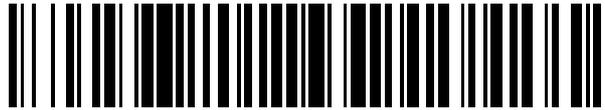


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 953**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61P 25/02** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005 E 05748492 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1752456**

54 Título: **Fármaco para la recuperación de la percepción corneal que contiene un compuesto amida**

30 Prioridad:

**03.06.2004 JP 2004166445**

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

**15.12.2015**

73 Titular/es:

**SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)  
5-8, Hiranomachi 2-chome, Chuo-Ku  
Osaka-shi, Osaka 541-0046, JP y  
MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAKAYAMA, YOSHIKO;  
NAKAMURA, YOSHIKUNI;  
INOUE, JUN y  
AZUMA, MITSUYOSHI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 553 953 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Fármaco para la recuperación de la percepción corneal que contiene un compuesto amida

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un agente para estimular la neuritogénesis corneal, a un agente para reparar la sensibilidad corneal, basada en la estimulación de la neuritogénesis corneal, y a un agente terapéutico para el ojo seco.

**Antecedentes**

10 Dado que los procedimientos quirúrgicos de la córnea tales como queratectomía fotorrefractiva láser (PRK, por sus siglas en inglés), la Queratomileusis *In Situ* Asistida por Láser (LASIK), la queratoplastia y similares seccionan los nervios corneales, se afirma que la reducción funcional de la sensibilidad de la córnea se produce durante un periodo de generalmente 3 semanas a un año. Por ejemplo, se ha notificado que tras un procedimiento LASIK aparentemente se produce la sección del nervio corneal (Tuuli U. Linna et al., *Experimental Eye Research*, 66:755-763, 1998) y que la sensibilidad corneal disminuye en una región de la córnea en la que, después del procedimiento LASIK, no se observa neurograma, o el haz nervioso es demasiado corto para crear conexiones (Tuuli U. Linna et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Sciences*, 41: 393-397, 2000).

15 Está demostrado que la hiposensibilidad de la córnea posterior a PRK y LASIK es responsable de una respuesta menor de la glándula lagrimal y un descenso del líquido lagrimal (Ang, Robert T. et al., *Current Opinion in Ophthalmology*, 12: 318-322, 2001). Como consecuencia de la hipofunción de la sensibilidad corneal, después de la cirugía de la córnea los pacientes parpadean menos veces y muestran los síntomas problemáticos del ojo seco. En el paciente con ojo seco, la hipofunción lagrimal da lugar a una hiposensibilidad corneal que, combinada con una hipofunción lagrimal adicional, agrava de manera importante el estado de la superficie de la córnea.

20 Sin embargo, en la actualidad, la recuperación de la sensibilidad corneal tras una cirugía de la córnea se confía a la recuperación espontánea y, en el tratamiento del ojo seco, no se proporciona ningún tratamiento activo para recuperar la sensibilidad de la córnea. Es más, aun cuando la hiposensibilidad corneal está causada por enfermedades que acompañan a la neurodegeneración corneal tales como queratopatía neuroparalítica, úlcera de la córnea, queratopatía diabética y similares, de momento no se dispone de ningún tratamiento apropiado.

25 La rho-quinasa es una quinasa de serina/treonina que se activa junto con la activación de Rho, que es una proteína G de bajo peso molecular, de la que se sabe que controla diversas funciones fisiológicas tales como la contracción del músculo liso, la retracción de la neurita y similares, por medio de la fosforilación de distintos sustratos. Cabría esperar que un compuesto que tenga una actividad inhibitoria de dicha rho-quinasa proporcione diversos usos farmacéuticos y se ha sugerido su empleo como medicamento terapéutico para, por ejemplo, la hipertensión, la angina de pecho, la contracción cerebro-vascular, el asma, el trastorno circulatorio periférico, la arteriosclerosis, osteoporosis, retinopatía y similares, así como a modo de un medicamento anticanceroso, un medicamento antiinflamatorio, un inmunosupresor y similares (por ejemplo, documento WO 98/06433). Adicionalmente, se sabe que los inhibidores de rho-quinasa son de utilidad para mejorar el trastorno de la función visual puesto que poseen una acción de elongación sobre el axón de las células ganglionares de la retina (documento WO 02/083175). Debido a esta acción, se considera que los inhibidores de rho-quinasa estimulan la regeneración de células del nervio óptico y son útiles para tratar los trastornos de la función visual asociados con diferentes enfermedades oculares causadas por lesiones, defectos, degeneración y acciones similares sobre la retina y el nervio óptico. Sin embargo, esta cita bibliográfica no describe en absoluto los efectos de un inhibidor de rho-quinasa sobre enfermedades de la córnea tales como hiposensibilidad corneal y similares.

30 La sensibilidad de la córnea está controlada por el nervio trigémino (nervio corneal), que es un nervio sensorial distribuido en la córnea. En lo que se refiere a la relación entre Rho y el nervio trigémino, se ha informado de que en un sistema de cultivo de tejido del nervio trigémino de rata (tracto trigémino en cultivos "whole mount" o completos), un activador de Rho (ácido lisofosfatídico) inhibe la elongación del axón nervioso inducida por una neurotrofina (por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), etc.), en un mecanismo facilitado por la introducción del Rho negativo dominante en una célula (Ozdinler, P. Hande et al., *The Journal of Comparative Neurology*, 438: 377-387, 2001). No obstante, en una descripción se informa de que se desconoce si Rho es eficaz para la elongación del axón del nervio trigémino en ausencia de neurotrofina (Ozdinler, P. Hande et al., *The Journal of Comparative Neurology*, 438: 377-387, 2001), y no se ha determinado el efecto de un inhibidor de la rho-quinasa sobre el nervio trigémino.

35 Existen referencias bibliográficas que indican que los compuestos que estimulan la regeneración neuronal o el brote de neuritas son útiles para el tratamiento de las lesiones del nervio corneal después de procedimientos quirúrgicos tales como LASIK y similares y, como ejemplo de estos compuestos, se menciona la Neurotrofina, que es un estimulador del factor neurotrófico y similares (documento WO 03/020281). Sin embargo, el documento WO 03/020281 no hace referencia en absoluto a una rho-quinasa o a un inhibidor de la misma, ni ofrece ninguna descripción que permita sugerirlos.

El documento EP-A-1378247 (emparentado con el documento WO-A-02/083175) describe compuestos de amida para usar en el tratamiento de trastornos de la función visual.

El documento EP-A-1034793 describe compuestos de amida para usar en el tratamiento del glaucoma.

5 Los documentos EP-A-1566184 y US-A-6.277.855 describen compuestos útiles para mejorar la sensibilidad de la córnea y/o en el tratamiento del ojo seco.

### Descripción de la invención

10 La presente invención está dirigida a ofrecer un agente farmacéutico para la recuperación eficaz de la sensibilidad corneal después de un procedimiento quirúrgico de la córnea tal como queratectomía fotorrefractiva láser (PRK), queratomileusis láser (LASIK), LASEK; queratomileusis epitelial láser (Jutta Horwath-Winter et al., *J. Cataract Refract Surg*, 30: 2316-2321, 2004), queratoplastia y similares, y enfermedades neurodegenerativas de la córnea tales como queratopatía diabética y similares, la hipofunción de la sensibilidad corneal asociada con el ojo seco, así como un agente farmacéutico para la recuperación eficaz del ojo seco en pacientes afectos de hiposensibilidad corneal.

15 Con la finalidad de proporcionar un agente farmacéutico novedoso, capaz de mejorar la recuperación de la sensibilidad corneal después de procedimientos de cirugía de la córnea y el ojo seco asociado con la hiposensibilidad corneal, los presentes inventores han estudiado y encontrado que un compuesto de amida, dotado de una estructura particular, actúa sobre el nervio trigémino y estimula eficazmente la neuritogénesis de las células del nervio trigémino. Basándose en este hallazgo, han encontrado, además, que el compuesto de amida es útil como agente farmacéutico para la estimulación de la neuritogénesis corneal, la recuperación de la sensibilidad corneal y el tratamiento del ojo seco, lo cual ha tenido como resultado la presente invención.

20 En consecuencia, la presente invención se refiere a

- (1) hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea;
- 25 (2) el compuesto del punto (1) anterior para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- (3) hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal.
- 30 (4) El compuesto del punto (3) anterior para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 35 (5) Hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en el tratamiento del ojo seco.
- (6) El compuesto del punto (5) anterior para usar en el tratamiento del ojo seco, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 40 (7) Un agente que comprende hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida, para usar en la estimulación de la neuritogénesis corneal.
- (8) El agente del punto (7) anterior para usar en la estimulación de la neuritogénesis corneal, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 45 (9) Un agente que comprende hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar para la recuperación de la sensibilidad de la córnea.
- (10) El agente del punto (9) anterior para usar en la recuperación de la sensibilidad de la córnea, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 50 (11) Un agente que comprende hidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en el tratamiento del ojo seco.
- 55 (12) El agente del punto (9) anterior para usar en el tratamiento del ojo seco, que es el monohidrocloreuro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.

En la presente descripción, el agente de estimulación de la neuritogénesis corneal, el agente para recuperar la sensibilidad de la córnea y el agente para tratar el ojo seco, los cuales comprenden el hidrocloreuro de benzamida al

que se ha hecho alusión anteriormente, se deben considerar de forma colectiva como “el agente farmacéutico de la presente invención”.

### Breve descripción de los dibujos

5 Figura 1 es una imagen de microscopia de fluorescencia de células cultivadas del nervio trigémino de conejo en el Ejemplo Experimental 1, en la que A es una imagen de microscopia de fluorescencia de la célula cultivada en un medio de cultivo libre de compuesto 1, y B es una imagen de microscopia de fluorescencia de la célula cultivada en un medio de cultivo suplementado con compuesto 1.

10 Figura 2 es un gráfico que muestra la proporción de células neuritogénicas del trigémino en el Ejemplo Experimental 1, en el que el eje vertical muestra el porcentaje (%) de células neuritogénicas con respecto al número total de células, en donde cada valor es la media  $\pm$  desviación estándar de 3 casos, y \* es la significación ( $p < 0,001$ ) en relación con el grupo de control.

15 Figura 3 muestra los resultados experimentales de las variaciones en el tiempo de la sensibilidad de la córnea de conejo en el Ejemplo Experimental 2, en donde -○- es un grupo de control, -□- es un grupo de administración de la sustancia de prueba durante una semana, -◆- es un grupo de administración de la sustancia de prueba durante dos semanas, y \* muestra la significación ( $n=7-8$ , media  $\pm$  error estándar, \*:  $p < 0,05$ ) en relación con el grupo de control.

### Descripción detallada de la invención

20 En la presente descripción, la expresión “nervio corneal” se refiere al plexo anular formado en la córnea circundante, el plexo estromático distribuido de forma reticular en el estroma de la córnea, el plexo sub-epitelial formado inmediatamente por debajo de la membrana de Bowman, y el plexo de células basales y las fibras nerviosas, formados inmediatamente después de penetrar en la membrana de Bowman, bajo el control del nervio trigémino, que es una neurona sensorial. El término “neurita” se refiere a una protrusión (dendrita y axón) del cuerpo celular de una neurona (célula nerviosa), y “génesis” se refiere al crecimiento y/o elongación de la neurita anteriormente mencionada desde el cuerpo de la célula. Para los expertos en la técnica resulta evidente qué nivel de neuritogénesis se considera estimulación. El nivel de neuritogénesis se puede confirmar, por ejemplo, por la tinción fluorescente de la célula nerviosa y la observación de la forma de la célula con un microscopio de fluorescencia. Adicionalmente, las imágenes observadas con un microscopio de fluorescencia se pueden analizar usando un software de análisis de imágenes. Además, mediante el uso de un anticuerpo capaz de reconocer una sustancia constitutiva del cuerpo de la célula nerviosa y la neurita, tal como un neurofilamento, y un reactivo que determine el desarrollo de color, la cantidad de neurofilamento se puede establecer midiendo la absorbancia, y este valor se usa como índice de neuritogénesis.

35 El agente farmacéutico de la presente invención recupera la sensibilidad de la córnea que se ha reducido como consecuencia de la lesión, el corte o la pérdida del nervio corneal en mamíferos (por ejemplo, humanos, monos, ratas, ratones, conejos, animales bovinos, cerdos, perros, gatos, etc.) y aves (por ejemplo, pollo, paloma, pavo, etc.), y es útil como medicamento terapéutico capaz de mejorar los síntomas de ojo seco que se asocian con la hiposensibilidad corneal. Por ejemplo, recupera la función de sensibilidad de la córnea que ha disminuido a consecuencia de una cirugía de catarata o de un procedimiento quirúrgico de la córnea tal como PRK, LASIK, LASEK, cirugía de queratoplastia o similares, o de enfermedades neurodegenerativas de la córnea tales como queratopatía neuroparalítica, úlcera corneal, queratopatía diabética y similares, siendo útil como medicamento terapéutico contra el ojo seco asociado con la hiposensibilidad de la córnea. Además, el agente es útil como medicamento terapéutico para la recuperación, en el paciente con ojo seco, de los trastornos del ojo seco y la hiposensibilidad corneal asociada con el ojo seco.

40 El agente farmacéutico de la presente invención se administra de manera sistémica o tópica. En el caso de administración sistémica, se administra por vía oral o, en el caso de administración parenteral, se administra como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular y similares. Cuando se usa la vía tópica, se administra en el ojo.

45 Como formas de dosificación del agente farmacéutico de la presente invención pueden mencionarse agentes sólidos tales como polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, supositorios y similares; líquidos tales como jarabes, inyecciones, soluciones oftálmicas y similares. Para la producción de gránulos y comprimidos, se puede fabricar cualquier forma de dosificación usando, por ejemplo, excipientes (lactosa, sacarosa, glucosa, almidón, celulosa microcristalina, y similares), lubricantes (estearato de magnesio, talco, ácido esteárico, estearato de calcio y similares), desintegrantes (almidón, carmelosa sódica, carbonato de calcio y similares), aglutinantes (solución de pasta de almidón, solución de hidroxipropilcelulosa, solución de carmelosa, solución de goma arábica, solución de gelatina, solución de alginato sódico y similares), etc. Para los gránulos y comprimidos, se puede formar una película de recubrimiento usando agentes de recubrimiento adecuados (gelatina, sacarosa, goma arábica, cera carnauba y similares), recubrimientos entéricos (por ejemplo, acetato ftalato de celulosa, copolímero de ácido metacrílico, ftalato de hidroxipropilo, carboximetil etilo y similares), etc.

55 Para la producción en forma de cápsula, se mezcla o granula de manera uniforme una mezcla de excipientes apropiados tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, anhídrido de ácido silícico ligero y similares

para mejorar la fluidez y deslizabilidad, celulosa microcristalina, lactosa y similares para la fluidez bajo presión, agregando cantidades adecuadas del desintegrante mencionado anteriormente y similares, o se forman gránulos recubiertos con un agente de recubrimiento apropiado para producir una película y se envasa en una cápsula, o se moldea por encapsulación con una base de cápsula dotada de una mayor plasticidad y que contiene una base de cápsula adecuada (gelatina y similares), glicerina, manitol o sorbitol y similares. Estas cápsulas pueden contener agentes colorantes, conservantes (dióxido de azufre, parabenos [paraoxibenzoato metílico, paraoxibenzoato etílico o paraoxibenzoato propílico]) y similares en cantidades necesarias. La cápsula puede ser del tipo convencional, una cápsula con recubrimiento entérico, una cápsula con recubrimiento gástrico o una cápsula de liberación controlada. En la fabricación de una cápsula entérica, en una cápsula convencional se envasan un compuesto provisto de un recubrimiento entérico, o una mezcla del compuesto y los excipientes adecuados citados anteriormente, o la propia cápsula puede estar recubierta con un agente de recubrimiento entérico, o se puede utilizar un polímero entérico para moldear una base.

Para la fabricación en forma de supositorio, se puede seleccionar y utilizar una base adecuada para supositorios (por ejemplo, manteca de cacao, macrogol y similares).

Para la producción en forma de jarabe, se pueden seleccionar y usar, por ejemplo, estabilizantes (edetato sódico y similares), agentes de suspensión (goma arábiga, carmelosa y similares), agentes correctores (jarabe simple, glucosa y similares), agentes aromáticos y similares que resulten apropiados.

Para la producción del agente farmacéutico de la presente invención en forma de inyección o solución oftálmica, el producto se puede disolver o dispersar en una solución que, de manera apropiada, contiene aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de isotonicidad (cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerina, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, glucosa, propilenglicol y similares), sustancias tampón (tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, tampón glutamato, tampón  $\epsilon$ -aminocaproato y similares), conservantes (p-oxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, dehidroacetato sódico, edetato sódico, ácido bórico, bórax y similares), agentes de suspensión (carboximetilcelulosa sódica, Polisorbato 80, alginato sódico), espesantes (hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol y similares), estabilizantes (bisulfito sódico, tiosulfato sódico, edetato sódico, citrato sódico, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno y similares), agentes para ajustar el pH (ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico, ácido acético y similares), etc.

Aunque la cantidad de aditivos que se debe utilizar para el jarabe, la inyección y la solución oftálmica anteriormente citados varía en función del tipo de aditivo empleado, el uso y otros similares, éstos se pueden agregar en una concentración capaz de lograr el objetivo del aditivo; un agente de isotonicidad se agrega, por lo general, en una concentración de 0,5 a 5,0% p/v para obtener una presión osmótica de 229 a 343 mOsm. Adicionalmente, se agregan 0,01 a 2,0% p/v de una sustancia tampón, 0,01 a 1,0% p/v de un espesante, y 0,001 a 1,0% p/v de un estabilizante. De manera adecuada, se agrega un agente para ajustar el pH para alcanzar un pH de 3 a 9, preferiblemente 4 a 8.

Para el uso particular como solución oftálmica, por lo general se ajusta el límite inferior de la concentración del compuesto de amida representado por la fórmula (I) a 0,00001% p/v, preferiblemente a 0,00005% p/v o, más preferiblemente, a 0,0001% p/v, y el límite superior se ajusta a 1% p/v, preferiblemente a 0,1% p/v, más preferiblemente a 0,05% p/v y, todavía más preferiblemente, a 0,02% p/v.

El agente farmacéutico de la presente invención tiene una acción inhibitoria de la rho-quinasa y se considera que, especialmente a causa de este efecto, estimula la neuritogénesis corneal. En la elongación de neuritas por NGF (factor de crecimiento nervioso), la inhibición de la rho-quinasa determina la despolimerización de la F-actina y se inicia la neuritogénesis. A continuación, la F-actina experimenta una repolimerización en las neuritas por medio de Rac1 activada y se produce una elongación adicional de la neurita (Negishi M, y Katoh H., *J. Biochem.*, 132, 157-166, 2002). Teniendo en consideración un mecanismo de neuritogénesis de este tipo, cuando la acción inhibitoria de rho-quinasa se prolonga durante mucho tiempo, la neuritogénesis puede sufrir una deceleración o inhibición para resistir la repolimerización de la F-actina.

Aun cuando la dosis y el periodo de administración del agente farmacéutico de la presente invención varían en función de la enfermedad a tratar, el síntoma, el sujeto tratado, el método de administración y otros factores, teniendo en consideración la acción y el mecanismo anteriormente citados del agente farmacéutico de la presente invención, la administración se lleva a cabo, preferiblemente, durante un breve periodo de tiempo no superior a 3 días, no superior a 5 días, no superior a 1 semana, no superior a 2 semanas y similares. Por ejemplo, para la administración tópica a corto plazo, como agente para la recuperación de la sensibilidad corneal del ojo de un adulto tras una cirugía PRK, preferiblemente se instila una solución oftálmica que contiene 0,01% p/v del compuesto de hidrocloreuro de benzamida varias veces al día durante un plazo de hasta 2 semanas a dosis de 20 a 50  $\mu$ L por instilación. Además, por ejemplo, para la administración oral a corto plazo como agente para recuperar la sensibilidad corneal de un adulto tras una cirugía LASIK, se administra preferiblemente un comprimido que contiene 10 mg del compuesto de hidrocloreuro de benzamida una o dos veces al día.

Sin embargo, el agente farmacéutico de la presente invención se puede utilizar no sólo para una administración a corto plazo, sino también para la administración prolongada ajustando la dosis y la frecuencia diaria de administración. Además, también es posible efectuar una administración intermitente, a intervalos de días o similares, estando disponibles diversos planes terapéuticos que se consideran apropiados para la situación.

- 5 Por ejemplo, para una administración a largo plazo como agente de recuperación de la sensibilidad corneal en un adulto tras una cirugía LASIK, se administra preferiblemente una solución oftálmica que contiene 0,01% p/v del compuesto de hidrocloreto de benzamida 2 a 8 veces al día, a dosis de 20 a 50 µL por administración, durante la primera semana y, a continuación, se administra una solución oftálmica que contiene 0,003% p/v o 0,001% p/v de dicho producto, 2 a 4 veces al día durante 3 a 6 semanas. Como ejemplo de método de tratamiento intermitente para la administración como agente de recuperación de la sensibilidad corneal a un adulto tras cirugía LASIK, se instila 10 varias veces al día una solución oftálmica que contiene 0,01% p/v del compuesto de hidrocloreto de benzamida, a dosis de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 µL por administración, de manera consecutiva durante la primera semana y, seguidamente, se interrumpe la instilación durante 1 ó 2 semanas. Después de la interrupción, la administración se reanuda bajo las mismas condiciones y se prosigue durante una semana y, a continuación, se 15 interrumpe nuevamente la instilación. Este tipo de administración intermitente se repite preferiblemente hasta que la sensibilidad corneal recupera su nivel normal.

El compuesto de hidrocloreto de benzamida según la invención se puede utilizar en un método de estimulación de la neuritogénesis de la córnea, un método para recuperar la sensibilidad corneal y en un método para tratar el ojo seco.

- 20 La presente invención incluye, asimismo, una composición que contiene el compuesto de hidrocloreto de benzamida para la neuritogénesis de la córnea, la recuperación de la sensibilidad corneal o el tratamiento del ojo seco.

### Ejemplos

- La presente invención se explica de forma más detallada haciendo referencia a los Ejemplos siguientes, que no se deben considerar limitantes. En los siguientes Ejemplos, compuesto 1 significa hidrocloreto de (R)-(+)-N-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida (1). El compuesto 1 se puede preparar según el método descrito 25 en el Ejemplo 9 del documento WO 95/28387.

#### Ejemplo Experimental 1

Efecto estimulante de la neuritogénesis sobre células nerviosas cultivadas del trigémino de conejo

##### 1) Animales utilizados

Conejos blancos japoneses (2 a 3 días de edad), adquiridos en KITAYAMA LABES Co., Ltda.

##### 30 2) Sustancia de prueba

Compuesto 1

##### 3) Método de ensayo

(Cultivo celular)

- 35 De acuerdo con el informe de Chan et al. (Chan, Kuan Y. Y Haschke, Richard H., *Exp. Eye Res.*, 41; 687-699, 1985), se aislaron las células nerviosas del trigémino. Específicamente, bajo anestesia con éter y tras la perfusión cardiaca con solución salina, se extrajeron los ganglios del trigémino y se dispersaron usando una solución de dispersión de nervios (SUMITOMO BAKELITE Co., Ltda.) para obtener una suspensión celular. Para el cultivo celular, se usó medio Neurobasal (Invitrogen Corp.) suplementado con Suplemento B27 (Invitrogen Corp., concentración final 1 mM) y las condiciones de cultivo fueron 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Las células se sembraron con una 40 densidad de aproximadamente 3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo en un cubreobjetos (SUMITOMO BAKELITE) con un recubrimiento de polilisina/laminina, que se sumergió en una placa de 24 pocillos. Como sustancia de prueba, se agregó compuesto 1 (concentración final 1 µM); en el grupo de control no se produjo esta adición

(Inmunotinción)

- 45 Después de 48 h de cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 2 h y el cuerpo de la célula nerviosa y las neuritas se tiñeron con fluorescencia usando un anticuerpo anti-neurofilamento 200 (Sigma) que reconoce específicamente los neurofilamentos, que son filamentos intermedios específicos para una célula nerviosa, y un anticuerpo secundario fluorescente capaz de reaccionar con el anterior.

(Análisis de imagen)

- 50 Las células teñidas se importaron como imágenes desde un microscopio de fluorescencia a un ordenador y, utilizando un software de análisis de imágenes (Image-Pro Plus, versión 4.0, Planetron, Inc.), se midieron el diámetro del cuerpo celular y la longitud de las neuritas en las imágenes importadas de las células. Se midieron las células de

3 pocillos para cada uno de los grupos de adición del compuesto 1 y para el grupo de control. Las células con una neurita cuya longitud fue mayor que el doble del diámetro del cuerpo celular se consideraron células neuritogénicas, y se calculó el porcentaje (%) de células neuritogénicas con respecto al número total de células medidas.

#### 4) Resultados del ensayo

5 Figura 1 muestra imágenes de microscopia de fluorescencia de células nerviosas cultivadas del trigémino de conejo, en donde A muestra las células del grupo de control sin adición, y B muestra las células del grupo al que se agregó compuesto 1. En el grupo sin adición, no muchas células mostraban una neurita elongada, en tanto que en el grupo de adición del compuesto 1, se observaron numerosas células con una neurita elongada. Figura 2 es un gráfico que muestra la proporción del número de células neuritogénicas en el número total de células medidas. La proporción del grupo de control y del grupo de adición del compuesto 1 fue de 24% y 54,6%, respectivamente, y el grupo de adición del compuesto 1 exhibió un porcentaje significativamente elevado de células neuritogénicas con respecto al grupo de control (\*:  $p < 0,001$ ; prueba t,  $N=3$ , media  $\pm$  desviación estándar).

Sobre la base de los resultados anteriores, se ha encontrado que el compuesto 1 estimula la neuritogénesis de células nerviosas cultivadas del trigémino de conejo.

#### 15 Ejemplo Experimental 2

Mejoría del efecto sobre la hiposensibilidad corneal del conejo con el uso de un microqueratomo

##### 1) Animales utilizados

20 Se emplearon conejos blancos japoneses (peso corporal 2,5 a 3,0 kg), adquiridos en Japan SLC. Desde su llegada hasta el final del ensayo, los animales se alojaron en jaulas separadas en una sala con una temperatura ambiente fijada en  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , humedad de  $55 \pm 10\%$ , con ciclos de luz de 12 h (encendido de la luz a las 8 a.m. y apagado a las 8 p.m.). Los animales recibieron una cantidad limitada de un pienso sólido (Labo R-stock, Nosan Corporation, 100 g por día), permitiendo el acceso libre al agua potable.

##### 2) Sustancia de prueba

25 Como sustancia de prueba se usó compuesto 1. El compuesto 1 se disolvió al 0,01% en la solución de base siguiente y se administró por instilación. En el grupo de control, se administró la solución de base por instilación.

Formulación de la solución de base:

Dihidrógeno fosfato sódico dihidrato	0,1 g
Cloruro sódico	0,9 g
Hidróxido sódico cantidad adecuada	(pH 7)
30 Agua purificada cantidad total	100 mL

##### 3) Método de ensayo

(Selección de animales y medición del valor inicial de sensibilidad corneal)

35 Antes de iniciar el experimento, se analizó visualmente el segmento anterior del ojo del animal y se registró la presencia de marcas teñidas con fluoresceína en la córnea; se seleccionaron los conejos que no mostraron anomalías. El valor inicial de la sensibilidad corneal se midió usando un dispositivo de medición de la sensibilidad corneal Cochet-Bonnet (fabricado por LUNEAU).

(Preparación del colgajo de córnea)

40 Los animales recibieron una inyección intramuscular (0,9 mL/kg) de una mezcla de Celactal (xilacina al 25):Ketalar (ketamina al 5%) = 0,5:1 para inducir anestesia sistémica y se expuso el globo ocular de manera suficiente. Mediante un microqueratomo (MK2000, Nidek) unido a un adaptador para el ojo del conejo en el interior de un anillo de succión, se preparó un colgajo de córnea (diámetro 8,5 mm) con una hoja de 130  $\mu\text{m}$  de grosor (Arbelaez, M.C. et al., *J. Refract. Surg.*, 2002, May-Jun 18 (Supl. 3): págs. 357-60). Bajo control microscópico, se repuso el colgajo de córnea en su posición original y el animal se despertó de la anestesia, manteniéndolo bajo observación para evitar el desplazamiento del colgajo.

##### 45 (Agrupación de animales)

Al día siguiente de la preparación del colgajo de córnea, se revisó el estado de los animales y se seleccionaron aquéllos cuyo colgajo de córnea estuvo situado correctamente. Estos animales se agruparon por medio de un diseño aleatorio de bloques, con la aplicación de múltiples variables, empleando el programa preclínico SAS (Versión 5.0,

SAS Institute, Japón) de tal forma que se uniformó el valor inicial de la sensibilidad corneal antes de la preparación del colgajo de córnea.

(Administración)

5 La solución de la sustancia de prueba y la solución de base de control se administraron por instilación durante 1 ó 2 semanas a partir del día siguiente a la preparación del colgajo de córnea. La administración por instilación en el ojo intervenido se realizó 4 veces al día (50 µL cada vez) a intervalos de 2 h, utilizando una micropipeta. Simultáneamente con la instilación 4 veces al día de la sustancia de prueba durante una semana después de la operación, se administró una solución oftálmica de bromfenac sódico al 0,1% (solución oftálmica Bronuck, Senju Pharmaceutical Co., Ltda.) como agente antiinflamatorio, con las primera y tercera instilaciones, y una solución oftálmica al 0,3% de hidroclicloruro de lomefloxacina (solución oftálmica Lomeflon, Senju Pharmaceutical Co., Ltda.) como agente antibacteriano, con las segunda y cuarta instilaciones.

(Medición de la sensibilidad corneal)

15 La sensibilidad corneal se midió con un dispositivo de medición de la sensibilidad corneal Cochet-Bonnet una vez a la semana desde una hasta ocho semanas después de la intervención. Se llevó a cabo una medición en condiciones ciegas para que el responsable del procedimiento no supiera el grupo de administración al que pertenecía el conejo estudiado.

(Análisis estadístico)

20 Para el análisis estadístico se usó una prueba paramétrica de múltiples comparaciones de Dunnett (unilateral) (programa preclínico SAS; Versión 5.0, SAS Institute, Japón), evaluándose como significativo un riesgo menor que 5%.

Resultados experimentales

25 Figura 3 muestra las variaciones en el tiempo de la sensibilidad corneal. La sensibilidad corneal se expresa por medio de la longitud máxima de un filamento de nailon (diámetro 0,12 mm) del dispositivo de medición de la sensibilidad corneal de Cochet-Bonnet capaz de inducir un reflejo de parpadeo desencadenado por el contacto de la punta del filamento con el centro de la córnea; la longitud se muestra en el eje vertical de la Figura 3. Una semana después de la cirugía, se observó una rápida reducción de la sensibilidad corneal tanto en el grupo al que se administró la base (grupo de control) como en el grupo con administración de la solución de la sustancia de prueba.

30 A partir de ese momento, el grupo de control exhibió una recuperación gradual de la sensibilidad corneal, y el grupo al que se administró la sustancia de prueba mostró una mejor recuperación de la sensibilidad corneal que el grupo de control. Durante las 2 a 8 semanas siguientes a la cirugía, los resultados fueron correctos en el grupo de 1 semana de administración, el grupo de 2 semanas de administración y el grupo de control, en este orden. Como consecuencia del análisis estadístico, la sensibilidad corneal del grupo de 1 semana de administración, 5 semanas después de la cirugía, fue significativamente mayor en comparación con la del grupo de control.

35 En la queratomileusis láser (LASIK), un colgajo de córnea cortado mediante el uso de un microqueratomo se pliega para exponer el estroma corneal, el estroma corneal se corta por irradiación de láser excimer para corregir la refracción, y el colgajo de la córnea se repone en su posición original. Este ensayo examina el efecto del compuesto 1 sobre la estimulación de la recuperación de la sensibilidad corneal, empleando un modelo de hiposensibilidad corneal de conejo preparado con el microqueratomo mencionado. Los resultados de este experimento indican que el compuesto 1 tiene el efecto de estimular la recuperación de la hiposensibilidad corneal causada por la sección del nervio de la córnea. Asimismo, se ha sugerido la posibilidad de que, cuando se utiliza la misma dosis, se puede obtener un resultado más eficaz con un tiempo de administración abreviado.

Ejemplo de preparación 1 – comprimido

Compuesto 1	10 mg
Lactosa	80 mg
45 Almidón	17 mg
Estearato de magnesio	3 mg
Celulosa microcristalina	10 mg

50 Con el empleo de los ingredientes citados como materiales para un comprimido, éste se forma según un método convencional. Si es necesario, los comprimidos pueden estar recubiertos con un recubrimiento entérico convencional (por ejemplo, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa y similares), o con un recubrimiento de azúcar o una película (por ejemplo, etilcelulosa). Modificando la proporción de mezcla de los aditivos se pueden preparar comprimidos que

## ES 2 553 953 T3

contienen el compuesto 1 en cantidades de 20 mg, 5 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,1 mg/comprimido (cantidad de ingrediente).

### Ejemplo de preparación 2 – cápsula

	Compuesto 1	50 mg
5	Manitol	75 mg
	Almidón	17 mg
	Estearato de calcio	3 mg

10 Cuando se utilizan los ingredientes anteriores como materiales para una cápsula, se les mezcla uniformemente, se les granula según un método convencional y se envasan en una cápsula dura. Antes de envasarlos, si es necesario, los gránulos se pueden recubrir con un recubrimiento entérico convencional (por ejemplo, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa), un recubrimiento de azúcar o una película (por ejemplo, etilcelulosa). Modificando la proporción de mezcla de los aditivos, se pueden preparar cápsulas que contienen el compuesto 1 en cantidades de 20 mg, 5 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,1 mg/cápsula.

### Ejemplo de preparación 3 – inyección

15	Compuesto 1	750 mg
	Carboximetilcelulosa sódica	500 mg
	Agua para inyección	cantidad total 100 mL

20 Los ingredientes citados anteriormente se mezclan de forma aséptica, según un método convencional, para obtener una solución inyectable. Modificando la proporción de mezcla de los aditivos, se pueden preparar inyecciones que contienen el compuesto 1 en cantidades de 1.000 mg, 500 mg, 200 mg, 100 mg/100 mL.

### Ejemplo de preparación 4 – solución oftálmica

	Compuesto 1	0,005 g
	Ácido bórico	0,7 g
	Bórax	cantidad adecuada (pH 7)
25	Cloruro sódico	0,5 g
	Hidroximetilcelulosa	0,5 g
	Edetato sódico	0,05 mg
	Cloruro de benzalconio	0,005 g
	Agua esterilizada purificada	cantidad total 100 mL

30 Se calienta agua esterilizada purificada (80 mL) a aproximadamente 80°C, se agrega hidroximetilcelulosa y la mezcla se agita hasta que la temperatura del líquido alcanza temperatura ambiente. A esta solución se agregan compuesto 1, cloruro sódico, edetato sódico y cloruro de benzalconio para su disolución. Se agrega una cantidad apropiada de bórax para ajustar el pH a 7. Se agrega agua esterilizada purificada hasta completar 100 mL.  
35 Modificando la proporción de mezcla de los aditivos, se pueden preparar soluciones oftálmicas que contienen el compuesto 1 en cantidades de 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.

### Ejemplo de preparación 5 – solución oftálmica

	Compuesto 1	10 mg
	D-manitol	4,5 g
	Dihidrógeno fosfato sódico	0,1 g
40	Hidróxido sódico	cantidad adecuada (pH 7)
	Agua esterilizada purificada	cantidad total 100 mL

Al agua esterilizada purificada se agregan compuesto 1, D-manitol y dihidrógeno fosfato sódico (80 mL) para lograr su disolución. Se agrega una cantidad apropiada de hidróxido sódico para ajustar el pH a 7. Se agrega agua

esterilizada purificada hasta completar 100 mL. La solución oftálmica preparada se filtra de manera aséptica con un filtro de membrana, se envasa en un recipiente desechable (dosis unitaria) y se sella. Modificando la proporción de mezcla de los aditivos, se pueden preparar soluciones oftálmicas que contienen el compuesto 1 en cantidades de 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.

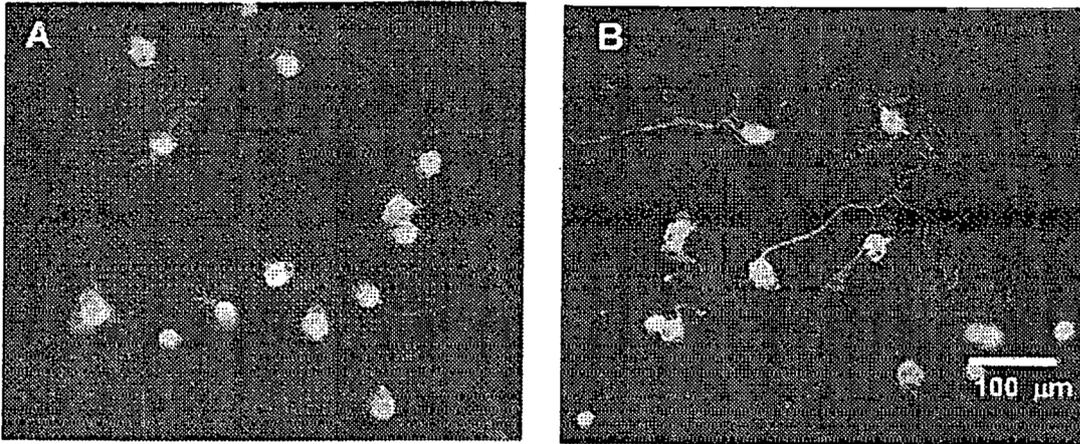
5 Aplicabilidad industrial

10 Dado que el agente farmacéutico de la presente invención tiene un efecto estimulante sobre la neuritogénesis corneal, resulta útil para mejorar la hipofunción de la sensibilidad corneal causada por una lesión del nervio corneal y similar, así como mejorar el ojo seco que se asocia con la hipofunción de la sensibilidad corneal. De forma específica, cabe esperar un efecto de mejoría sobre la hiposensibilidad corneal tras la cirugía de catarata y después de los procedimientos quirúrgicos PRK, LASIK, LASEK o queratoplastia, sobre la hiposensibilidad corneal asociada con la neurodegeneración de la córnea tales como queratopatía neuroparalítica, la úlcera corneal, la queratopatía diabética y similares, así como del ojo seco.

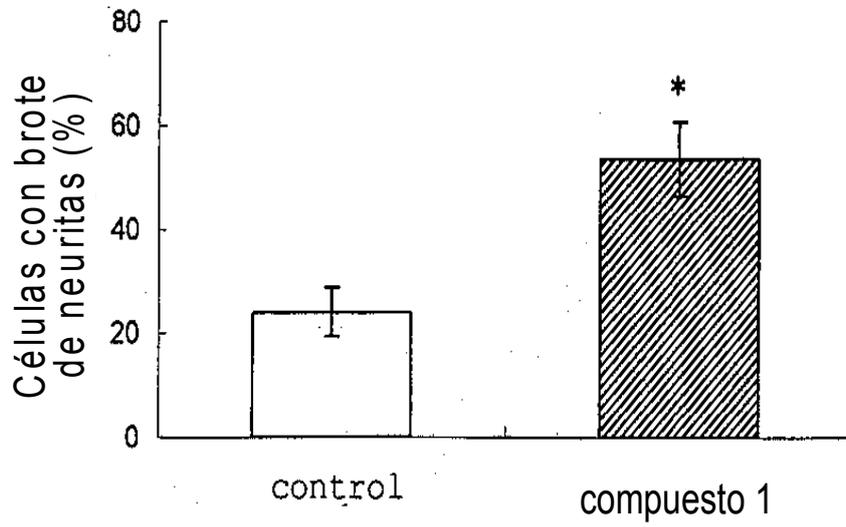
**REIVINDICACIONES**

1. Hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea.
- 5 2. El compuesto según la reivindicación 1 para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
3. Hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal.
4. El compuesto según la reivindicación 3 para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 10 5. Hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida para usar en el tratamiento del ojo seco.
6. El compuesto según la reivindicación 5 para usar en el tratamiento del ojo seco, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
- 15 7. Un agente que comprende hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida, para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea.
8. El agente según la reivindicación 7 para usar en la estimulación de la neuritogénesis de la córnea, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
9. Un agente que comprende hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida, para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal.
- 20 10. El agente según la reivindicación 9 para usar en la recuperación de la sensibilidad corneal, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.
11. Un agente que comprende hidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida, para usar en el tratamiento del ojo seco.
- 25 12. El agente según la reivindicación 11 para usar en el tratamiento del ojo seco, que es el monohidrocloruro de (R)-(+)-N-(1H-pirroló[2,3-b]piridin-4-il)-4-(1-aminoetil)benzamida.

**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

