

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 569**

51 Int. Cl.:

A61K 31/41 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
C07D 293/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009** **E 09714377 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2251009**

54 Título: **Agente profiláctico o terapéutico contra enfermedades oculares acompañadas de un trastorno del nervio óptico**

30 Prioridad:

28.02.2008 JP 2008047099

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

15.10.2014

73 Titular/es:

SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)
9-19, Shimoshinjo 3-chome Higashiyodogawa-ku
Osaka-shi Osaka 533-8651, JP

72 Inventor/es:

HIRAI, SHIN-ICHIRO;
SASAKA, MASAOKI y
SEIKE, HISAYUKI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 507 569 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 profiláctico o terapéutico contra enfermedades oculares acompañadas de un trastorno del nervio óptico

La presente invención se refiere a 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma para su uso en un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico, en donde la enfermedad ocular es el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual o la atrofia óptica glaucomatosa.

La retina tiene la función de recibir luz del exterior, y desempeña un papel importante para la función visual. La retina es estructuralmente un tejido que tiene un grosor de 0,1 a 0,5 mm que está compuesto de 10 capas tales como la capa de epitelio pigmentario de la retina, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, y la capa de fibra nerviosa. En la capa plexiforme interna, existen neuronas denominadas células amacrinas que están emparejadas con las neuritas de las células ganglionares para formar sinapsis. Puesto que estas neuronas responden bien tanto al principio como al final de la irradiación con luz, que se considera funcionan como un detector de la intensidad de la luz. En la capa de células ganglionares, existen células ganglionares que están presentes en la retina más interna (de aquí en adelante también referida como "RGC") y están profundamente implicadas en la visión en movimiento, la visión periférica, la visión del color, la visión de la forma, y similares. Adicionalmente, en la capa de fibras nerviosas, los vasos de la retina que son ramas de la arteria y la vena centrales de la retina ejecutan y desempeñan el papel de suministro de oxígeno y nutrición a las neuronas de la retina.

Cuando los vasos de la retina se ocluyen o se estrechan debido a una causa tal como espasmo, trombo, o arteriosclerosis, se produce un trastorno en la circulación sanguínea de la retina, y de este modo, se bloquea el suministro de oxígeno y nutrientes a la retina o al nervio óptico. Por lo tanto, se ocasionan la degeneración o la pérdida de neuronas de la retina, y se induce un trastorno del nervio óptico. Por lo tanto, el trastorno de la circulación sanguínea de la retina ocupa sobre todo una posición importante en enfermedades de la retina. Los ejemplos de los síntomas representativos que acompañan al trastorno de la circulación sanguínea de la retina incluyen la oclusión vascular retiniana en la que las arterias de la retina o las venas de la retina se ocluyen o se estrechan (por ejemplo oclusión de la arteria central de la retina u oclusión de la ramificación de la arteria retiniana), retinopatía diabética, que es una de las causas de desprendimiento de retina, y neuropatía óptica isquémica en la que se produce disfunción visual. Adicionalmente, se considera que la muerte de las células ganglionares está profundamente implicada también en la incidencia de degeneración macular, la retinitis pigmentosa, la enfermedad de Leber, o similares.

Adicionalmente, el glaucoma es una de las enfermedades oculares que causan disfunción visual grave que conduce a la pérdida de la visión si no se trata adecuadamente. En el glaucoma, entre las neuronas de la retina, particularmente las RGC resultan dañadas selectivamente y se ocasiona el trastorno del nervio óptico, que da como resultado el progreso hacia un defecto en el campo visual. Por lo tanto, se ha establecido ahora la denominada "Neuroprotección", es decir, la idea de que una profilaxis del trastorno de las RGC o una terapia en la que se suprime el trastorno de las RGC al mínimo darán lugar a un tratamiento final del glaucoma (Documento No de Patente 1).

El mecanismo detallado del trastorno del nervio óptico glaucomatoso no se ha dilucidado todavía. Sin embargo, se han propuesto la teoría del daño mecánico, en el que la atrofia del nervio óptico está causada por la compresión directa del nervio óptico debida a un aumento de la presión intraocular, y la teoría del trastorno circulatorio, en la que el trastorno circulatorio en el disco óptico es la causa principal de la atrofia del nervio óptico, y se considera que estos dos mecanismos basados en el daño mecánico y el trastorno circulatorio están relacionados de una manera compleja. Adicionalmente, tanto el daño mecánico y como el trastorno circulatorio ocasionan un trastorno del transporte axónico del nervio óptico, y se considera que la interrupción del suministro de un factor neurotrófico que acompaña a este trastorno del transporte axónico es una de las causas del trastorno de las RGC (Documento No de Patente 2). Además, el glutamato es uno de los neurotransmisores de la retina, sin embargo, se considera que el exceso de activación de la cascada de señalización de glutamato por cualquier causa es también una de las causas del trastorno de las RGC (Documento No de Patente 3).

En consecuencia, si existe un fármaco que tenga un efecto protector sobre neuronas de la retina tales como las RGC, se espera que éste sea útil para la profilaxis o la terapia de una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico, tal como el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual, la atrofia óptica glaucomatosa, la oclusión vascular retiniana, la retinitis pigmentosa, o la enfermedad de Leber.

Por otro lado, la 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona (nombre genérico: Ebselen, en adelante también denominado "Ebselen") tiene un efecto antioxidante, y se ha referido que es útil para la arteriosclerosis cerebral y la insuficiencia circulatoria cerebral crónica, y para activar el transporte de glutamato en las neuronas motoras (Documento No de Patente 4 y Documentos de Patente 1 y 2). Adicionalmente, se ha informado de que Ebselen es útil para un trastorno queratoconjuntival tal como el ojo seco o queratopatía punteada superficial (Documento de Patente 3).

Como informe del estudio del efecto farmacológico de Ebselen sobre las células de la retina, el Documento No de Patente 5 informa de que, en un modelo de conejo de isquemia/reperfusión, Ebselen atenuó la reducción de las ondas b del electrorretinograma (ERG) después de la isquemia/reperfusión. Este informe sólo informa del efecto de Ebselen sobre las células fotorreceptoras (células visuales) situadas en el lado exterior del tejido de la retina (en el lado del tejido de la membrana corioidea), y no describe ni sugiere en absoluto el efecto farmacológico de Ebselen sobre las RGC situadas en el lado interior del tejido de la retina (en el lado del cuerpo vítreo). Las RGC constituyen solo una pequeña porción del tejido de la retina, en otras palabras, representan solo aproximadamente 1% de las neuronas que constituyen la retina. Adicionalmente, el tejido de la retina se provee de sangre de dos sistemas vasculares. Las células fotorreceptoras se proveen de sangre de los capilares de la coroides, y las RGC se proveen de sangre de los capilares de la arteria central de la retina. También desde estos puntos de vista, se considera que el Documento No de Patente 5 solo estudia el efecto de Ebselen sobre la capa exterior del tejido de la retina, y no estudia el efecto farmacológico de Ebselen sobre las RGC.

Adicionalmente, el Documento No de Patente 6 informa de que Ebselen inhibía la muerte celular causada por la excitotoxicidad del glutamato en las células de la retina de pollo en una fase embrionaria utilizando las células. Como se describió anteriormente, las RGC constituyen solo una pequeña porción del tejido de la retina, y por lo tanto, el efecto farmacológico que tiene Ebselen sobre las RGC en realidad sigue siendo desconocido aunque se ha estudiado el efecto de Ebselen en todo el tejido de la retina.

Como se describió anteriormente, no existe ningún informe que estudie el efecto farmacológico de Ebselen sobre las RGC. Asimismo, los documentos de la técnica anterior antes mencionados no sugieren el efecto farmacológico de Ebselen sobre la profilaxis o la terapia de una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico, tal como el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual, la atrofia óptica glaucomatosa, la oclusión vascular retiniana, la retinitis pigmentosa, o la enfermedad de Leber.

Documento de Patente 1: JP-A-2001-261555

Documento de Patente 2: WO 2004/071419

Documento de Patente 3: WO 2006/123676

Documento No de Patente 1: Ophthalmology, 40, 251-273, 1998

Documento No de Patente 2: Ophthalmology, 44, 1413-1416, 2002

Documento No de Patente 3: Surv. Ophthalmol., 48, S38-S46, 2003

Documento No de Patente 4: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(13), 7919-7924 (2003)

Documento No de Patente 5: FASEB Journal, 2004, 18, 4-5, abst. 429.13.

Documento No de Patente 6: Brain Research, 2005, 1039, 146-152

En resumen, es un asunto interesante buscar un nuevo uso farmacéutico de Ebselen.

Los autores de la presente invención realizaron estudios exhaustivos para buscar un nuevo uso farmacéutico de Ebselen y encontraron que, como se describe más adelante, Ebselen aumenta el nivel de expresión de un gen de una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II o una enzima antioxidante, que está regulada induciblemente por Nrf2 ("Factor 2 relacionado con Nf-E2r" por Nf-E2r related Factor 2) en las neuronas de la retina y suprime una disminución en el número de células en la capa de RGC de una manera dependiente de la dosis en un modelo de isquemia/reperfusión que se utiliza ampliamente como modelo de glaucoma, y de este modo se completó la presente invención.

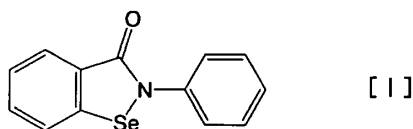
Es decir, la presente invención se refiere a un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad ocular acompañada por trastorno del nervio óptico, tal como el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual, la atrofia óptica glaucomatosa, que comprende Ebselen o una sal del mismo como ingrediente activo. En particular, la presente invención es útil como agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad ocular acompañada de trastorno de las células ganglionares de la retina tales como el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual, o la atrofia óptica glaucomatosa, en el que las RGC se dañan selectivamente y se ocasiona un trastorno del nervio óptico.

Cuando se realizó un ensayo descrito a continuación, se demostró que Ebselen aumenta los niveles de expresión de los genes diana cuya expresión está regulada por Nrf2, es decir, los genes de glutamato cisteína ligasa, subunidad modificadora (en adelante también referida como "GCLM"), tioredoxina reductasa (en adelante también referida como "TRxR"), hemo oxigenasa 1 (en adelante también referida como "HO1"), y NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (en adelante también referida como "NQO1"), en la muerte de neuronas de la retina cultivadas derivadas de feto de rata. Es decir, Ebselen tiene la capacidad de activar Nrf2 y regula induciblemente la expresión de los genes de una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II (por ejemplo, NQO1) y una enzima antioxidante (por ejemplo, HO1) en neuronas de la retina cultivadas derivadas de feto de rata. Adicionalmente, cuando se estudió el efecto de

Ebselen sobre la muerte de las RGC inducida por isquemia/reperfusión de la retina descrita más abajo, Ebselen suprimió la muerte de RGC.

Por consiguiente, Ebselen tiene la capacidad de activar Nrf2 y mejora el daño de RGC regulando induciblemente la expresión de los genes de una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II y una enzima antioxidante, y por lo tanto es útil como un agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico.

El Ebselen que sirve como ingrediente activo de la presente invención es un compuesto heterocíclico condensado representado por la siguiente fórmula química estructural [I].



Adicionalmente, la sal de Ebselen no está particularmente limitada siempre y cuando sea una sal farmacéuticamente aceptable, y sus ejemplos incluyen una sal con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, ácido nítrico, o ácido sulfúrico; y una sal con un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, o ácido tartárico. El Ebselen puede estar en la forma de un solvato.

En la presente invención, la "enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico" incluye glaucoma, neuropatía óptica glaucomatosa, constricción glaucomatosa del campo visual, y atrofia óptica glaucomatosa.

En la presente invención, el término "neuronas de la retina" representa neuronas implicadas en la transmisión de señales visuales al cerebro, y representa específicamente células visuales, células horizontales, células bipolares, células ganglionares de la retina, células amacrinas, y similares.

En la presente invención, el término "protección de neuronas de la retina" no solo representa la supresión de la muerte de las neuronas de la retina y/o la hipofunción de las neuronas de la retina que se produce por cualquier causa, sino que también representa la profilaxis de la muerte de neuronas de la retina y/o la hipofunción de las neuronas de la retina que pueden producir en el futuro.

En la presente invención, el término "protección de las células ganglionares de la retina" no solo representa la supresión de la muerte de las células ganglionares de la retina y/o la hipofunción de las células ganglionares de la retina que se produce por cualquier causa, sino que también representa la profilaxis de la muerte de células ganglionares de la retina y/o hipofunción de las células ganglionares de la retina que se pueden producir en el futuro.

En la presente invención, el término "muerte de las neuronas de la retina" representa la apoptosis y/o necrosis de las neuronas de la retina, y concretamente representa la apoptosis de las neuronas de la retina.

En la presente invención, el término "muerte de las células ganglionares de la retina" representa la apoptosis y/o necrosis de las células ganglionares de la retina, y concretamente representa la apoptosis de las células ganglionares de la retina.

El Ebselen se puede formular en una única preparación o en una preparación combinada mediante la adición de un aditivo farmacéuticamente aceptable según sea necesario utilizando una técnica ampliamente empleada.

Cuando se utiliza Ebselen para la profilaxis o la terapia de la enfermedad ocular antes mencionada, éste se puede administrar a un paciente oralmente o parenteralmente. Los ejemplos de la ruta de administración incluyen la administración oral, la administración tópica a los ojos (tal como la administración mediante instilación, la administración en el saco conjuntival, la administración intravítrea, la administración subconjuntival, y la administración sub-Tenon), la administración intravenosa y la administración transdérmica. Adicionalmente, éste se formula en una forma de dosificación adecuada para la administración junto con un aditivo farmacéuticamente aceptable según sea necesario. Los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para la administración oral incluyen un comprimido, una cápsula, un gránulo, y un polvo, y los ejemplos de la forma de dosificación adecuada para la administración parenteral incluyen inyectables, gotas para los ojos, pomadas oftálmicas, un parche, un gel, y un inserto. Estos se pueden preparar utilizando una técnica común ampliamente utilizada en este campo. Adicionalmente, el Ebselen también se puede formular en una preparación para implante intraocular o una preparación DDS (sistema de suministro de fármacos) tal como una microesfera distinta de aquellas preparaciones.

Por ejemplo, el comprimido se puede preparar seleccionando y utilizando apropiadamente un diluyente tal como lactosa, glucosa, D-manitol, hidrogenofosfato de calcio anhidro, almidón, o sacarosa; un disgregante tal como carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa cálcica, croscarmelosa sódica, crospovidona, almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, o hidroxipropilcelulosa de baja sustitución; un aglutinante tal como hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, goma arábiga, almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, polivinilpirrolidona,

o poli(alcohol vinílico); un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, dióxido de silicio hidratado, o un aceite hidrogenado; un agente de recubrimiento tal como sacarosa purificada, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, o polivinilpirrolidona; una sustancia aromatizante tal como ácido cítrico, aspartamo, ácido ascórbico, o mentol; o similares.

- 5 El inyectable se puede preparar seleccionando y utilizando un agente de tonicidad tal como cloruro de sodio; un tampón tal como fosfato de sodio; un tensioactivo tal como monooleato de polioxietilensorbitán; un agente viscoso tal como metilcelulosa; o similares, según sea necesario.

- 10 La gota ocular se puede preparar seleccionando y utilizando un agente de tonicidad tal como cloruro de sodio o glicerina concentrada; un tampón tal como fosfato de sodio o acetato de sodio; un tensioactivo tal como monooleato de polioxietilensorbitán, estearato de polioxilo 40, o aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado; un estabilizante tal como citrato de sodio o edetato de sodio; un conservante tal como cloruro de benzalconio o parabeno; o similares, según sea necesario. Se permite un pH de la gota siempre y cuando esté dentro del intervalo que es aceptable como preparación oftálmica, pero está general preferiblemente en el intervalo de 4 a 8. Adicionalmente, la pomada oftálmica se puede preparar con una base ampliamente utilizada tal como vaselina blanca o parafina líquida.

- 15 El inserto se puede preparar pulverizando y mezclando un polímero biodegradable tal como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, un polímero de carboxivinilo, o poli(ácido acrílico) junto con Ebselen y moldeando por compresión el polvo resultante. Si es necesario, se pueden utilizar un excipiente, un aglutinante, un estabilizador, o un agente de ajuste del pH. La preparación para implante intraocular se puede preparar utilizando un polímero biodegradable tal como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico, o
20 hidroxipropilcelulosa.

- La dosis de Ebselen se puede cambiar adecuadamente dependiendo de la forma de dosificación, la gravedad de los síntomas, la edad o el peso corporal del paciente que necesite la administración, la opinión médica, y similares. En el caso de la administración oral, se puede administrar generalmente a un adulto de una vez o dividido en varias veces a una dosis de 0,01 a 5000 mg, preferiblemente de 0,1 a 2500 mg, más preferiblemente de 0,5 a 1000 mg por día.
25 En el caso del inyectable, se puede administrar generalmente a un adulto de una vez o dividido en varias veces a una dosis de 0,0001 a 2000 mg por día. En el caso de la gota ocular o del inserto, en general se puede administrar una vez o varias veces al día, una preparación que contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,000001 a 10% (p/v), preferentemente de 0,00001 a 1% (p/v), más preferiblemente de 0,0001 a 0,1% (p/v). Adicionalmente, en el caso de un parche, se puede aplicar un parche que contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,0001 a
30 2000 mg a un adulto, y en el caso de la preparación para implante intraocular, se puede implantar en el ojo de un adulto una preparación para implante intraocular que contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,0001 a 2000 mg.

- En lo sucesivo, se mostrarán los resultados de los ensayos 1 y 2 y los ejemplos de preparación. Sin embargo, estos ejemplos son para comprender bien la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de la presente
35 invención.

Ejemplos

Ensayo 1: Estudio de la capacidad de inducir la expresión de genes de la enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II y de la enzima antioxidante utilizando un sistema de cultivo de neuronas de la retina derivadas de feto de rata

- 40 Se evaluó la capacidad de Ebselen para inducir la expresión de genes de una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II y una enzima antioxidante utilizando un sistema de cultivo de neuronas de retina derivadas de feto de rata (Brain Res. 2003; 967:257-66). Por lo demás, el sistema de cultivo de neuronas de retina derivadas de feto de rata se ha usado extensivamente como una técnica para el cultivo de neuronas de la retina y se ha utilizado ampliamente como una de las herramientas para el estudio de enfermedades del nervio óptico, tales como el glaucoma.

- 45 Método de evaluación

- Se aislaron neuronas de la retina de un feto de rata (Slc: Wistar/ST, 18 días de edad) y se sembraron en un cubreobjetos de plástico recubierto con polietilenimina. A continuación, las células se cultivaron durante 3 días en medio esencial mínimo de Eagle con un suplemento de suero bovino fetal al 10%. Después de eso, se añadió a esto
50 un disolvente (etanol al 0,1%) o Ebselen para producir una concentración final 25 μ M, y las células se incubaron en el medio de cultivo. Por lo demás, el cultivo se llevó a cabo en condiciones de 37°C y CO₂ al 5%. El medio de cultivo se retiró a las 4, 8, o 12 horas después del comienzo de la incubación. Se preparó una mezcla disolvente añadiendo β -mercaptoetanol al 1% (v/v) (fabricado por BioRad, Núm. de Cat. 161-0710) a tampón RLT unido a RNeasy Mini Kit (250) (fabricado por QIAGEN, Núm. de Cat. 74106), y las neuronas de la retina sobre el cubreobjetos de plástico se lisaron con la mezcla disolvente preparada de este modo. El ARN total se extrajo del producto lisado celular
55 resultante de acuerdo con el protocolo adjunto al RNeasy Mini Kit (250), y el ADNc se sintetizó utilizando el kit de reactivos ExScript™ RT (fabricado por TAKARA, Núm. de Cat. RR035B). De acuerdo con el protocolo adjunto a SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (fabricado por TAKARA, Núm. de Cat. RR041B), se mezclaron SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time), Colorante de Referencia ROX, el ADNc sintetizado, y cada par de cebadores de

la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (en adelante también referida como "GAPDH"), GCLM, TRxR, HO-1, o NQO-1 (fabricado por Nihon Gene Research Laboratories Inc.), y la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un sistema de PCR cuantitativa (fabricado por Applied Biosystems, nombre del sistema: ABI PRISM 7000), y se midió el nivel de expresión de cada uno de los genes de GAPDH, GCLM, TRxR, HO-1, y NQO-1. A partir de los resultados obtenidos, se calculó un nivel de expresión relativo de cada gen diana mediante la normalización del nivel de expresión de cada gen diana con el nivel de expresión de GAPDH, que es un gen constitutivo de acuerdo con la ecuación 1. Adicionalmente, se obtuvo una razón de inducción (%) de cada gen diana para el grupo de vehículo dividiendo el valor del nivel de expresión de cada gen en el grupo con Ebselen 25 μ M por un valor medio del nivel de expresión del mismo gen en el grupo de vehículo de acuerdo con la ecuación 2. Cada dato se mostró como la media $\pm$ desviación típica de tres experimentos independientes.

Por lo demás, las secuencias de los respectivos cebadores utilizados en esta evaluación son las siguientes.

[Tabla 1]

Nombre	Secuencia de nucleótidos
par de cebadores GAPDH	GGGCTCATGACCACAGTCCA
	CACGCCACAGCTTTCCAGAG
par de cebadores GCLM	GTGTGATGCCACCAGATTTGAC
	CCTGGAAACTTGCCTCAGAGAG
par de cebadores TRxR	AATTTCCGGCAGTGTGTGTCC
	ACCCAAGAGCCATGCAATGAG
par de cebadores HO-1	GTGCTCGCATGAACACTCTGG
	AGTGCCTGCAGCTCCTCAAAC
par de cebadores NQO-1	GGAAGCTGCAGACCTGGTGATA
	GCATACGTGTAGGCGAATCCTG

[Ecuación 1]

Nivel de expresión relativo de cada gen diana = (Nivel de expresión de cada gen / Nivel de expresión de GAPDH)

[Ecuación 2]

Razón de inducción de cada gen diana con respecto al grupo de vehículo (%) = (Nivel de expresión de cada gen en el grupo con Ebselen 25 μ M / Nivel de expresión de cada gen en el grupo de vehículo)

(Resultados)

Los resultados se muestran en la Tabla 2. Como resulta evidente a partir de la Tabla 2, se demostró que Ebselen aumenta los niveles de expresión de los genes de GCLM, TRxR, HO-1, y NQO-1, que son una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II o una enzima antioxidante en sistema de cultivo de neuronas de la retina derivadas de feto de rata.

[Tabla 2]

	Razón de inducción de la expresión de cada gen en el grupo con Ebselen 25 µM con respecto al grupo de vehículo (%: media ± desviación típica)		
Nombre de cada gen	Después de 4 horas	Después de 8 horas	Después de 12 horas
GCLM	198 ± 18	194 ± 14	172 ± 13
TRxR	225 ± 11	193 ± 13	301 ± 26
HO-1	1263 ± 365	1458 ± 307	1311 ± 237
NQO-1	450 ± 74	937 ± 183	1266 ± 212

Ensayo 2: Ensayo Farmacológico utilizando un modelo de rata de daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión

La utilidad de Ebselen contra el daño a la retina por isquemia/reperfusión se evaluó utilizando un modelo de rata de daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión (Ophthalmologica. 1991; 203: 138-147) como modelo para estudiar el efecto sobre el daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión. Por lo demás, el modelo de rata de daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión es un modelo animal en el que se induce isquemia en la retina mediante la aplicación de presión hidráulica al segmento anterior del ojo, y después de un período determinado de tiempo, se vuelve a perfundir el flujo de sangre mediante la liberación de la presión hidráulica, y es ampliamente utilizado como uno de los modelos animales del trastorno del nervio óptico causado principalmente por el glaucoma.

(Método de Producción para el modelo de rata de daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión y Método de Evaluación)

Se instiló una solución oftálmica de hidrato de sulfato de atropina al 1% p/v (fabricado por Nihon Tenganyaku, Co. Ltd., nombre del producto: Solución Oftálmica Nitten ATROPINE al 1%) en el ojo de una rata (Slc: SD, macho, aproximadamente 7 semanas de edad) para causar midriasis, y se indujo anestesia general permitiendo que la rata inhalara un gas obtenido mediante la vaporización de halotano (fabricado por Takeda Pharmaceutical Company Limited, nombre del producto: Fluothane) al 3% (v/v) mediante una mezcla de gases (2 L/min) de oxígeno al 100% (v/v) (0,5 l/min) y óxido nítrico al 100% (v/v) (1,5 L/min), y la anestesia se mantuvo en condiciones de halotano al 1% (v/v). Se colgó del techo un recipiente de infusión que contenía solución salina fisiológica (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., nombre del producto: solución salina normal Otsuka), y se insertó una aguja de inyección de 30 G conectada al recipiente a través de un tubo en la cámara anterior, y de este modo, se aplicó una presión hidráulica de 130 mm de Hg para inducir la isquemia. Cuarenta y cinco minutos más tarde, se retiró la aguja de inyección, y el flujo sanguíneo de la retina se volvió a perfundir. Siete días después del tratamiento de isquemia/reperfusión, se administró intraperitonealmente una solución inyectable de pentobarbital sódico (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., nombre del producto: solución inyectable de Nembutal) a la rata a una dosis de 100 mg/kg para lograr la anestesia general, y se enucleó el globo ocular. El globo ocular enucleado se fijó por medio de un líquido mixto de glutaraldehído al 25% (p/v) y formalina tamponada neutra al 10% (p/v) (glutaraldehído : formalina tamponada neutra = 1:9). El globo ocular fijado se incluyó en parafina y se cortó en secciones, por medio de lo cual se prepararon secciones de la retina (grosor: 3 µm). Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se prepararon 8 secciones de retina con un intervalo de 45 µm por ojo de manera que la cabeza del nervio óptico estuviera contenida en ellas. De las 8 secciones, se seleccionaron arbitrariamente 3 secciones, y con respecto a las secciones seleccionadas, se tomó una fotografía de la retina en el intervalo de 1 a 1,5 mm en el lado izquierdo o derecho desde la cabeza del nervio óptico, y se midió el número de células en la capa de células ganglionares de la retina. Después de eso, de acuerdo con la ecuación 3, se calculó una razón de supresión (%) de Ebselen contra la disminución en el número de células en la capa de células ganglionares de la retina causada por el daño mediante isquemia/reperfusión de manera que el número de células en el grupo no tratado se tomó como el 100%, y el número de células en el grupo en el que el vehículo (solución de metilcelulosa al 1% p/v) se había administrado oralmente a la rata sometida al tratamiento de la isquemia/reperfusión se tomó como 0%. Por lo demás, el número de animales en cada grupo es de 6 a 8 (de 6 a 8 ojos).

[Ecuación 3]

Razón de supresión contra la disminución del número de células en la capa de células ganglionares de la retina (%) = $(NX - NV) / (NU - NV) \times 100$

NU: Número de células en la capa de células ganglionares en el grupo no tratado

NV: Número de células en la capa de células ganglionares en el grupo en el que el vehículo se había administrado oralmente a la rata sometida al tratamiento de isquemia/reperfusión

NX: Número de células en la capa de células ganglionares en el grupo en el que el fármaco se había administrado

oralmente a la rata sometida al tratamiento de isquemia/reperfusión

(Método de administración)

Grupo de administración de vehículo:

5 Se administró oralmente una solución de metilcelulosa al 1% (p/v) (preparada disolviendo metilcelulosa en agua purificada) repetidamente dos veces al día durante 12 días de 5 días antes a 6 días después de la fecha del tratamiento de isquemia/reperfusión.

Grupo de administración de Ebselen:

10 Se administró oralmente Ebselen suspendido en una solución de metilcelulosa al 1% (p/v) repetidamente dos veces al día durante 12 días de 5 días antes a 6 días después de la fecha del tratamiento de isquemia/reperfusión a una dosis de 3 o 30 mg/kg.

(Resultados)

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como resulta evidente a partir de la Tabla 3, se demostró que Ebselen suprime la disminución en el número de células en la capa de células ganglionares de la retina de una manera dependiente de la dosis en el modelo de rata de daño a la retina inducido por isquemia/reperfusión.

15 [Tabla 3]

Constitución del grupo		Razón de supresión contra la disminución en el número de células en la capa de células ganglionares de la retina (%)
Ebselen	3 mg/kg/día	38,0
	30 mg/kg/día	59,7

(Discusión)

20 A partir de los resultados anteriores, el Ebselen aumentó los niveles de expresión de los genes de GCLM, TRxR, HO-1, y NQO-1, que son una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II o una enzima antioxidante y están regulados induciblemente por Nrf2 en las neuronas de la retina, y también suprimió la disminución en el número de células en la capa de células ganglionares de la retina de una manera dependiente de la dosis en el modelo de isquemia/reperfusión que se utiliza ampliamente como un modelo de glaucoma. Es decir, se demostró que Ebselen

25 tiene un notable efecto profiláctico o de mejora sobre una enfermedad ocular acompañada por trastorno del nervio óptico, tales como el glaucoma, la neuropatía óptica glaucomatosa, la constricción glaucomatosa del campo visual, la atrofia óptica glaucomatosa, el trastorno del nervio óptico causado por insuficiencia circulatoria de la sangre, el trastorno isquémico del nervio óptico, la oclusión de la arteria central de la retina, la oclusión de la ramificación de la

30 arteria retiniana, la oclusión de la vena central de la retina, la oclusión de ramificación de la vena retiniana, la retinitis pigmentosa, la enfermedad de Leber, la retinopatía del prematuro, el desprendimiento de retina, el desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina, la degeneración macular o la retinopatía diabética, en los que se produce la muerte de las neuronas de la retina. Adicionalmente, se ha demostrado que puesto que Ebselen suprime la disminución del número de células en la capa de células ganglionares de la retina de una manera dependiente de la dosis, éste tiene un efecto profiláctico o de mejora particularmente notable sobre una enfermedad ocular

35 acompañada de trastorno de las células ganglionares de la retina tales como glaucoma, neuropatía óptica glaucomatosa, constricción glaucomatosa del campo visual, o la atrofia óptica glaucomatosa, en los que las RGC resultan dañadas de forma selectiva.

[Ejemplos de Preparación]

Los fármacos de la presente invención se describirán más específicamente con referencia a los ejemplos de preparación, sin embargo, la presente invención no se limita solo a estos ejemplos de preparación.

Ejemplo de Formulación 1: gota ocular

40 en 100 ml

Ebselen	10 mg
Cloruro de sodio	900 mg
Polisorbato 80	cs

Hidrogenofosfato disódico	cs
Dihidrogenofosfato disódico	cs
Agua purificada estéril	cs

5 El Ebselen y los otros ingredientes anteriormente mencionados se añaden a agua purificada estéril, y estos ingredientes se mezclan bien, por medio de lo cual se prepara una gota ocular. Al cambiar la cantidad de adición de Ebselen, se puede preparar una gota ocular que contiene Ebselen a una concentración de 0,05% (p/v), 0,1% (p/v), 0,5% (p/v), o 1% (p/v) puede estar preparado.

Ejemplo de Formulación 2: Pomada oftálmica

	en 100 g	
10	Ebselen	0,3 g
	Parafina líquida	10,0 g
	Vaselina blanca	cs

15 El Ebselen se añade a la vaselina blanca y la parafina líquida fundidas de manera uniforme, estos ingredientes se mezclan bien, y la mezcla resultante se enfría gradualmente, mediante por medio de lo cual se prepara una pomada oftálmica. Cambiando la cantidad de adición de Ebselen, se puede preparar una pomada oftálmica que contiene Ebselen a una concentración de 0,05% (p/p), 0,1% (p/p), 0,5% (p/p), 1% (p/p), o 3% (p/p).

Ejemplo de formulación 3: Comprimido

	en 100 mg	
	Ebselen	1 mg
20	Lactosa	66,4 mg
	Almidón de maíz	20 mg
	Carboximetilcelulosa de calcio	6 mg
	Hidroxipropilcelulosa	6 mg
	Estearato de magnesio	0,6 mg

25 El Ebselen y la lactosa se mezclan en un mezclador, se añaden a esto carboximetilcelulosa de calcio e hidroxipropilcelulosa, y la mezcla resultante se granula. Los gránulos obtenidos se secan, seguido de clasificación por tamaño. A continuación, se añade estearato de magnesio y se mezcla con los gránulos clasificados por tamaños y la mezcla resultante se formula en comprimidos con una máquina de formación de comprimidos. Cambiando la cantidad de adición de Ebselen, se puede preparar un comprimido que contiene Ebselen en una cantidad de 0,1 mg, 10 mg, o 50 mg en 100 mg de comprimido.

Ejemplo de formulación 4: Inyectable

	en 10 ml	
	Ebselen	10 mg
	Cloruro de sodio	90 mg
35	Polisorbato 80	cs
	Agua purificada estéril	cs

40 El Ebselen y el cloruro de sodio se disuelven en agua purificada estéril, por medio de lo cual se prepara un inyectable. Cambiando la cantidad de adición de Ebselen, se puede preparar un inyectable que contiene Ebselen en una cantidad de 0,1 mg, 10 mg, o 50 mg en 10 ml de inyectable.

El Ebselen tiene la capacidad de activar Nrf2 y regula de manera inducible la expresión de los genes de una enzima metabolizadora de xenobióticos de fase II y una enzima antioxidante, mejorando de este modo el trastorno de las RGC. Por lo tanto, el Ebselen es útil como agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Santen Pharmaceutical	
	<120> Agente profiláctico o terapéutico para una enfermedad acompañada de trastorno óptico	
	<130> S1031	
5	<140> EP 09714377.0 <141> 27-02-2009 <150> JP 2008-047099 <151> 28-02-2008 <160> 10	
10	<170> PatentIn versión 3.5 <210> 1 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador <400> 1 gggctcatga ccacagtcca 20	
20	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
25	<400> 2 cacgccacag cttccagag 20 <210> 3 <211> 22 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial <220> <223> cebador <400> 3 gtgtgatgcc accagattg ac 22	
35	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador <400> 4 cctggaaact tgcctcagag ag 22	
45		
	<210> 5 <211> 21 <212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 5		
	aatttcggc agtgtgtgc c	21	
10	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 6		
	acccaagagc catgcaatga g	21	
20	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
30	<400> 7		
	gtgctcgcat gaacactctg g	21	
35	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 8		
	agtgctgca gctcctcaa c	21	
45	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 9		
	ggaagctgca gacctggtga ta	22	
55	<210> 10		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> cebador		
65	<400> 10		
	gcatacgtgt aggccaatcc tg	22	

REIVINDICACIONES

- 5 1. 2-Fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma para su uso en un tratamiento profiláctico o terapéutico para una enfermedad ocular acompañada de trastorno del nervio óptico, en donde la enfermedad ocular es glaucoma, neuropatía óptica glaucomatosa, constricción glaucomatosa del campo visual, o atrofia óptica glaucomatosa.
2. 2-Fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad ocular es el glaucoma.
- 10 3. 2-Fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la ruta de administración es administración por instilación, administración intravítrea, administración subconjuntival, administración en el saco conjuntival, administración sub-Tenon, o administración oral.
4. 2-Fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la forma de dosificación es una gota ocular, una pomada oftálmica, un inserto, un parche, un inyectable, un comprimido, un gránulo micronizado, o una cápsula.