo (cada 400 μ L).

[1] medio basal solo (grupo sin adición)

[2] medio basal + mEGF (concentración final: 1 ng/mL; grupo de control positivo)

15 [3] medio basal + compuesto B (concentración final: 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M; grupo de adición del compuesto B)

[4] medio basal + compuesto C (concentración final: 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M; grupo de adición del compuesto C)

Se añadió etanol (5 μ L) a 1 mL de cada uno de los medios de cultivo [1] y [2] para fijar de forma uniforme la concentración de etanol de todos los medios de cultivo a 0,5%.

2) Medida del número celular

20 Después de 24 horas a partir del comienzo de la estimulación con compuesto B o compuesto C, el sobrenadante de cultivo se eliminó de cada pocillo, y un medio basal añadido con Kit-8 de Conteo Celular al 10% (DOJINDO) se dispensó a cada pocillo por 200 μ L. Después de la dispensación, la placa de cultivo se transfirió a un equipo incubador a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad y se incubó durante 2 horas. El sobrenadante (100 μ L) se transfirió a una placa de cultivo de 96 pocillos para cultivo tisular (Corning), y la absorbancia de cada pocillo a 450 nm se midió con un lector de microplaca (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), y se usó como un índice del aumento del número celular.

4. Análisis estadístico

30 Los valores del grupo de control positivo y el grupo de adición de compuesto B o compuesto C se calcularon en base a la absorbancia promedio del grupo sin adición como 100%, y el grupo sin adición se comparó con el grupo de adición del compuesto B o compuesto C y el grupo de control positivo según el ensayo de comparación múltiple de Dunnett (de una cola). Un valor crítico de menos que 5% como un resultado del ensayo se juzgó como significativo.

5. Resultados de ensayo

35 El efecto de aumento del número celular de cada grupo se muestra en la Tabla 4. Las absorbancias medidas muestran que el número celular del grupo de control positivo, grupo de adición del compuesto B y grupo de adición del compuesto C, es significativamente mayor que el del grupo sin adición donde el aumento en el número celular del grupo sin adición es 100%, y se sugiere un aumento en el número celular en estos grupos ($p < 0,01$). A partir de los resultados de ensayo, se ha aclarado que tanto el compuesto B como el compuesto C aumentan el número celular de las células epiteliales de la córnea humana normales.

Tabla 4

Grupo	Índice de aumento del número celular (%)	Diferencia significativa (al grupo sin adición)
Grupo sin adición	100,0 \pm 32,2	
mEGF	232,8 \pm 22,5	**
Compuesto B 10 ⁻⁸ M	252,4 \pm 34,7	**
Compuesto B 10 ⁻⁷ M	256,4 \pm 11,0	**
Compuesto B 10 ⁻⁶ M	254,3 \pm 11,7	**
Compuesto C 10 ⁻⁸ M	243,3 \pm 6,6	**
Compuesto C 10 ⁻⁷ M	247,5 \pm 14,1	**
Compuesto C 10 ⁻⁶ M	260,2 \pm 2,5	**

Los cambios en el número celular cuando se añadió el compuesto B o el compuesto C a células epiteliales de la córnea humana normales cultivadas se muestran en los valores respecto al valor promedio del grupo sin adición como 100% (media \pm desviación estándar, N = 4). ** en la Tabla muestra una diferencia significativa del grupo sin adición ($p < 0,01$).

5 (Ejemplo Experimental 5)

Expresión de PPARs en la célula epitelial de la córnea y en la célula epitelial de la glándula meibomiana.

1. Células usadas

10 Las células epiteliales de la glándula meibomiana de mono usadas fueron las preparadas y cultivadas por un método similar al (Ejemplo Experimental 3). Las células epiteliales de la córnea humana (KURABO) usadas fueron las cultivadas en un equipo incubador a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire, 100% de humedad en un medio basal libre de suero para la proliferación de células epiteliales de la córnea humana normales (EpiLife; KURABO). Las células epiteliales de la córnea de conejo usadas fueron las preparadas y cultivadas mediante el siguiente método.

15 La córnea se cortó de los globos oculares aislados a partir de un conejo al que se ha hecho la eutanasia, se almacenó en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS; Invitrogen) y se transfirió a un banco sanitario. Las siguientes operaciones de preparación celular se llevaron a cabo todas de forma aséptica.

20 El botón corneal aislado se lavó tres veces en D-PBS añadido con penicilina-estreptomina al 1% (Invitrogen), y se transfirió a un medio esencial mínimo (MEM; Invitrogen). Las células de endotelio corneal y la membrana de Descemet del botón corneal sumergido en MEM se separaron con un cuchillo para cirugía ocular (Alcon), y el botón corneal separado (estroma corneal y epitelio corneal) se transfirió a MEM añadido con dispasa II (Roche Diagnostics) a 2,4 U/mL. Este se incubó a 37°C durante 1 hora, y el botón corneal tratado con dispasa II se transfirió a MEM. El epitelio corneal del botón corneal sumergido en MEM se separó con un cuchillo para cirugía ocular, y el residuo de botón corneal (estroma corneal) se eliminó del MEM. El MEM que contenía las células epiteliales de la córnea separadas se recogió en un tubo centrífugo de 50 mL, se centrifugó a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se descargó para dar capas de células epiteliales de la córnea. A las capas de células epiteliales de la córnea se añadió 1 mL de tripsina-EDTA (Invitrogen) y la mezcla se mezcló bien y se incubó a 37°C durante 5 min para eliminar la adhesión célula-célula. A esto se añadieron 9 mL de MEM que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; Invitrogen) para parar la reacción enzimática, y la mezcla se centrifugó de nuevo a temperatura ambiente, 1.500 rpm durante 5 min, para dar capas de células epiteliales de la córnea. A las capas de células epiteliales de la córnea obtenidas se añadió 1 mL de un medio líquido libre de suero para el crecimiento de células epiteliales de la córnea de conejo normales (RCGM2; KURABO) para suspender las células en él, y las células se sembraron en una placa de cultivo celular (diámetro 10 cm, IWAKI) añadida con 9 mL de RCGM2. Las células sembradas se cultivaron en un equipo incubador (SANYO) a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire, 100% de humedad. El medio de cultivo se intercambiaba con uno nuevo cada 48 horas hasta el día del ensayo.

2. Método de ensayo

35 1) Extracción del ARN total de la célula

Se extrajo el ARN total de cada célula según un método convencional para Reactivo TRIzol (Invitrogen).

2) Preparación de ADNc a partir del ARN total extraído

El ARN total extraído se trató con DNasa a 37°C durante 30 min para eliminar el ADN genómico según un método convencional para ADN libre (Ambion).

40 El ADNc se preparó a partir del ARN total extraído según un método convencional para Transcriptasa Inversa Superscript II (Invitrogen). Esto es, se preparó ADNc complementario al ARN total tratado con DNasa a partir de 1 μ g del ARN total usando un cebador aleatorio (Invitrogen).

3) Amplificación de los genes de PPARs (Reacción de la Cadena Polimerasa; PCR)

45 La PCR de genes de PPAR se llevó a cabo según un método convencional para Platinum PCR SuperMix (Invitrogen). El cebador de PPARs se diseñó de manera que el producto de PCR llegó a ser aproximadamente 200 bps en referencia a las secuencias conocidas de ser humano, chimpancé, macaco cangrejero, bovino, ratón y similares.

PPAR α : GTAGAATCTGCGGGGACAAG (sentido) (SEQ ID NO: 1)

: GTTGTGTGACATCCCGACAG (antisentido) (SEQ ID NO: 2)

50 PPAR δ : TTCCTTCCAGCAGCTACACA (sentido) (SEQ ID NO: 3)

: GATCGTACGACGGAAGAAGC (antisentido) (SEQ ID NO: 4)

PPAR γ : CTCCGTGGATCTCTCCGTAA (sentido) (SEQ ID NO: 5)

: GATGCAGGCTCCACTTTGAT (antisentido) (SEQ ID NO: 6)

5 La reacción de PCR se completó mediante una reacción a 94°C durante 2 min 15 seg, seguida por 35 ciclos de reacciones en 3 etapas a 94°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg. La muestra después de la reacción de PCR se trató por electroforesis en gel de agarosa al 2%, y el ADN separado en el gel se tiñó con Oro SYBR (Molecular Probes). Las imágenes del ADN teñido luminiscente en un transiluminador UV se almacenaron como datos digitales.

3. Resultados de ensayo

10 Las bandas del ADN después de la electroforesis se muestran en la Fig. 1. Como resultado de este ensayo, se confirmó que todos los PPAR α , PPAR δ y PPAR γ se expresaron en células epiteliales de la córnea humana y células epiteliales de la glándula meibomiana de mono. En las células epiteliales de la córnea de conejo, solo se confirmó la expresión de PPAR δ . Bonazzi et al. presentan que PPAR α y PPAR β (= δ) a partir de PPARs se expresan en células epiteliales de la córnea de conejo (Bonazzi A. et al., J. Biol. Chem. (2000); 275 (4): 2837-2844). En el reporte, usaron un método especial para detectar PPAR α , que sugiere que el nivel de expresión de PPAR α en células epiteliales de la córnea de conejo es extremadamente pequeño.

Aplicabilidad industrial

20 Según la presente invención, se proporciona un nuevo agente para promover la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana o un nuevo agente para promover la proliferación de células epiteliales de la córnea, y el agente promueve la proliferación de células epiteliales de la glándula meibomiana o células epiteliales de la córnea. Además, el agente terapéutico de la presente invención puede usarse de forma eficaz para el tratamiento o mejora de enfermedades tales como disfunción de la glándula meibomiana, trastorno epitelial de la córnea, ojo seco, y similares.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la glándula meibomiana.
- 10 2. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la córnea.
- 15 3. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de disfunción de la glándula meibomiana.
- 20 4. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de un trastorno epitelial de la córnea.
- 25 5. Ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de ojo seco.
- 30 6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde el ojo seco es un ojo seco hiperevaporativo.
- 35 7. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la glándula meibomiana.
- 40 8. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en la estimulación de la proliferación de una célula epitelial de la córnea.
9. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de disfunción de la glándula meibomiana.
10. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de un trastorno epitelial de la córnea.
11. Un agente que comprende ácido [3-[2-[4-isopropil-2-(4-trifluorometil)fenil-5-tiazolil]etil]-5-metil-1,2-benzisoxazol-6-il]oxiacético, ácido [4-[3-[2-(4-trifluorometil)fenil-4-isopropil-5-tiazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético o ácido [4-[3-[2-(2-hidroxi-4-clorofenil)-5-isopropil-4-oxazolil]propionil]-2-metilfenoxi]acético, o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos para el uso en el tratamiento de ojo seco.
12. El agente de la reivindicación 11, en donde el ojo seco es un ojo seco hiperevaporativo.

FIG. 1

