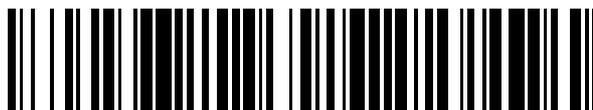


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 245**

51 Int. Cl.:  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61P 27/00** (2006.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04728020 .1**  
96 Fecha de presentación: **16.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1616577**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **2-CLORO-6,7-DIMETOXI-N-[5-(1)H-INDAZOLIL]QUINAZOLINA-4-AMINA, DIHIDROCLORURO DE N-(1-BENCIL-4-PIPERIDINIL)-1H-INDAZOL-5-AMINA, ÁCIDO 4-[2-(2,3,4,5,6-PENTAFLUOROFENIL)ACRILÓIL]CINÁMICO E HIDROCLORURO DE FASUDILO PARA USO EN LA RECUPERACIÓN DE LA PERCEPCIÓN CORNEAL.**

30 Prioridad:  
**18.04.2003 JP 2003114819**  
**11.07.2003 JP 2003273177**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.12.2011**

73 Titular/es:  
**SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD.**  
**5-8, HIRANOMACHI 2-CHOME, CHUO-KU**  
**OSAKA-SHI, OSAKA 541-0046, JP**

72 Inventor/es:  
**TAKAYAMA, Yoshiko;**  
**NAKAMURA, Yoshikuni;**  
**INOUE, Jun y**  
**AZUMA, Mitsuyoshi**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 245 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

2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1H-indazolil)quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidrocloreto de fasudilo para uso en la recuperación de la percepción corneal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un agente que comprende un inhibidor de la proteína Rho para promover la neuritogénesis de la córnea, y un agente para la recuperación o mejora de la sensibilidad de la córnea o el tratamiento del ojo seco, basado en la promoción de la neuritogénesis de la córnea.

10 Puesto que el nervio de la córnea es dañado por operaciones de córnea tales como la queratectomía fotorefractiva (PRK) por láser, queratomileusis in situ asistida por láser (LASIK), queratoplastia y similares, se dice que la sensibilidad de la córnea disminuye generalmente de tres semanas a un año. Por ejemplo, se ha descrito que el nervio de la córnea está severamente dañado después de LASIK (Tuuli U. Linna et al., *Experimental Eye Research* 66: 755-763, 1998), y la sensibilidad de la córnea disminuye en una región de la córnea donde, después de LASIK, el neurograma no se observa o el haz del nervio es demasiado corto para crear la conexión (Tuuli U. Linna et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 41: 393-337, 2000).

15 Se ha demostrado que la hiposensibilidad de la córnea después de PRK y LASIK causa menor respuesta de la glándula lacrimosa y disminuye el fluido lacrimoso (Ang, Robert T. et al., *Current Opinion in Ophthalmology* 12: 316-322, 2001). Como resultado de la disminución funcional de la sensibilidad de la córnea, los pacientes después de la operación de la córnea parpadean un menor número de veces, mostrando problemáticamente los síntomas del ojo seco. En los pacientes con el ojo seco, la hipofunción lacrimal origina la elevación de la hiposensibilidad de la córnea, que, en combinación con la hipofunción lacrimal adicional, agrava problemáticamente el estado de la superficie de la córnea.

20 Actualmente, sin embargo, la recuperación de la sensibilidad de la córnea después de una intervención de la córnea se deja que se recupere espontáneamente, y en el tratamiento del ojo seco, no se proporciona tratamiento activo para recuperar la sensibilidad de la córnea.

25 En adición, la hiposensibilidad de la córnea es causada por las enfermedades que acompañan la neurodegeneración de la córnea, tales como la queratopatía neuroparalítica, la úlcera de la córnea, la queratopatía diabética y similares.

30 La proteína Rho es una proteína G de bajo peso molecular incluida en la familia de Rho (que contiene Rho, Rac, Cdc42, etc.) y se sabe que está envuelta en la organización del citoesqueleto de actina y la reacción de retracción de la neurita.

35 Por ejemplo, se sabe que la enzima C3, un inhibidor de la proteína Rho, extiende la protusión de la célula del fibroblasto 3T3 (Hirose, M. et al., *The Journal of Cell Biology*, 141: 1625-1636, 1998), y se ha descrito un método para promover el crecimiento del axón del nervio central mediante la administración de una cantidad eficaz del inhibidor de la proteína Rho a pacientes (documento de patente japonesa JP-T-2001-515018 y documento de patente europea EP-1.011.330-A). En adición, se sabe que un inhibidor de la quinasa Rho, que está entre las moléculas efectoras de la proteína Rho, tiene una acción de extensión del axón de las células ganglionares de la retina, y exhiben una acción que promueve la regeneración en la célula del nervio óptico (documento de patente internacional WO 02/83175 y documento de patente europea EP-1.142.585-A). El documento de patente internacional WO 03/020281 enseña que un compuesto capaz de promover la regeneración del nervio o la extensión de la neurita puede usarse para el tratamiento de un estado de una enfermedad causada por una alteración del nervio de la córnea después de cirugía tal como LASIK y semejantes. Se muestra como ejemplo de tales compuestos, la neotrofina, que es una sustancia estimulante del factor neurotrófico, y similares, pero no se encuentra ninguna descripción ni sugerencia en cuanto a un inhibidor de la proteína Rho.

40 Con relación al nervio trigémino, se ha descrito que, en un sistema de cultivo de tejido del nervio trigémino de rata (tracto trigémino en cultivos completos en portaobjetos), la extensión del axón del nervio inducido por la neurotrofina del factor de crecimiento del nervio (NGF) y similares se inhibe por un activador de Rho (ácido lisofosfatídico), y se facilita con la introducción de Rho negativa dominante en una célula (Ozdinler, P. Hande et al., *The Journal of Comparative Neurology*, 438: 377-387, 2001). Entretanto, hay una descripción sobre que es desconocido si Rho es eficaz en la extensión del axón del nervio del tracto trigémino en la ausencia de neurotrofina, y el efecto de un inhibidor de la proteína Rho sobre el nervio trigémino no ha sido elucidado.

45 Por otra parte, se revela que puesto que un compuesto que tiene un efecto activador de Rho tiene una acción de migración epitelial de la córnea y que la enzima C3, que es un inhibidor de la proteína Rho, inhibe la migración del epitelio de la córnea del mismo, un compuesto que tiene un efecto de activación de Rho es eficaz para el fallo de la córnea tal como en la úlcera de la córnea, abrasión epitelial de la córnea, queratitis y similares (documento de patente japonesa JP2000-264847A y documento de patente europea EP-1.142.585A).

55

**Descripción de la invención**

La invención presente proporciona un agente farmacéutico que muestra recuperación funcional de la sensibilidad de la córnea en pacientes con disminución funcional de la sensibilidad de la córnea, de pacientes después de cirugía de la córnea tales como la queratectomía fotoreactiva de láser (PRK), queratomileusis in situ con láser (LASIK), queratoplastia y similares.

Los inventores presentes han investigado con el fin de proporcionar un nuevo tipo de agente farmacéutico que recupere la sensibilidad de la córnea después de cirugía de la córnea o mejore la condición de sensibilidad de la córnea en un ojo seco y han encontrado en primer lugar que el inhibidor de la proteína Rho tiene un efecto de promoción de la neuritogénesis para las células del nervio trigémino (en lo sucesivo a veces se le refiere como nervio de la córnea). Han realizado estudios adicionales basados en estos hallazgos y han completado la invención presente que utiliza un inhibidor de la proteína Rho como un fármaco para la recuperación de la sensibilidad de la córnea y similares.

En consecuencia, la invención presente se refiere a

1. Una composición farmacéutica para promover la extensión del axón del nervio de la córnea, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.

2. Una composición farmacéutica para la recuperación de la sensibilidad de la córnea, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1-H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.

3. Una composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.

4. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para promover la neuritogénesis de la córnea.

5. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para promover la extensión del axón del nervio de la córnea.

6. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico, e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para la recuperación de la sensibilidad de la córnea.

7. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es una imagen de microscopio de fluorescencia de las células del nervio trigémino del conejo cultivadas en el Ejemplo Experimental 1, en donde A son células del nervio trigémino de conejo cultivadas durante 24 horas en un medio de cultivo sin adición de enzima C3 y B muestra las células cultivadas durante 24 hrs en un medio de cultivo que contiene enzima C3 a una concentración final de 2 µg/ml.

La Fig. 2 muestra la relación (%) de células neuritogénicas al número total de células en el Ejemplo Experimental 1, en donde el eje vertical muestra el porcentaje de células neuritogénicas a células totales, cada valor muestra la media ± el error estándar de 3 experimentos y \* muestra una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con relación al control.

La Fig. 3 es una imagen de microscopio de fluorescencia de las células del nervio trigémino de conejo cultivadas en el Ejemplo Experimental 2, en donde A muestra las células cultivadas en un medio de cultivo sin adición de la sustancia de prueba, B muestra las células cultivadas en un medio de cultivo con adición del compuesto 1 (concentración final 10 µM), C muestra las células cultivadas en un medio de cultivo con adición del compuesto 2 (concentración final 10 µM), D muestra las células cultivadas en un medio de cultivo con adición del compuesto 3

(concentración final 1  $\mu$ M) y E muestra las células cultivadas en un medio de cultivo con adición del compuesto 4 (concentración final 10  $\mu$ M) durante 48 horas.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la relación (%) de células neuritogénicas a número de células total contadas en el Ejemplo Experimental 2, en el que cada valor muestra la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos, \* muestra una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con relación al grupo sin adición, y \*\* muestra una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) relativa al grupo sin adición.

La Fig. 5 muestra los resultados de Western blotting de ROCK I y ROCK II de la córnea del conejo (C) y los ganglios del trigémino (T) en el Ejemplo Experimental 3.

#### Descripción detallada de la invención

En la presente solicitud, el inhibidor de la proteína Rho se refiere a los compuestos seleccionados a partir de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-(5-(1-indazolil)quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acrililoil]cinámico e hidrocloreuro de fasudilo que inhiben que la proteína Rho unida a GDP inactiva sea activada a una proteína Rho unida a GTP activa, un anticuerpo contra la proteína Rho o fragmentos de la proteína Rho y similares, y cualquier inhibidor que inhiba la acción de una molécula efectora que transduce la acción de la proteína Rho, tales como la quinasa Rho (ROCK) y similares. El "nervio de la córnea" se refiere al plexo anular formado en los alrededores de la córnea bajo el control del nervio trigémino, que es una neurona sensorial, plexo de estroma distribuido reticularmente en el estroma de la córnea, plexo sub-epitelial formado inmediatamente por debajo de la membrana de Bowman y plexo de células basales y fibra nerviosa formado inmediatamente después de penetrar la membrana de Bowman. En la invención presente, "neurita" se refiere a una protrusión (dendrita y axón) del cuerpo de la célula de la neurona (célula nerviosa), y "génesis" se refiere a una excrecencia y/o extensión de la neurita del cuerpo de la célula mencionada anteriormente. Es claro para aquellos con una habilidad ordinaria de la técnica que nivel de neuritogénesis está considerado como promoción. La promoción de la neuritogénesis puede ser confirmada por ejemplo, por tinte fluorescente de la célula nerviosa y observación de la condición de la célula con un microscopio de fluorescencia. Además, los resultados de la observación mediante un microscopio de fluorescencia pueden analizarse mediante un software de análisis de imagen y similares. Además, el estado de neuritogénesis puede ser numéricamente expresado procesando los resultados estadísticamente. Como todavía otro método, una sustancia que constituye el cuerpo celular del nervio y la neurita, tal como un neurofilamento, puede ser etiquetado con un anticuerpo que reconozca el mismo y un anticuerpo conjugado con una peroxidasa de rábano (HRP) que reacciona con dicho anticuerpo, HRP se usa como un índice de la neuritogénesis.

Puede mencionarse como el inhibidor de la proteína Rho, por ejemplo, la exoenzima C3 (algunas veces simplemente denominada como enzima C3 en la presente solicitud), la toxina A, la toxina B y el inhibidor de la quinasa Rho, pero no es parte de la invención.

Los inhibidores de la quinasa Rho (en lo sucesivo algunas veces referidos como inhibidor ROCK) son el compuesto descrito en el documento de patente japonesa JP61-227581A (documento de patente de los Estados Unidos USP 4.678.783) o sea el hidrocloreuro de FASUDILO; el compuesto descrito en el documento de patente internacional WO 00/57914 y el documento de patente japonesa JP2000-44513A, o sea, el ácido 1-(2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acrililoil]cinámico; el compuesto descrito en el documento de patente internacional WO 02/076973 (documento de patente europea EP-1.370.552-A y 1.370.553-A) o sea la 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-(5-1H-indazolil)quinazolina-4-amina; y el compuesto descrito en el documento de patente internacional WO 02/100833 o sea, el dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1N-imidazol-5-amina monohidrato.

En la explicación siguiente, los agentes farmacéuticos y composiciones que contienen el inhibidor de la proteína Rho que se utiliza en la presente invención son también algunas veces referidos colectivamente como "un agente farmacéutico de la invención presente".

El agente farmacéutico de la invención presente es útil para la recuperación de la disminución funcional de la sensibilidad de la córnea en los mamíferos (por ejemplo, seres humanos, rata, ratón, conejo, bovinos, cerdos, perros, gato y similares) en donde el nervio de la córnea está dañado o cortado o es defectuoso. Por ejemplo, es útil como un agente terapéutico para recuperar la sensibilidad disminuida de la córnea después de PRK, LASIK y similares, la sensibilidad disminuida de la córnea que acompaña la neurodegeneración de la córnea, tal como con la queratopatía neuroparalítica, úlcera de la córnea, queratopatía diabética y similares, o como un agente terapéutico para el ojo seco que tiene disminuida la sensibilidad de la córnea.

El agente farmacéutico de la invención presente es administrado de forma sistémica o tópicamente. Sistémicamente, se administra por vía oral y por vía parenteral. Se administra como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular y similares. Tópicamente, se administra en los ojos.

Como forma de dosificación del agente farmacéutico de la invención presente, pueden mencionarse las formas sólidas tales como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, supositorios y similares; líquidas tales como jarabes, inyecciones, gotas para el ojo y similares; y los similares.

5 Para la producción de los agentes farmacéuticos de la invención presente como gránulos y comprimidos, cualquier forma de dosificación puede producirse mediante, por ejemplo, excipientes (lactosa, sacarosa, glucosa, almidón, celulosa microcristalina y semejantes), lubricantes (estearato de magnesio, talco, ácido esteárico, estearato de calcio y similares), disintegrantes (almidón, carmelosa sódica, carbonato de calcio y similares), aglutinantes (pasta de engrudo de almidón, solución de hidroxipropilcelulosa, solución de carmelosa, solución de goma arábiga, solución de gelatina, solución de alginato de sodio y similares) y similares. Para gránulos y comprimidos puede formarse una película de recubrimiento mediante agentes de recubrimiento adecuados (gelatina, sacarosa, goma arábiga, cera de carnauba y similares), recubrimientos entéricos (por ejemplo, ftalato de acetato de celulosa, copolímero de ácido metacrílico, ftalato de hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa y similares) y similares.

15 Para la producción de los agentes farmacéuticos como cápsulas, una mezcla de excipientes adecuados como estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, anhídrido silícico ligero y similares para mejorar la fluidez y deslizamiento, celulosa microcristalina, lactosa y similares para la fluidez en la presurización, así como los disintegrantes mencionados anteriormente y similares agregados como sea adecuado son uniformemente mezclados o granulados, recubiertos con un agente de recubrimiento adecuado para formar una película y empaquetados en una cápsula, o moldeados por encapsulación con una cápsula base que tiene mayor plasticidad, la cual contiene una base adecuada de cápsula (gelatina y similares), glicerina o sorbitol y similares. Estas cápsulas pueden contener agentes colorantes, conservantes [dióxido de azufre, parabenos (paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo o paraoxibenzoato de propilo)] y similares como sea necesario. La cápsula puede ser una convencional, una cápsula con recubrimiento entérico, una cápsula gástrica revestida o una cápsula de control de la liberación. Cuando se produce una cápsula entérica, se añade un compuesto recubierto con un agente de recubrimiento entérico o los excipientes adecuados antes mencionados a un compuesto y se empaquetan en una cápsula convencional o la cápsula misma puede estar recubierta con un agente de recubrimiento entérico o un polímero entérico que puede utilizarse como base para el moldeo.

Para la producción del agente farmacéutico de la invención presente como un supositorio, una base de supositorio (por ejemplo, mantequilla de cacao, macrogol y similares) puede ser debidamente seleccionada y utilizada.

30 Para la producción de los agentes farmacéuticos como jarabe, pueden ser adecuadamente seleccionados y utilizados, por ejemplo, estabilizadores (edetato sódico y similares), agentes de suspensión (goma arábiga, carmelosa y similares), correctores (jarabe simple, glucosa y similares), aromas y similares.

35 Para la producción del agente farmacéutico de la invención presente como una inyección o gotas para el ojo, pueden producirse disolviendo o dispersando el inhibidor en una solución adecuada que contenga aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de isotonicidad (cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, glucosa, propilenglicol y similares), tampones (tampón de fosfato, tampón de acetato, tampón de borato, tampón de carbonato, tampón de citrato, tampón Tris, tampón de glutamato, tampón de  $\epsilon$ -aminocaproato y similares), conservantes (p-oxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, dehidroacetato de sodio, edetato de sodio, ácido bórico, bórax y similares), espesantes (hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, alcohol de polivinilo, polietilenglicol y similares), estabilizantes (bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, edetato de sodio, citrato de sodio, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno y similares), agentes ajustadores del pH (ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido fosfórico, ácido acético y similares) y similares.

45 Mientras que la cantidad de los aditivos que se van a utilizar para los mencionados jarabe, inyección y gotas para el ojo varía dependiendo del tipo de aditivos que se van a utilizar, el uso y similares, pueden añadirse a una concentración capaz de lograr el propósito del aditivo, y generalmente se agrega un agente de isotonicidad, a una concentración de 0,5-5,0% p/v para hacer que la presión osmótica sea de 229-343 mOsm. Además, se agrega un tampón en una concentración de 0,-2,0% p/v, se añade un espesante en una concentración de 0,01-1,0% p/v, y se añade un estabilizante en una concentración de 0,001-1,0% p/v. Se añade apropiadamente un agente ajustador de pH para generalmente conseguir un pH de 3-9, preferiblemente 4-8.

50 Para uso particular del agente farmacéutico de la invención presente como gotas de ojo, el límite inferior de la concentración del inhibidor de la proteína Rho contenido en los agentes farmacéuticos de la invención presente se ajusta a generalmente 0,00001% p/v, preferentemente es 0,00005% p/v o más preferentemente es 0,0001% p/v y el límite superior se ajusta a 0,1% p/v, preferiblemente es 0,05% p/v, más preferiblemente es 0,01% p/v, lo más preferible es 0,005% p/v o lo aún más preferible es 0,001% p/v.

55 Mientras que la dosis del agente farmacéutico de la invención presente varía dependiendo de la enfermedad de destino, los síntomas, el sujeto de la administración, el tipo de inhibidor de la proteína Rho, el método de administración y similares, cuando, por ejemplo, se administra tópicamente al ojo de un adulto después de cirugía PRK como un agente para la recuperación de la sensibilidad de la córnea, por ejemplo, gotas para el ojo líquidas que contienen 0,001% p/v de la enzima C3 o 0,003% p/v del inhibidor de la proteína Rho tal como dihidrocloruro de

N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina 1/2 hidrato es depositado preferentemente en el ojo varias veces al día en de 20 a 50 µl por dosis.

Además, cuando el agente farmacéutico de la invención presente se administra por vía oral a un adulto como un agente de recuperación de la sensibilidad de la córnea después de la cirugía LASIK, por ejemplo, un comprimido que contiene alrededor de 10 mg de un inhibidor de la proteína Rho como el ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acrililo]cinámico es preferentemente administrado una o dos veces al día.

### Ejemplos

La invención presente se explica con más detalle al referirse a los siguientes Ejemplos Experimentales y Ejemplos, que no deben tomarse como limitativos.

#### 10 Ejemplo Experimental 1

Efecto promotor de neuritogénesis en células del nervio trigémino de conejo cultivadas

##### 1) Animales usados

Se usaron conejos blancos japoneses (de 2-3 días de edad) obtenidos de Fukusaki Rabbit Warren.

##### 2) Sustancia de prueba

15 Enzima C3 [fabricado por Upstate; Exoenzima C3 (enzima recombinante expresada en E. coli); Catálogo N° 13118, N° de lote 23330]

##### 3) Método de prueba

20 Cultivo celular: las células del nervio trigémino fueron aisladas de acuerdo con el informe de Chan et al. (Chan, Kuan Y. y Haschke, Richard H., Exp. Eye Res., 41: 687-699, 1985). Para ser específicos, bajo anestesia de éter, después de la perfusión cardiaca del conejo con solución salina, se quitó el ganglio del trigémino, se dispersó utilizando una solución de dispersión de nervios (SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.), y las células fueron inoculadas en una diapositiva de cultivo de 8 pocillos (BECTON DICKINSON Co., Ltd.) recubierta con polilisina. El número de células fue aproximadamente  $3 \times 10^3$  células por pocillo y las condiciones de cultivo fueron 5% CO<sub>2</sub>, 95% aire y humedad 100% a 37° C. Para el cultivo celular, se utilizaron el medio Neurobasal (GIBCO) con suplemento de B27 (GIBCO; 0,02 ml/ml de solución de cultivo) y ácido L-glutámico (GIBCO; concentración final 1 mM) y enzima C3 (concentración final de 2 µg/ml) se añadieron al medio inmediatamente después de la inoculación de células y las células fueron cultivadas durante 24 horas.

30 Inmunotinción: después de 24 horas de cultivo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 2 horas y el cuerpo de las células nerviosas y neuritas fueron teñidos para la fluorescencia usando un anticuerpo anti-neurofilament 200 (fabricado por Sigma) que reconoce específicamente neurofilamentos que son filamentos intermedios específicos de una célula nerviosa y un anticuerpo fluorescente secundario (fabricado por Molecular Probes) reactivo con ellos. Las células teñidas fueron importadas como imágenes (una imagen: 1,83 mm x 1,36 mm) desde el microscopio de fluorescencia al ordenador, y se contó el número de células enteras (t) de cada imagen. Junto con ello, se midió la longitud de la célula neurita utilizando un software de análisis de imagen (MacSCOPE, fabricado por MITANI CO.), y las células que tenían una neurita con una longitud de no menos de dos veces el diámetro del cuerpo celular fueron contadas como células neuritogénicas (a). Se importaron varias imágenes hasta que el total de células enteras en las respectivas imágenes ( $t_1 + t_2 + \dots + t_n = \Sigma t$ ) alcanzó por lo menos 100. Entonces se calculó la relación (%) del número total de células neuritogénicas ( $a_1 + a_2 + \dots + a_n = \Sigma a$ ) al número total de células ( $\Sigma t$ ). Para comparar el grupo de adición de la enzima C3 y el grupo de no adición (grupo de control) con respecto a esta relación, se realizó la prueba de t y una relación crítica de menos de 5% fue tomada como significativa.

##### 4) Resultados de las pruebas

45 La Fig. 1 muestra las imágenes del microscopio de fluorescencia de las células nerviosas cultivadas del trigémino del conejo, en donde A muestra células del grupo control cultivadas durante 24 horas en un medio de cultivo sin adición de la enzima C3 y B muestra células cultivadas durante 24 horas en un medio de cultivo que contiene la enzima C3 a una concentración final de 2 µg/ml, y la Fig. 2 muestra el porcentaje del número de células neuritogénicas en relación al número total de células de cada grupo.

50 La relación de células neuritogénicas fue aproximadamente del 21% del número total de células en el grupo de control y aproximadamente del 46% del número total de células en el grupo de adición de la enzima C3. La adición de la enzima C3 aumentó significativamente el número de células que mostró excrescencias de neurita (Fig. 2).

De lo anterior, se ha encontrado que la enzima C3 que tiene una actividad de inhibidor de Rho promueve excrescencias de neurita en las células del nervio trigémino.

Ejemplo experimental 2

Efecto promotor de excrecencias de neurita en células del nervio trigémino del conejo cultivadas

1) Animales usados

Se utilizaron conejos blancos japoneses (2-3 días de edad) obtenidos de KITAYAMA LABES Co., Ltd..

5 2) Sustancia de prueba

Como inhibidor de ROCK, se usaron la 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-1H-indazolil]quinazolina-4-amina, el dicloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, el ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico y el hidrocloreuro de fasudilo.

10 La 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-1H-indazolil]quinazolina-4-amina (en lo sucesivo debe ser indicada como el compuesto 1) utilizada fue sintetizada según el Ejemplo 1 de referencia. El dicloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina·1/2 hidrato (en lo sucesivo debe ser indicado como el compuesto 2) utilizado fue sintetizado según el Ejemplo 2 de referencia. El ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico (en lo sucesivo debe ser indicado como el compuesto 3) utilizado fue sintetizado según el Ejemplo 3 de referencia. El hidrocloreuro de fasudilo (en lo sucesivo debe ser indicado como el compuesto 4) utilizado fue una inyección de hidrato de hidrocloreuro de fasudilo disponible  
15 comercialmente, "Eiril Injection 30 mg" (fabricado por Asahi Kasei Corporation).

3) Cultivo celular

20 Las células del nervio trigémino de conejo fueron aisladas del mismo modo como en el Ejemplo Experimental 1. Para el cultivo celular, se usó un medio de cultivo obtenido por adición del suplemento B27 (fabricado por GIBCO; concentración final 2% v/v) y L-glutamina (fabricada por GIBCO; concentración 1 mM) al medio de cultivo neurobasal (fabricado por GIBCO). Se colocó una tapa circular de cristal (diámetro 12 mm; fabricada por SUMITOMO BAKELITE) después de recubirla con polilisina/laminina en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, y se platearon las células en la tapa de cristal a aproximadamente  $3 \times 10^3$  células/pocillo. Después de la adhesión celular a la tapa de cristal (aproximadamente 2 horas), el anteriormente mencionado medio de cultivo se cambió a un medio de cultivo que contenía cada sustancia de prueba (compuesto 1, concentración final, 10  $\mu$ M; compuesto 2, concentración final, 10  $\mu$ M; compuesto 3, concentración final, 1  $\mu$ M; compuesto 4, concentración final, 10  $\mu$ M) y las células fueron cultivadas durante 48 horas. Las condiciones de cultivo fueron 5% CO<sub>2</sub>, 95% de aire, 100% de humedad, y 37° C.

4) Inmuntocinación

30 Después del cultivo durante 48 horas se fijaron las células 2 horas a temperatura ambiente mediante 4% paraformaldehído.

35 Se fijó un espécimen utilizando un anticuerpo anti-neurofilamento 200 (fabricado por Sigma) que reconoce neurofilamentos, que son filamentos intermedios específicos al nervio celular, y se tiñó con fluorescencia un anticuerpo fluorescente secundario (fabricado por Molecular Probes) reactivo con ellos y se detectaron las células teñidas utilizando un microscopio de fluorescencia. Las imágenes teñidas fueron importadas en un ordenador a 1 imagen: 1,83 mm x 1,36 mm. Se contó el número de células enteras (t) de cada imagen. Junto con ello, se midieron la longitud de la neurita celular y el diámetro del cuerpo celular utilizando un software de análisis de imagen (MacSCOPE, fabricado por MITANI CO.), y las células que tenían una neurita con una longitud de no menos de dos veces el diámetro del cuerpo celular fueron contadas como células neuritogénicas (a). Después se calculó la relación (%) del número total de células neuritogénicas ( $a_1 + a_2 + \dots + a_n = \Sigma a$ ) en relación al número total de células ( $\Sigma t$ ).

40 5) Procesamiento estadístico

Se compararon el grupo sin adición (control) y el grupo de adición de sustancia de prueba en cuanto a la relación de células neuritogénicas por la prueba múltiple de Dunnet, y una relación crítica de menos de 5% fue tomada como significativa.

6) Resultados de las pruebas

45 La Fig. 3 muestra las imágenes del microscopio de fluorescencia de las células del nervio trigémino de conejo cultivadas.

La Figura 3A muestra las células cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo sin adición de sustancia de prueba, la Fig.3B muestra las células cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo con la adición del compuesto 1, la Fig. 3C muestra las células cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo con la adición del compuesto 2, la Fig.3D muestra las células cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo con la adición del compuesto 3 y la Fig. 3E muestra las células cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo con la adición del compuesto 4.

La Figura 4 muestra la relación de los números de células neuritogénicas del grupo sin adición y los grupos de adición de sustancia de ensayo respectivos en relación con el número total de células. La relación de células neuritogénicas en relación a las células totales fue aproximadamente el 31% para el grupo sin adición, aproximadamente el 41% para el grupo de adición del compuesto 1, aproximadamente el 57% para el grupo de adición del compuesto 2, aproximadamente el 51% para el grupo de adición del compuesto 3, y aproximadamente el 70% para el grupo de adición del compuesto 4, y los grupos de adición de sustancia de prueba mostraron un aumento significativo o una tendencia hacia el aumento de la relación de células neuritogénicas.

Por medio de los resultados anteriores, se ha aclarado que un inhibidor ROCK muestra un efecto de promoción de la neuritogénesis en las células del nervio trigémino.

#### 10 Ejemplo de referencia 1

Síntesis de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-1H-indazolil]quinazolina-4-amino (documento de patente internacional WO 02/076977, Ejemplo 1)

Se añadieron 2,4-dicloro-6,7-dimetoxiquinazolina (8,6 g, 64,58 mmoles), 5-aminoindazol (4,8 g, 36,04 mmoles) y acetato de potasio (7,351 g, 74,91 mmoles) a tetrahidrofurano/agua purificada (138 ml/62 ml), y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se añadió agua purificada (130 ml) a la mezcla para permitir la precipitación de los cristales. Los cristales precipitados fueron lavados con agua purificada y recristalizados de DMF-H<sub>2</sub>O para dar la deseada 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-1H-indazolil]quinazolina-4-amina como un polvo levemente amarillo.

pf 278,7-283,8° C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3,93 (s, 3H), 3,96 (s, 3 H), 7,16 (s,1H), 7,60 (m, 2H), 7,90 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 9,94 (s, 1H), 13,13, (s ancho,1H).

Analítica calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Cl·1/2H<sub>2</sub>O: C, 55,97, H, 4,14, N, 19,20. Encontrado: C, 56,05, H, 4,46, N, 19,22.

#### Ejemplo de referencia 2

Síntesis del dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina ½ hidrato (documento de patente internacional WO 02/100833, Ejemplo 1)

Se añadió a una solución de 1-bencil-4-piperidona (14,21 g, 75,1 mmoles, 13,92 ml) en 1,2-dicloroetano (80 ml) 5-aminoindazol (10,0 g, 75,10 mmoles), borohidruro de triacetosisodio (11,5 g, 52,6 mmoles) y ácido acético (4,29 ml, 75,1 mmoles) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se vertió la mezcla de reacción en una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó con sulfato magnésico anhidro. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo obtenido fue recristalizado de metanol para dar N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina (7,8 g, 34%).

pf 150,1-152,2° C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1,39 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 2,08 (t, 2H, J = 10,8), 2,79 (d, 2H, J = 11,4), 3,19 (m, 1H), 3,47 (s, 3H), 5,11 (d, 1H, J = 7,8), 6,68 (s ancho, 1H), 6,83 (dd, 1H, J = 8,9, 1,7), 7,20 – 7,37 (m, 6H), 12,58 (s ancho, 1H).

Analítica calculado para C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>: C, 74,48, H, 7,24, N, 18,29. Encontrado: C, 74,42, H, 7,27, N, 18,37

A una solución de la N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina obtenida (6,0 g, 19,58 mmoles) en tetrahidrofurano (60 ml) se le agregó una solución de ácido clorhídrico 1 N/éter (38 ml) y una solución de ácido clorhídrico 4 N/acetato de etilo (13 ml) a temperatura ambiente, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El sólido precipitado fue recogido por filtración y recristalizado de metanol para dar el dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina ½ hidrato (4,32 g, 56%).

pf 193,0-194,6° C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 2,18 (m, 1,75H), 2,51 (m, 0,25H), 2,98 (m, 1,5H), 3,17 (m, 0,5 H), 3,41 (m, 2H), 3,68 m (0,75H), 3,90 m (0,25H), 4,25 (m, 1,5 H), 4,46 (m, 0,5H), 7,40-7,64 (m, 6H), 7,59 (m, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,92 (m, 1H), 8,20 (s, 1H), 11,02 (s ancho, 0,75H), 11,53 (s ancho, 0,25H).

Analítica calculado para C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>2HCl 1/2 H<sub>2</sub>O: C, 58,76, H, 6,49, N, 14,43. Encontrado: C, 58,49, H, 6,48, N, 14,45.

#### Ejemplo de referencia 3

Síntesis del ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico (documento de patente japonesa JP2000-44513A, ejemplo 8)

## ES 2 370 245 T3

### Paso 1

5 En atmósfera de nitrógeno, se añadieron el ácido (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acético (20 g, 93,5 moles), éter (7 ml) y ácido sulfúrico concentrado (0,5 ml) a isobuteno (27 ml) mientras que se refrigeraba con hielo seco, y la mezcla se agitó en un tubo resistente a la presión a temperatura ambiente durante 3 días. Se añadió la mezcla de reacción a una mezcla de solución de bicarbonato de sodio acuoso al 10% y hielo enfriada con hielo seco y la mezcla se agitó. Se agregó éter y la mezcla se extrajo. La capa orgánica se lavó con salmuera saturada, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró bajo presión reducida para dar el éster de t-butilo del ácido (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acético (24,4 g, 97%).

### Paso 2

10 Se añadió a una solución de ácido 4-formilbenzoico (20 g, 0,133 moles) en piridina (138 ml) la sal monopotásica del malonato etílico (46 g, 0,270 moles), el monohidrato del ácido p-toluensulfónico (50 g, 0,263 moles) y piperidina (2,0 ml) y la mezcla se calentó gradualmente. La mezcla se agitó a 120° C durante 1,5 horas. Con enfriamiento por hielo, la mezcla de reacción fue acidificada con ácido clorhídrico 2 N y el precipitado se recogió para dar el éster etílico del ácido 4-carboxicinámico (26,58 g, 91%) como cristales.

### 15 Paso 3

En atmósfera de nitrógeno, se añadió a una solución del éster etílico del ácido 4-carboxicinámico (5,0 g, 22,7 mmoles) en cloroformo (15 ml) cloruro de tionilo gota a gota (8,4 ml), se añadió dimetilformamida (1 gota) y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida para dar el cloruro de ácido.

20 En atmósfera de nitrógeno, se añadió a una solución del éster t-butílico del ácido (2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acético (6,35 g, 23,5 mmoles) obtenido en el paso 1 en tetrahidrofurano (100 ml) gota a gota una solución 1 M de la bis(trimetilsilil)amida de litio en tolueno (26 ml) mientras que se enfriaba con hielo seco. Cinco minutos más tarde, se agregó gota a gota una solución del cloruro de ácido obtenido en el paso 2 en tetrahidrofurano (100 ml). A los 20 minutos de la finalización de la adición gota a gota, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico al 5% (120 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se extrajo con éter. La capa orgánica fue lavada con agua y salmuera saturada, secada con sulfato de magnesio anhidro y concentrada bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice para dar el éster etílico del ácido 4-[(2RS)-2-(t-butoxicarbonil)-2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acetil]cinámico (4,83 g, 44%) como cristales.

### 30 Paso 4

Se colocó una solución del éster etílico del ácido 4-[(2RS)-2-(t-butoxicarbonil)-2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acetil]cinámico (5,6 g, 11,6 mmoles) obtenido en el paso 3 en dioxano (24 ml) en un tubo resistente a la presión, y se añadió ácido clorhídrico concentrado (24 ml). La mezcla se agitó durante 4 horas mientras que se calentaba a 130° C. La mezcla de reacción fue enfriada con hielo y el precipitado fue recogido por filtración para dar el éster etílico del ácido 4-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acetil]cinámico (3,7 g, 90%) como cristales. Se colocó una solución del ácido 4-[(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acetil]cinámico (2,03 g, 5,7 mmoles) en dioxano (115 ml) en un tubo resistente a la presión, se añadieron paraformaldehído (0,7 g), hidrocioruro de dimetilamina (1,86 g, 22,8 mmoles), ácido acético (10 gotas) y sulfato de magnesio anhidro (8 g) y la mezcla se agitó durante la noche mientras que se calentaba a 130° C. Bajo refrigeración de hielo, la mezcla de reacción fue acidificada con ácido clorhídrico 0,1 N y extraída con acetato de etilo. La capa orgánica fue lavada con salmuera saturada, secada sobre sulfato magnésico anhidro y concentrada a presión reducida. El precipitado fue recogido por filtración para dar el compuesto del título (1,46 g, 93%) como cristales.

pf 214,0-217,0° C.

45 <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,25 (s, 1H), 6,30 (s, 1H), 6,46 (d, 1H, J=16,2), 7,57 (d, 2H, J=8,4), 7,64 (d, 1H, J=15,9), 7,78 (d, 2H, J=8,4)

### Ejemplo experimental 3

Expresión de proteínas de ROCK I, ROCK II en los ganglios del trigémino y tejido de la córnea del conejo

#### 1) Animales utilizados

Se utilizaron conejos blancos machos japoneses obtenidos de KITAYAMA LABES Co., Ltd.

#### 50 2) Preparación de proteína de tejido soluble

Se sacrificaron los animales por eutanasia y se quitaron los ganglios del trigémino y la córnea. Los tejidos obtenidos se colocaron en solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo (fabricada por Invitrogen), se lavaron, se

5 colocaron en tampón de Tris-hidrocloruro enfriado con hielo 20 mM (pH 7,5) que contenía 0,1% Triton X-100 (fabricado por Pharmacia Biotech) y 1 tableta/10 ml de cóctel inhibidor de proteasa (completo, Mini; fabricado por Roche) y se ultrasonicaron. Se centrifugó la solución de disrupción de crudo de células derivada de cada tejido, que se había obtenido por ultrasonificación, (10,000xg, 15 minutos, 4°), y el sobrenadante se recuperó para dar una solución de proteína de tejido soluble. La cantidad de proteína en la solución fue cuantificada con el reactivo de ensayo BCA de proteína (fabricado por PIERCE).

3) Detección de ROCK I, ROCK II mediante Western blot

10 ROCK I y ROCK II contenidos en la proteína de tejido soluble preparada se detectaron por Western blot. Una solución preparada que contenía 25 µg de proteína fue separada por electroforesis en 8% SDS-gel de poliacrilamida (fabricado por TEFCO), y la proteína separada en el gel fue transferida eléctricamente a una membrana de PVDF (Immobilon-P; Millipore). La membrana con la proteína transferida fue bloqueada con leche descremada de 5%, se la hizo reaccionar con un anticuerpo de cabra anti-ROCK I o un anticuerpo de cabra anti-ROCK II (ambos fabricados por SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) y fue secundariamente etiquetada con un anticuerpo de IgG anti-cabra conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (fabricado por Bio-Rad, Richmond, CA). El antígeno fue inmunodetectado con un kit de tñido de AP (fabricado por Bio-Rad, Richmond, CA).

4) Resultados de las pruebas

Los resultados del Western blot se muestran en la figura 5. Se confirmó que ambos ROCK I y ROCK II se expresaron a nivel de proteína en una proteína soluble de ganglios del trigémico del conejo y de tejido de la córnea.

Ejemplo 1: comprimido (no es parte de la invención)

Enzima C3	10 mg
Lactosa	80 mg
Almidón	17 mg
Estearato de magnesio	3 mg
Celulosa microcristalina	10 mg

20 Se forman comprimidos usando los componentes anteriores como materiales para un comprimido, de acuerdo con un método convencional. Los comprimidos pueden recubrirse como sea necesario con un recubrimiento entérico convencional (por ejemplo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y similares), o una capa de azúcar o una película (por ejemplo, etilcelulosa). El principal agente, la enzima C3, puede cambiarse por los compuestos 1, 2, 3 o 4. Si se cambia la proporción de mezcla de aditivos, pueden prepararse comprimidos que contienen 20 mg, 5 mg, 1 mg, 0, 5 mg o 0,1 mg/ comprimido del agente principal.

Ejemplo 2: cápsula (no es parte de la invención)

Enzima C3	50 mg
Manitol	75 mg
Almidón	17 mg
Estearato de calcio	3 mg

30 Usando los componentes anteriores como materiales para una cápsula se mezclan de forma uniforme, se granulan de acuerdo con un método convencional y se empaquetan en una cápsula dura. Antes del embalaje, los gránulos pueden recubrirse como sea necesario con un recubrimiento entérico convencional (por ejemplo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa), una capa de azúcar o una película (por ejemplo, etilcelulosa). El principal agente, la enzima C3, puede cambiarse por los compuestos 1, 2, 3 o 4. Si se cambia la proporción de mezcla de aditivos, pueden prepararse cápsulas que contienen 20 mg, 10 mg, 5 mg, 1 mg, 0, 5 mg o 0,1 mg/ cápsula del agente principal.

Ejemplo 3: inyección (no es parte de la invención)

Enzima C3	750 mg
Carboximetilcelulosa de sodio	500 mg
Agua para inyección	Cantidad total 100 ml

35 Los componentes anteriores se mezclan asépticamente con arreglo a un método convencional para dar una inyección. El principal agente, la enzima C3, puede cambiarse por los compuestos 1, 2, 3 o 4. Si se cambia la

proporción de mezcla de aditivos, pueden prepararse inyecciones que contienen 1000 mg, 500 mg, 200 mg, o 100 mg/100 ml.

Ejemplo 4: gotas para los ojos (no es parte de la invención)

Enzima C3	5 mg
Ácido bórico	700 mg
Borax	cantidad adecuada (pH 7,0)
Cloruro sódico	500 mg
Hidroximetilcelulosa	0,5 g
Edetato sódico	0,05 mg
Cloruro de benzalconio	0,005 mg
Agua purificada esterilizada	hasta cantidad total 100 ml

- 5 Se calienta el agua purificada esterilizada (80 ml) hasta alrededor de 80° C, se agrega hidroximetilcelulosa y la mezcla se agita hasta que la temperatura del líquido llega a temperatura ambiente. Se añaden la enzima C3, cloruro sódico, ácido bórico, edetato sódico y cloruro de benzalconio a esta solución para permitir su disolución. Se añade una cantidad adecuada de bórax para ajustar el pH a 7. Se añade agua purificada esterilizada hasta un volumen de 100 ml. El principal agente, la enzima C3, puede cambiarse por los compuestos 1, 2, 3 o 4. Si se cambia la proporción de mezcla de aditivos, pueden prepararse gotas para los ojos que contienen al agente principal en 1% p/v, 0,5% p/v, 0,3% p/v, 0,1% p/v, 0,05% p/v, 0,03% p/v, 0,01% p/v, 0,003% p/v y 0,001% p/v.

10

Ejemplo 5: gotas para los ojos (no es parte de la invención)

Enzima C3	10 mg
D-manitol	4,5 g
Fosfato dihidrógeno de sodio	0,1 g
Hidróxido sódico	Cantidad adecuada (pH 7,0)
Agua purificada esterilizada	hasta cantidad total 100 ml

- 15 Se añaden la enzima C3, D-manitol y fosfato dihidrógeno de sodio a agua purificada esterilizada (80 ml) para permitir su disolución. Se añade una cantidad adecuada de hidróxido sódico para ajustar el pH a 5,0. Se agrega agua purificada esterilizada hasta la cantidad total de 100 ml. Las gotas de ojos preparadas se filtran asépticamente con un filtro de membrana y se meten en un recipiente desechable (dosis unitaria) y se sella. El principal agente, la enzima C3, puede cambiarse por los compuestos 1, 2, 3 o 4. Si se cambia la proporción de mezcla de aditivos, pueden prepararse gotas de ojos que contienen al agente principal en 1% p/v, 0,5% p/v, 0,3% p/v, 0,1% p/v, 0,05% p/v, 0,03% p/v, 0,005% p/v, 0,003% p/v y 0,001% p/v.

15

### Aplicabilidad industrial

- 20 Puesto que el agente farmacéutico de la invención presente, que contiene un inhibidor de la proteína Rho, tiene un efecto promotor de la neuritogénesis en las células del nervio trigémino, es útil para mejorar la disminución funcional de la sensibilidad de la córnea asociada con el daño al nervio de la córnea y similares, y los síntomas del ojo seco asociados con una disminución funcional de la sensibilidad de la córnea. Específicamente, se espera que la aplicación de un inhibidor de la proteína Rho proporcione un efecto de mejora en la disminución de la sensibilidad de la córnea después de la cirugía de cataratas o cirugía LASIK, disminución de la sensibilidad de la córnea y ojo seco asociado con la neurodegeneración de la córnea tal como en la queratopatía neuroparalítica, úlcera de la córnea, queratopatía diabética y similares.
- 25

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en promover la extensión del axón del nervio de la córnea, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.
- 10 2. Una composición farmacéutica para su uso en la recuperación de la sensibilidad de la córnea, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.
- 15 3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del ojo seco, cuya composición comprende un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo.
- 20 4. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para promover la neuritogénesis de la córnea.
- 25 5. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para promover la extensión del axón del nervio de la córnea.
6. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico, e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para la recuperación de la sensibilidad de la córnea.
7. El uso de un compuesto seleccionado de 2-cloro-6,7-dimetoxi-N-[5-(1)-indazolil]quinazolina-4-amina, dihidrocloruro de N-(1-bencil-4-piperidinil)-1H-indazol-5-amina, ácido 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)acriloil]cinámico, e hidroccloruro de fasudilo para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento del ojo seco.

FIG. 1

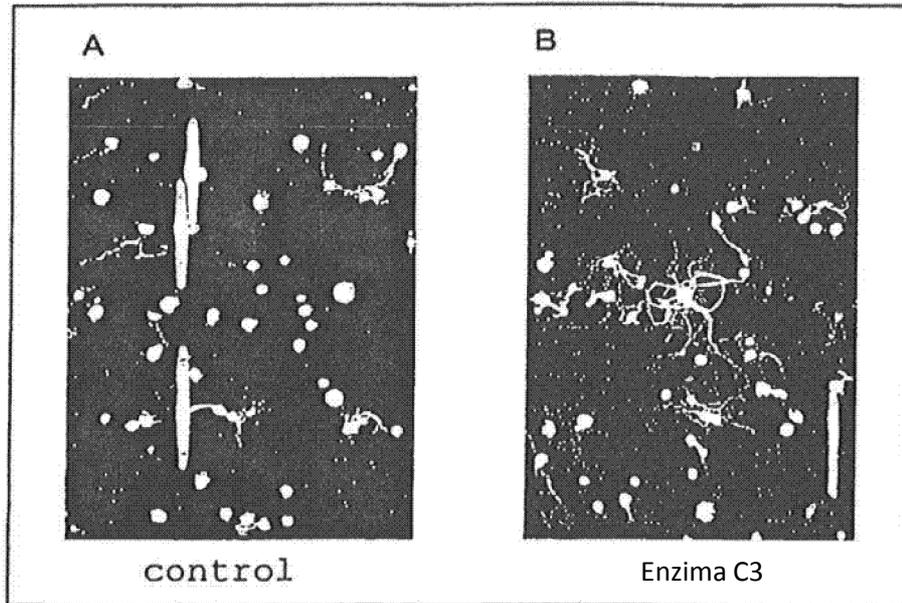


FIG. 2

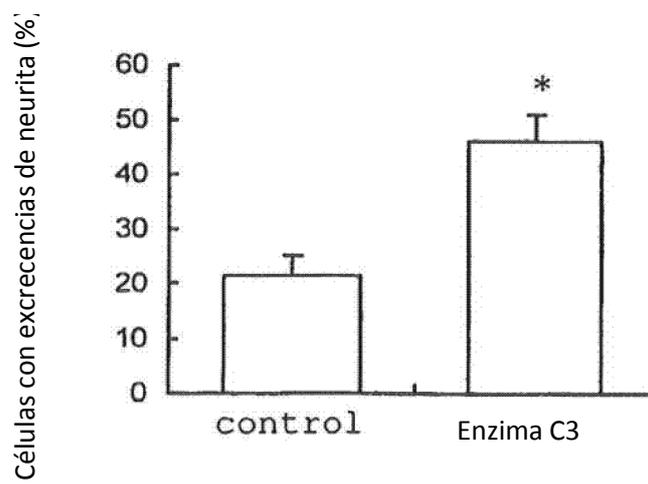
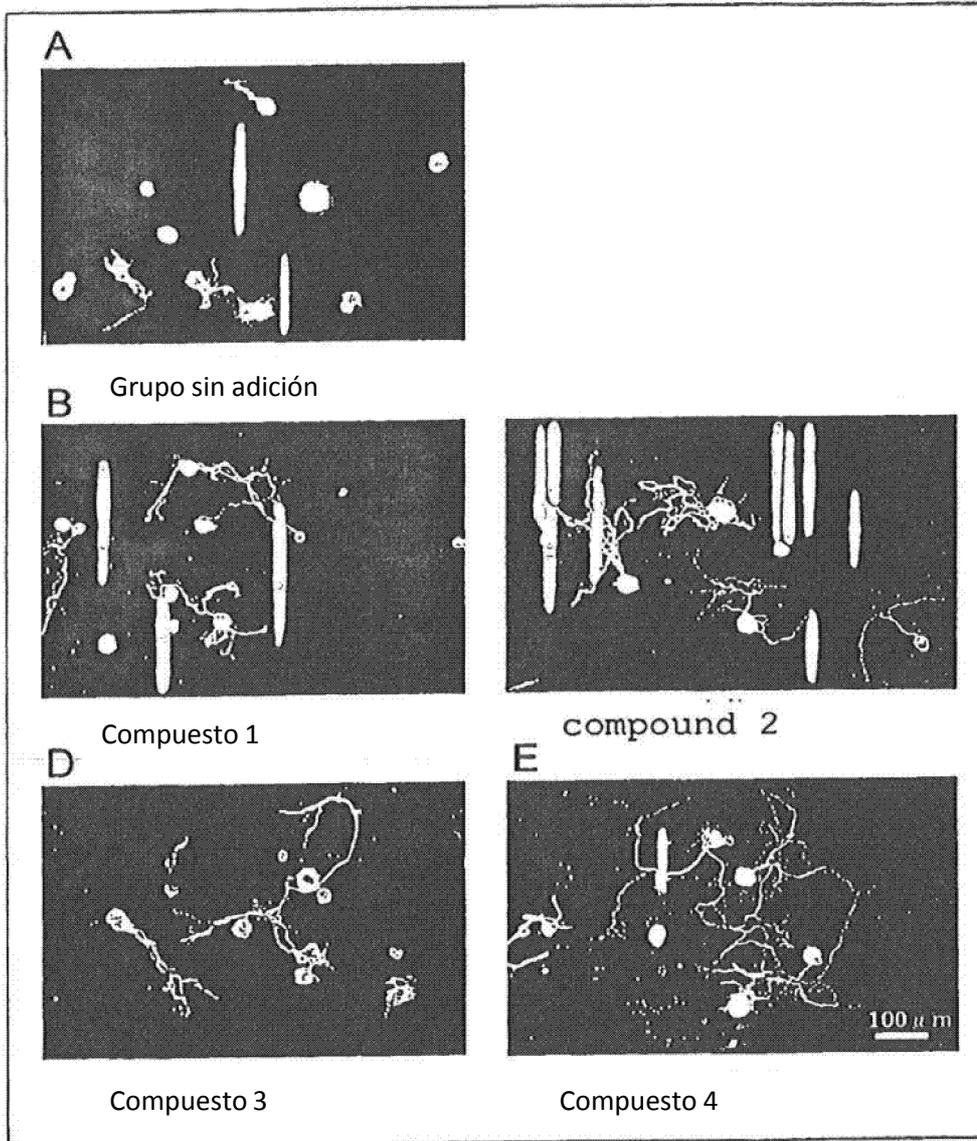
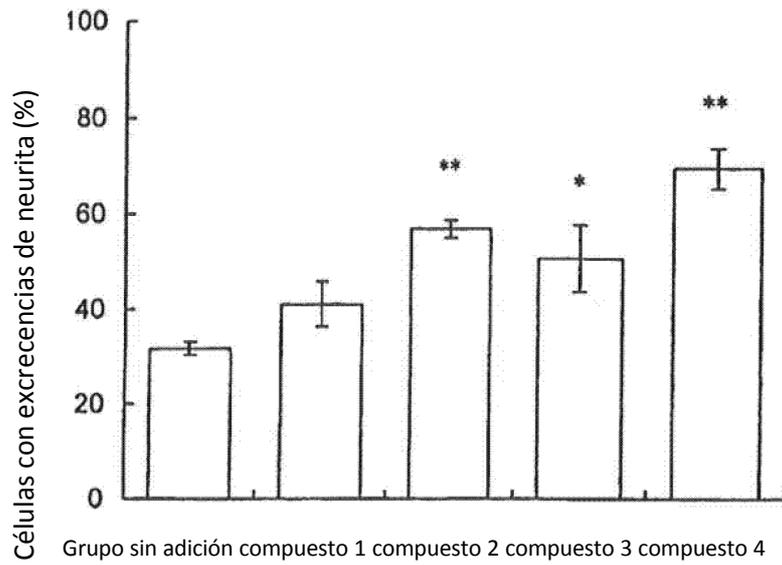


FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5**

