

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 980**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C12N 5/079 (2010.01)

C07D 213/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2008 PCT/JP2008/065459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2009 WO09028631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2008 E 08828145 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2193806**

54 Título: **Agente para promover la adherencia de células endoteliales de la córnea**

30 Prioridad:

29.08.2007 JP 2007223141

28.01.2008 JP 2008016088

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

20.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KINOSHITA, SHIGERU;
KOIZUMI, NORIKO y
UENO, MORIO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 659 980 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agente para promover la adherencia de células endoteliales de la córnea

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente para promover la adherencia de células endoteliales de la córnea, que se usa para adherencia, mantenimiento o conservación de células endoteliales de la córnea.

10 **Técnica anterior**

La información visual es reconocida cuando la luz que entró de la córnea (tejido transparente en la parte delantera del globo ocular) llega a la retina para excitar las células nerviosas retinianas, y las señales eléctricas desarrolladas se transmiten a la corteza visual cerebral mediante el nervio óptico. Para tener buena vista, la córnea necesita ser transparente. La transparencia de la córnea se mantiene cuando el contenido de agua se mantiene a un nivel constante por la función de bombeo y la función de barrera de las células endoteliales de la córnea.

La densidad de las células endoteliales de la córnea del ser humano es aproximadamente 3000 células por 1 mm² al nacer. Una vez dañadas, las células pierden la capacidad de regenerarse. En la distrofia corneal endotelial y la queratopatía bullosa resultante del trastorno funcional del endotelio corneal debido a diversas causas, la córnea padece edema y opacidad, y la vista disminuye notablemente. Actualmente, la queratopatía bullosa se trata por queratoplastia penetrante en la que se trasplanta la estructura de tres capas completa del epitelio, parénquima y endotelio de la córnea. Sin embargo, la donación de córnea es insuficiente en Japón y, aunque hay aproximadamente 5500 pacientes en la lista de espera de trasplante de córnea, anualmente se realizan aproximadamente 2700 trasplantes de córnea en Japón.

En los últimos años, ha atraído la atención la idea de "trasplante de partes" para trasplantar solo el tejido dañado con el fin de disminuir el riesgo de reacción de rechazo y complicaciones posoperatorias, proporcionando así mejor función visual. De los trasplantes de córnea, se han realizado el trasplante epitelial para trasplantar solo el epitelio corneal, trasplante epitelial de mucosa oral cultivada para trasplantar mucosa oral en lugar de epitelio corneal, queratoplastia lamelar de la lámina profunda para trasplantar tejido del parénquima y similares. También se considera un método de trasplantar solo el endotelio corneal. Para el trasplante de endotelio corneal, se conoce una hoja de tipo endotelio corneal que consiste en una capa de endotelio corneal cultivada en una capa de colágeno (véanse los Documentos de patente 1 y 2). Sin embargo, en cuanto a las células endoteliales de la córnea, particularmente aquellas derivadas de ser humano, como el número de donantes de córnea está limitado y el cultivo *in vitro* es difícil, la producción de células cultivadas en el número necesario para trasplante requiere tiempo y esfuerzo.

La célula madre embrionaria (ES) humana muestra alta autorreplicabilidad y multipotencia, y llama la atención desde el aspecto de la aplicación en medicina. Sin embargo, tiene un problema práctico de número de células drásticamente reducido, ya que una operación para dispersar las células en una etapa de cultivo fácilmente produce la muerte celular. Recientemente, se ha encontrado que la muerte celular que se produce durante el cultivo de células ES humanas se produce por la activación de Rho cinasa (ROCK), y la inhibición de ROCK suprime notablemente la muerte celular, y se informó que, usando un inhibidor de ROCK tal como Y-27632 y similares, puede habilitarse el cultivo en masa de célula ES humana y la producción de células cerebrales (Documento no de patente 1).

Los inhibidores de Rho cinasa (ROCK) son conocidos por tener diversas acciones. Por ejemplo, el Documento de patente 3 desvela que los inhibidores de Rho cinasa promueven la formación de neuritas corneales, y que los inhibidores de Rho cinasa se usan como agente para recuperar la percepción corneal. Además, el Documento de patente 4 desvela que los inhibidores de Rho cinasa tienen una acción promotora del crecimiento de axones sobre las células del ganglio retiniano, y se usan para el tratamiento de disfunción de la visión.

Documento de patente 1: JP-A-2004-24852
Documento de patente 2: JP-A-2005-229869
Documento de patente 3: WO2005/118582
Documento de patente 4: WO2002/083175
Documento no de patente 1: Nat Biotechnol. 2007, 25, 681

60 **Divulgación de la invención****Problemas a resolver por la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar un medio capaz para adherir eficientemente una célula endotelial de la córnea y un medio para suministrar establemente una preparación endotelial de la córnea. Medios de resolución de los problemas

Los presentes inventores han realizado amplios estudios en vista de los problemas anteriormente mencionados y encontraron que la adherencia de células endoteliales de la córnea a un sustrato de cultivo puede ser sorprendentemente promovida cultivando la célula en presencia de un inhibidor de Rho cinasa, que produjo la finalización de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un inhibidor de Rho cinasa para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de disfunción endotelial de la córnea.

[2] El inhibidor de Rho cinasa de [1] anteriormente mencionado, que es al menos uno seleccionado de (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina y una sal farmacológicamente aceptable de los mismos.

[3] El inhibidor de Rho cinasa de [1] anteriormente mencionado, en el que la disfunción endotelial de la córnea es queratopatía bullosa o endotelitis de la córnea.

[4] El inhibidor de Rho cinasa de cualquiera de [1] a [3] anteriormente mencionado, que está en forma de una inyección intracameral o líquido de perfusión intraocular.

[5] Uso de un medio de cultivo que comprende un inhibidor de Rho cinasa para producir una preparación endotelial de la córnea, en el que el inhibidor de Rho cinasa se usa para promover la adherencia entre células endoteliales de la córnea o entre células endoteliales de la córnea y un sustrato de cultivo.

[6] El uso de [5] anteriormente mencionado, en el que el medio de cultivo comprende al menos un inhibidor de Rho cinasa seleccionado de (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina y una sal farmacológicamente aceptable de los mismos.

[7] El uso de [5] anteriormente mencionado, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.

[8] Un método de producción de una preparación endotelial de la córnea, que comprende una etapa de cultivar una célula endotelial de la córnea usando el medio de cultivo de [5] o [6] anteriormente mencionado.

[9] El método de [8] anteriormente mencionado, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.

[10] Una preparación endotelial de la córnea producida por el método de [8] anteriormente mencionado, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de disfunción endotelial de la córnea.

[11] Uso *in vitro* de un inhibidor de Rho cinasa para promover la adherencia entre células endoteliales de la córnea o entre células endoteliales de la córnea y un sustrato de cultivo.

[12] Un método de promoción de la adherencia de una preparación endotelial de la córnea que comprende una etapa de cultivar una célula endotelial de la córnea usando un medio de cultivo como se define en [5] o [6] anteriormente mencionado.

[13] El método de [12] anteriormente mencionado, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.

Efecto de la invención

El agente para promover la adherencia de una célula endotelial de la córnea de la presente invención contiene un inhibidor de Rho cinasa como principio activo. El agente para promover la adherencia de una célula endotelial de la córnea de la presente invención promueve la adherencia de la célula endotelial de la córnea y permite la formación de una capa de células endoteliales de la córnea que tiene buena morfología celular y alta densidad celular. Por tanto, es útil como agente terapéutico o agente profiláctico para una enfermedad acompañada de la disfunción endotelial de la córnea, tal como queratopatía bullosa y endotelitis de la córnea. El agente para promover la adherencia de una célula endotelial de la córnea de la presente invención es útil como agente para proteger el endotelio corneal en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad acompañada de una disfunción endotelial de la córnea. Además, el agente para promover la adherencia de una célula endotelial de la córnea de la presente invención puede utilizarse como agente para proteger el endotelio corneal en el tratamiento o la profilaxis de disfunción endotelial de la córnea asociada a una cirugía intraocular tal como cirugía de cataratas, cirugía vítrea y similares, disfunción endotelial de la córnea producida por elevada presión intraocular (particularmente ataque glaucomatoso), o disfunción endotelial de la córnea producida por oxígeno insuficiente debido a lentes de contacto. Como el medio de cultivo o solución de conservación corneal de la presente invención contiene un inhibidor de Rho cinasa, las células endoteliales de la córnea pueden cultivarse, mantenerse o conservarse bien, y se permite el suministro estable, mantenimiento o conservación de una preparación endotelial de la córnea.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una fotomicrografía de contraste de fases del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de conejo (después de 24 h desde el inicio del cultivo, aumento: 100 veces).

La Fig. 2 es un gráfico que muestra el crecimiento del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de conejo como se examina por ensayo de MTS, en el que el eje vertical muestra el valor con respecto a la absorbancia del grupo de inhibidores de Rock (-) en el día 1.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la adhesión del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de conejo después de 24 h desde el inicio del cultivo, en el que el eje vertical muestra el valor con respecto a la absorbancia del grupo de inhibidores de Rock (-) después de 24 h desde el inicio del cultivo.

La Fig. 4 es una fotomicrografía de contraste de fases del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de mono en el día 3 desde el inicio del cultivo, en el que el aumento es 100 veces.

La Fig. 5 es una fotomicrografía de contraste de fases del cultivo primario de células endoteliales de la córnea

humanas (día 7, aumento: 100 veces).

La Fig. 6 muestra una fotografía del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de mono (A: inhibidor de ROCK (-), B: inhibidor de ROCK (+), aumento: 20 veces) y el gráfico (C) que muestra el área total de células cultivadas.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el número de células viables del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de mono.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra una influencia de Y-27632 sobre el cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de mono.

La Fig. 9 es una fotomicrografía de contraste de fases que muestra una influencia de Y-27632 sobre la morfología celular durante el cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de mono (aumento: 100 veces).

La Fig. 10 es una fotomicrografía que muestra una influencia de Y-27632 sobre la morfología celular durante el cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de mono (tinción de fluorescencia con faloidina, aumento: 200 veces).

La Fig. 11 es una fotomicrografía que muestra una influencia de Y-27632 sobre el ciclo celular de células endoteliales de la córnea de mono (tinción con anticuerpo anti-Ki67, aumento: 200 veces).

La Fig. 12 muestra los resultados de citometría de flujo que examina una influencia de Y-27632 sobre el ciclo celular de células endoteliales de la córnea de mono. La Fig. 12A muestra el día 1 de cultivo de pases del grupo de inhibidores de ROCK (-), B muestra el día 2 del cultivo de pases del grupo de inhibidores de ROCK (-), C muestra el día 1 del cultivo de pases del grupo de inhibidores de ROCK (+) y D muestra el día 2 de cultivo de pases del grupo de inhibidores de ROCK (+).

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los resultados de la citometría de flujo de la Fig. 12 por la tasa de células positivas para anticuerpos anti-Ki67.

La Fig. 14 es un gráfico que muestra una influencia de Y-27632 sobre la apoptosis de células endoteliales de la córnea de mono.

La Fig. 15 es un gráfico que muestra una influencia de Y-27632 sobre la apoptosis de células endoteliales de la córnea de mono por el número de células muertas.

La Fig. 16 es un gráfico que muestra una influencia de Y-27632 sobre la densidad de células endoteliales de la córnea de mono cultivadas.

La Fig. 17 es un gráfico que muestra la adherencia de células endoteliales de la córnea de mono cultivadas después de 24 h desde el cultivo de pases, en el que el eje vertical muestra el valor del grupo de fasudil con respecto al grado de luminiscencia del grupo de control después de 24 h desde el inicio del cultivo de pases.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

El agente para promover la adherencia de una célula endotelial de la córnea de la presente invención (abreviado en lo sucesivo algunas veces "promotor de la adherencia de la presente invención") contiene un inhibidor de Rho cinasa como principio activo.

En la presente invención, Rho cinasa significa serina/treonina cinasa activada junto con la activación de Rho. Ejemplos incluyen ROK α (ROCKII: Leung, T. et al., J. Biol. Chem., 270, 29051-29054, 1995), p160ROCK (ROK β , ROCK-I: Ishizaki, T. et al., The EMBO J., 15(8), 1885-1893, 1996) y otras proteínas que tienen una actividad de serina/treonina cinasa.

En la presente invención, un tipo de inhibidor de Rho cinasa puede estar contenido individualmente, o varios tipos pueden estar contenidos en combinación, según sea necesario.

Ejemplos del inhibidor de Rho cinasa incluyen los compuestos desvelados en las siguientes referencias:

US4678783, patente 3421217, WO99/20620, WO99/61403, WO02/076976, WO02/076977, WO02/100833, WO03/059913WO03/062227, WO2004/009555, WO2004/022541, WO2004/108724, WO2005/003101, WO2005/039564, WO2005/034866, WO2005/037197, WO2005/037198, WO2005/035501, WO2005/035503, WO2005/035506, WO2005/080394, WO2005/103050, WO2006/057270, WO2007/026664 y similares. Tales compuestos pueden producirse según el método descrito en cada una de las referencias desveladas. Ejemplos específicos incluyen 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina (fasudil), (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano (Y-27632) y similares. Como estos compuestos, pueden usarse preferentemente productos comercialmente disponibles.

De estos, (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina y una sal farmacológicamente aceptable de los mismos se usan preferentemente, ya que son particularmente superiores en la promoción de la adherencia de células endoteliales de la córnea. Como la sal del compuesto, es preferible una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. Ejemplos del ácido incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y similares, ácidos orgánicos tales como ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido mandélico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido salicílico y similares. Son más preferidos 2-clorhidrato de (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano y clorhidrato de 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina.

En la presente invención, ejemplos de la "promoción de la adherencia de células endoteliales de la córnea" incluyen tanto la promoción de la adherencia entre las células del endotelio corneal como la promoción de la adherencia de células endoteliales de la córnea a un sustrato de cultivo.

El promotor de la adherencia de la presente invención proporciona una acción promotora de la adherencia sobre células endoteliales de la córnea separadas de un tejido de la córnea derivado de un mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja, mono etc.) o células endoteliales de la córnea separadas de los mismos y sometidas a pases. Como el promotor de la adherencia de la presente invención es superior en una acción promotora de la adherencia de células endoteliales de la córnea derivadas de ser humano, que se considera que son particularmente difíciles de cultivar y someter a pases, la célula endotelial de la córnea derivada de ser humano es una diana preferible.

La célula endotelial de la córnea desempeña una función de mantener la transparencia de la córnea. Cuando la densidad de las células endoteliales disminuye durante un cierto límite, la córnea desarrolla hinchazón y llega a ser incapaz de mantener la transparencia, por lo que se desarrolla disfunción endotelial de la córnea. El promotor de la adherencia de la presente invención promueve la adherencia de células endoteliales de la córnea, permite la formación de una capa de células endoteliales de la córnea que tiene buena morfología celular y alta densidad celular, y además muestra una acción supresora de la apoptosis sobre células endoteliales de la córnea. Por tanto, es útil como agente terapéutico o agente profiláctico para una enfermedad acompañada de la disfunción endotelial de la córnea, tal como queratopatía bullosa y endotelitis de la córnea. Además, el promotor de la adherencia de la presente invención es útil como agente terapéutico o agente profiláctico para disfunción endotelial de la córnea asociada a cirugía intraocular tal como cirugía de cataratas, cirugía vítrea y similares, disfunción endotelial de la córnea producida por elevada presión intraocular (particularmente ataque glaucomatoso), o disfunción endotelial de la córnea producida por oxígeno insuficiente debido a lentes de contacto.

Mientras que el promotor de la adherencia de la presente invención no está particularmente limitado en tanto que tenga una forma de dosificación adecuada para administración tópica al ojo, se formula preferentemente en forma de una inyección intracameral o líquido de perfusión intraocular. Puede prepararse usando técnicas convencionales ampliamente usadas en el campo. Cuando se administra tópicamente al ojo en forma de una inyección intracameral o líquido de perfusión intraocular, el inhibidor de Rho cinasa y las células endoteliales de la córnea se ponen en contacto en el cuerpo, y se promueve la adherencia de las células endoteliales de la córnea.

Por ejemplo, cuando el promotor de la adherencia de la presente invención se usa como inyección intracameral o líquido de perfusión intraocular, pueden añadirse estabilizador (por ejemplo, bisulfito de sodio, tiosulfato de sodio, edetato de sodio, citrato de sodio, ácido ascórbico, dibutilhidroxitolueno, etc.), solubilizante (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, macrogol, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, etc.), agente de suspensión (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica etc.), emulsionante (por ejemplo, polivinilpirrolidona, lecitina de soja, lecitina de yema de huevo, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, polisorbato 80 etc.), agente tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón borato, tampón carbonato, tampón citrato, tampón Tris, ácido glutámico, ácido épsilon-aminocaproico etc.), espesante (por ejemplo, derivado de celulosa soluble en agua tal como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa etc., sulfato sódico de condroitina, hialuronato de sodio, polímero de carboxivinilo, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, macrogol etc.), conservante (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, gluconato de clorhexidina, clorobutanol, alcohol bencílico, deshidroacetato de sodio, ésteres p-hidroxibenzoicos, edetato de sodio, ácido bórico etc.), agente de isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro de potasio, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, glucosa, propilenglicol etc.), agente de ajuste del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico, ácido acético etc.), algefaciente (por ejemplo, 1-mentol, d-alcanfor, d-borneol, aceite de menta etc.) y similares como aditivos. La cantidad de estos aditivos que va a añadirse varía dependiendo del tipo y uso del aditivo, y similares, y puede añadirse a una concentración capaz de lograr el objeto del aditivo.

La cantidad de principio activo en el promotor de la adherencia de la presente invención es generalmente 0,00001 - 1 % en peso/volumen, preferentemente 0,00001 - 0,1 % en peso/volumen, más preferentemente 0,0001 - 0,01 % en peso/volumen. Aunque la dosis y la frecuencia de administración varían dependiendo del síntoma, edad, peso corporal y forma de administración, cuando se usa como inyección intracameral para un adulto, por ejemplo, una preparación que contiene 0,0001 - 0,1 % en peso/volumen, preferentemente 0,0001 - 0,01 % en peso/volumen, de un principio activo puede ser generalmente administrado varias veces, preferentemente 1 - 2 veces, más preferentemente 1 tiempo, por día, por 0,01 - 0,1 ml por administración.

El promotor de la adherencia de la presente invención también puede añadirse a un medio de cultivo cuando las células endoteliales de la córnea se cultivan en un tubo de ensayo. Cuando el cultivo continúa añadiendo un inhibidor de Rho cinasa al medio de cultivo, el inhibidor de Rho cinasa y las células endoteliales de la córnea se ponen en contacto *in vitro*, y se promueve la adherencia de las células endoteliales de la córnea.

La presente invención proporciona un medio de cultivo para células endoteliales de la córnea, que contiene un inhibidor de Rho cinasa. El inhibidor de Rho cinasa contenido en el medio de cultivo de la presente invención es como se ha descrito anteriormente.

El medio de cultivo de la presente invención puede contener un medio generalmente usado para el cultivo de células endoteliales (por ejemplo, DMEM (GIBCO BRL), suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS)), un factor de crecimiento (por ejemplo, b-FGF), un antibiótico (por ejemplo, penicilina, estreptomicina) y similares.

- 5 La concentración del inhibidor de Rho cinasa en el medio de cultivo de la presente invención es generalmente 1 - 100 uM, preferentemente 5 - 20 uM, más preferentemente 10 µM.

10 El medio de cultivo de la presente invención previene la eliminación de células, aumentando la adherencia de células endoteliales de la córnea, y permite la formación de una capa de células endoteliales de la córnea que tiene buena morfología celular y alta densidad celular. Por tanto, puede usarse preferentemente para el método de producción mencionado a continuación de una preparación endotelial de la córnea de la presente invención. Además, el medio de cultivo de la presente invención también se usa para mantener células endoteliales de la córnea.

15 La presente invención proporciona una solución de conservación de la córnea que contiene un inhibidor de Rho cinasa. El inhibidor de Rho cinasa contenido en la solución de conservación de la córnea de la presente invención es como se ha descrito anteriormente. Una solución de conservación de la córnea es un líquido usado para conservar un injerto de córnea aislado de un donante hasta el trasplante a un receptor.

20 Ejemplos de la solución de conservación de la córnea de la presente invención incluyen soluciones de conservación generalmente usadas para el trasplante de córnea (solución de conservación de explante corneoescleral (Optisol GS: marca registrada), solución de conservación para globo ocular para trasplante de córnea (EPII: marca registrada), solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares, cada una de las cuales contiene un inhibidor de Rho cinasa.

25 La concentración del inhibidor de Rho cinasa en la solución de conservación de la córnea de la presente invención es generalmente 1 - 100 µM, preferentemente 5 - 20 µM, más preferentemente 10 µM.

30 La solución de conservación de la córnea de la presente invención previene la eliminación de células, aumentando la adherencia de células endoteliales de la córnea, y permite la formación de una capa de células endoteliales de la córnea que tiene buena morfología celular y alta densidad celular. Por tanto, puede usarse como solución de conservación de la córnea usada para el trasplante de órganos y similares. Además, la solución de conservación de la presente invención también se usa como solución de conservación para la crioconservación de células endoteliales de la córnea. Para la crioconservación, pueden añadirse adicionalmente glicerol, sulfóxido de dimetilo, propilenglicol, acetamida y similares a la solución de conservación de la presente invención.

35 La presente invención proporciona un método de producción de una preparación endotelial de la córnea, que contiene una etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando el medio de cultivo de la presente invención.

40 La preparación endotelial de la córnea contiene característicamente un sustrato y una capa de células endoteliales de la córnea sobre el sustrato, que se ha cultivado en un tubo de ensayo.

45 En la presente invención, el sustrato no está particularmente limitado, en tanto que pueda soportar una capa de células endoteliales de la córnea cultivadas y pueda mantener su forma en el cuerpo durante al menos 3 días después del trasplante. Además, el sustrato puede tener una función de armazón cuando se cultivan células endoteliales de la córnea en un tubo de ensayo, o puede solo desempeñar una función de soportar la capa de células endoteliales de la córnea después del cultivo. Preferentemente, el sustrato se usa para cultivar células endoteliales de la córnea, y tiene una función como armazón que puede usarse directamente para el trasplante después de completarse el cultivo.

50 Ejemplos del sustrato anteriormente mencionado incluyen materiales de polímero derivados de sustancias que existen de forma natural tales como colágeno, gelatina, celulosa y similares, materiales sintéticos de polímero tales como poliestireno, poliéster, policarbonato, poli(N-isopropilacrilamida) y similares, materiales de polímero biodegradable tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y similares, hidroxiapatita, membrana amniótica y similares.

55 Aunque la forma del sustrato anteriormente mencionado no está particularmente limitada en tanto que soporte una capa de células endoteliales de la córnea y sea adecuada para trasplante, es preferentemente una hoja. Cuando la preparación de la presente invención es una hoja, puede usarse después de cortar en un tamaño adecuado para el sitio de aplicación durante el trasplante. También es posible enrollar una hoja pequeña e insertarla en el labio de una herida. Ejemplos específicos preferibles incluyen una forma circular que cubre aproximadamente el 80 % de un área endotelial de córnea perturbada. También es preferible formar ranuras en la parte vecina del círculo anteriormente mencionado, de manera que pueda ser estrechamente adherido al sitio de aplicación.

65 En una realización preferible, el sustrato anteriormente mencionado es colágeno. Como colágeno, puede usarse preferentemente la hoja de colágeno descrita en el documento JP-A-2004-24852. Tal hoja de colágeno puede prepararse según el método descrito en el documento JP-A-2004-24852 anteriormente mencionado a partir de, por

ejemplo, membrana amniótica.

La capa de células endoteliales de la córnea anteriormente mencionada muestra preferentemente al menos una de las siguientes características. Más preferentemente, muestra dos o más, más preferentemente todas, de las siguientes características.

(1) La capa de células tiene una estructura de una sola capa. Esta es una de las características de la capa de células endoteliales de la córnea en el cuerpo.

(2) La capa de células tiene una densidad celular de aproximadamente 1.000 - aproximadamente 4.000 células/mm². Particularmente, cuando un adulto es un receptor (receptor de trasplante), es preferentemente aproximadamente 2.000 - aproximadamente 3.000 células/mm².

(3) La célula que constituye la capa de células tiene una vista plana sustancialmente hexagonal. Esta es una de las características de la célula que constituye la capa de células endoteliales de la córnea en el cuerpo. La preparación de la presente invención es similar a la capa de células endoteliales de la córnea en el cuerpo, presenta función similar a la de la capa de células endoteliales de la córnea innata, y también puede presentar capacidad proliferativa *in vivo*.

(4) Las células se disponen regularmente en la capa de células. En la capa de células endoteliales de la córnea en el cuerpo, las células que constituyen la capa están regularmente desplegadas, debido a que las células endoteliales de la córnea se consideran para mantener la función normal y alta transparencia y la córnea se considera que presenta apropiadamente función de control del agua. Por tanto, se espera que la preparación de la presente invención que tiene tales características morfológicas muestre una función similar a la de una capa de células endoteliales de la córnea en el cuerpo.

El método de producción de la presente invención incluye una etapa de cultivar células endoteliales de la córnea usando el medio de cultivo de la presente invención y, por ejemplo, puede realizarse por el siguiente método.

<1> Recogida de células endoteliales de la córnea y cultivo en tubo de ensayo

Se recogen células endoteliales de la córnea de la córnea del propio receptor/receptora o un donante adecuado por un método convencional. En vista de las condiciones de trasplante en la presente invención, pueden prepararse células endoteliales de la córnea alógenas. Por ejemplo, se desprenden la membrana de Descemet y la capa de células endoteliales del tejido de la córnea del estroma de la córnea, se ponen en una placa de cultivo y se tratan con Dispase y similares. Por este proceso, se eliminan células endoteliales de la córnea de la membrana de Descemet. Las células endoteliales de la córnea que quedan sobre la membrana de Descemet pueden eliminarse por pipeteado y similares. Después de la eliminación de la membrana de Descemet, las células endoteliales de la córnea se cultivan en el medio de cultivo de la presente invención. Un medio de cultivo puede obtenerse, por ejemplo, añadiendo apropiadamente FBS (suero bovino fetal), b-FGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) y antibióticos tales como penicilina, estreptomycin y similares a DMEM comercialmente disponible (medio Eagle modificado por Dulbecco), y añadiendo además Y-27632 o fasudil al mismo. Se usa preferentemente un recipiente de cultivo (placa de cultivo) con un recubrimiento de colágeno tipo I, colágeno tipo IV, fibronectina, laminina o matriz extracelular de célula endotelial de la córnea bovina, y similares, sobre la superficie. Alternativamente, puede usarse un recipiente de cultivo general con un agente de recubrimiento comercialmente disponible tal como la mezcla de recubrimiento FNC (marca registrada) y similares. Mediante un uso combinado de tal recubrimiento y el medio de cultivo de la presente invención, se promueve la adherencia de células endoteliales de la córnea a la superficie de un recipiente de cultivo, y se hace un buen crecimiento.

Aunque las condiciones de temperatura para el cultivo de células endoteliales de la córnea no están particularmente limitadas en tanto que las células endoteliales de la córnea crezcan, por ejemplo, la temperatura es aproximadamente 25 - aproximadamente 45 °C, preferentemente aproximadamente 30 - aproximadamente 40 °C en vista de la eficiencia de crecimiento, y adicionalmente preferentemente aproximadamente 37 °C. El método de cultivo se realiza en una estufa de incubación de cultivo celular convencional bajo humidificación en el entorno de aproximadamente 5-10 % de concentración de CO₂.

<2> Cultivo de pases

Puede realizarse cultivo de pases después del crecimiento de las células endoteliales de la córnea sometidas a cultivo. El cultivo de pases se realiza preferentemente cuando las células han alcanzado subconfluyente o confluyente. El cultivo de pases puede realizarse del siguiente modo. Las células se desprenden de la superficie de un recipiente de cultivo por un tratamiento con tripsina-EDTA etc., y se recuperan. El medio de cultivo de la presente invención se añade a las células recuperadas dando una suspensión de células. Se realiza un tratamiento de centrifugación preferentemente durante la recuperación de las células o después de la recuperación. Un tratamiento de centrifugación tal proporciona una suspensión de células que tiene una alta densidad celular. La densidad celular preferible es aproximadamente 1 - 2×10⁶ células/ml. Como condiciones para el tratamiento de centrifugación aquí, pueden mencionarse, por ejemplo, 500 rpm (30 g) - 1000 rpm (70 g), 1 - 10 min.

La suspensión de células se siembra sobre un recipiente de cultivo del mismo modo que en el cultivo inicial anteriormente mencionado, y se cultiva. Aunque la relación de dilución durante el pase varía dependiendo de la condición de las células, es aproximadamente 1:2 - 1:4, preferentemente aproximadamente 1:3. El cultivo de pases puede realizarse en condiciones de cultivo similares a aquellas del cultivo inicial anteriormente mencionado. Aunque el tiempo de cultivo varía dependiendo de la condición de las células que van a usarse, es, por ejemplo, 7 - 30 días. El cultivo de pases anterior puede realizarse múltiples veces según sea necesario. Usando el medio de cultivo de la presente invención, aumenta la adherencia celular en las fases tempranas de cultivo, por lo que el tiempo de cultivo puede ser acortado.

<3> Preparación de capa de células endoteliales de la córnea

Se siembra una suspensión de células sobre un sustrato tal como una hoja de colágeno y similares, y se cultiva. Aquí, el número de células sembradas está controlado de forma que la preparación endotelial de la córnea finalmente producida tenga una capa de células que tiene una densidad celular deseada. Para ser precisos, las células se siembran de manera que se forme una capa de células que tiene una densidad celular de aproximadamente 1.000 - aproximadamente 4.000 células/mm². El cultivo puede realizarse en condiciones similares a aquellas del cultivo inicial anteriormente mencionado y similares. Aunque el tiempo de cultivo varía dependiendo de la condición de las células que van a usarse, es, por ejemplo, 3 - 30 días.

Cultivando de la manera anterior, puede obtenerse una preparación endotelial de la córnea en la que se forma una capa de células endoteliales de la córnea cultivadas en un tubo de ensayo sobre un sustrato.

En la presente invención, la preparación endotelial de la córnea puede contener el medio de cultivo de la presente invención para mantener células endoteliales de la córnea. Además, la preparación endotelial de la córnea puede contener la solución de conservación de la córnea de la presente invención hasta que se usa para el trasplante. La presente invención también proporciona una combinación de una preparación endotelial de la córnea y el medio de cultivo o solución de conservación de la presente invención.

La preparación endotelial de la córnea obtenida por el método de producción de la presente invención puede usarse como injerto para el tratamiento de una enfermedad que requiere el trasplante de endotelio corneal, por ejemplo, queratopatía bullosa, edema corneal, leucoma corneal, particularmente, queratopatía bullosa producida por disfunción endotelial de la córnea debido a distrofia corneal, traumatismo o cirugía intraocular.

El sujeto de la administración del promotor de la adherencia y la preparación endotelial de la córnea de la presente invención incluye, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, ovejas, mono, etc.). Ejemplos

La presente invención se explica en más detalle a continuación con referencia a los ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. Los animales experimentales se usaron según la International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, además de Act on welfare and management of animals, y norma referente a la alimentación, mantenimiento y similares de animales experimentales. Este experimento se realizó según las directrices de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología sobre el uso de animales en investigación oftálmica y de visión.

Ejemplo 1

Estudio de la influencia del inhibidor de ROCK sobre el cultivo de célula endotelial de la córnea de conejo

A partir de un tejido de córnea de conejo aislado inmediatamente después de la eutanasia, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. La membrana de Descemet se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas, se agitaron las células de un grupo de inhibidores de ROCK (+) en un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 µM) y se agitaron las células de un grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632, a la misma concentración, y las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 2000 células por pocillo. Como medio para el endotelio corneal, se usó un medio de cultivo (DMEM, Gibco Invitrogen) añadido con 1 % de suero bovino fetal y 2 mg/ml de bFGF (Gibco Invitrogen). La placa se pre-trató con una mezcla de recubrimiento FNC (Athena ES) durante 10 min. A las 72 h desde el inicio del cultivo, el medio de cultivo se intercambió y, después de 72 h, se cultivaron tanto el grupo de inhibidores de ROCK (+) como el grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio normal para el endotelio corneal libre de Y-27632 hasta el día 5. La fotomicrografía de contraste de fases del cultivo primario de células endoteliales de la córnea de conejo después de 24 h desde el inicio del cultivo se muestra en la Fig. 1. Desde el día 1 hasta el día 3 después del inicio del cultivo, las células se contaron cada 24 h por ensayo de MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio]) usando CellTiter 96 (marca registrada) Aqueous One Solution Cell Proliferation (Promega) (Fig. 2).

En el grupo de inhibidores de ROCK (+) (Fig. 1B), la adherencia celular a las 24 h (día 1) después de la siembra de células aumentó significativamente a aproximadamente 2,8 veces (Fig. 2 y 3) en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-) (Fig. 1A). En el día 3 cuando las células alcanzaron la confluencia, no se encontró una diferencia significativa entre los dos grupos (Fig. 2). A partir de esto se aclaró que Y-27632 tiene una acción para

Ejemplo 2

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre el cultivo de célula endotelial de la córnea de mono

A partir del tejido de la córnea aislado de *Macaca fascicularis* sacrificado para otro fin, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. Para el grupo de inhibidores de ROCK (+), la membrana de Descemet se colocó en un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) y se incubó en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 10 min. Para el grupo de inhibidores de ROCK (-), la membrana se puso en un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 y se incubó durante 10 min en las mismas condiciones. Al igual que el medio para el endotelio corneal, se usó el mismo medio de cultivo celular que en el

Ejemplo 1. La membrana de Descemet después de la incubación se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se agitaron en los medios para el endotelio corneal con Y-27632(+) y Y-27632(-) a la misma concentración, y las células se sembraron en una placa de 12 pocillos a una densidad de aproximadamente 20000 células por pocillo. La placa se pre-trató con una mezcla de recubrimiento FNC (Athena ES) durante 10 min. A las 72 h desde el inicio del cultivo, el medio de cultivo se intercambió y, después de 72 h, se cultivaron tanto el grupo de inhibidores de ROCK (+) como el grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio normal para el endotelio corneal libre de Y-27632.

De la Fig. 4, en el cultivo primario de células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* después de 24 h desde el inicio del cultivo, se adhirieron aparentemente más células sobre la placa en el inhibidor de ROCK (+) (Fig. 4B) en comparación con el inhibidor de ROCK (-) (Fig. 4A). El número de días antes de alcanzar la confluencia fue 3 para el inhibidor de ROCK (+), mientras que fue 7 para el inhibidor de ROCK (-). A partir de esto se mostró que Y-27632 aumenta la adherencia celular en las fases tempranas después del inicio del cultivo y es un fármaco útil que permite el cultivo celular incluso en células endoteliales de la córnea de mono que se considera que son difíciles de cultivar fuera del cuerpo en comparación con de conejo.

Ejemplo 3

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre el cultivo de célula endotelial de la córnea humana

De los tejidos de córnea humana obtenidos a partir del Banco de Ojos estadounidense, la parte central (diámetro 7 mm) había sido usada para el trasplante de córnea y se usó el tejido de la córnea circundante restante. Se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea adheridas a ella. Para el grupo de inhibidores de ROCK (+), la membrana de Descemet se colocó en un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) y se incubó en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 10 min. Para el grupo de inhibidores de ROCK (-), la membrana se puso en un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 y se incubó durante 10 min en las mismas condiciones. Al igual que el medio para el endotelio corneal, se usó el mismo medio de cultivo que en el Ejemplo 1. La membrana de Descemet después de la incubación se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se agitaron en los medios para el endotelio corneal con Y-27632(+) y Y-27632(-) a la misma concentración, y las células se sembraron en una placa de 48 pocillos pretratada con una mezcla de recubrimiento FNC (Athena ES) a una densidad de aproximadamente 10000 células por pocillo. El número de células endoteliales de la córnea humanas obtenidas a partir del tejido de la córnea circundante fue extremadamente pequeño, y por tanto, se cultivó la córnea del donante de un ojo en un pocillo. Las córneas de donante usadas para el estudio fueron: el cultivo empezó 6 días después de la muerte del donante (edad 69) para el grupo de inhibidores de ROCK (+), y el cultivo empezó 7 días después de muerte del donante (edad 51) para el grupo de inhibidores de ROCK (-). Se considera que una influencia sobre la edad y el tiempo transcurrido desde la muerte del donante hasta el cultivo celular es casi la misma.

A las 72 h desde el inicio del cultivo, el medio de cultivo se intercambió y, después de 72 h, se cultivaron tanto el grupo de inhibidores de ROCK (+) como el grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio normal para el endotelio corneal libre de Y-27632. Para estudiar la influencia sobre la adherencia celular en las fases tempranas después del inicio del cultivo y la morfología celular, las células se observaron con un microscopio de contraste de fases y se tomaron fotografías con una cámara digital después del inicio del cultivo (Fig. 5).

De la Fig. 5, en el día 7 después del inicio del cultivo, se formó una confluencia y capa de una sola célula altamente densa que consistió en células (células poligonales uniformes) similares a células endoteliales de la córnea normales en el grupo de inhibidores de ROCK (+) (Fig. 5B), mientras que las células endoteliales alargadas de tipo fibroblasto con baja densidad solo sobrevivieron en una forma de islote en el grupo de inhibidores de ROCK (-) (Fig. 5A). A partir de estos resultados, se considera que, en el cultivo primario de endotelio corneal humano que se sabe que es extremadamente difícil de cultivar, la adición de Y-27632 que tiene una acción de aumentar la adherencia celular en las fases tempranas después del inicio del cultivo a un medio de cultivo permite la formación de una capa de células endoteliales de la córnea que tiene buena morfología celular y alta densidad celular.

Ejemplo de formulación 1

Inyección intracameral que contiene inhibidor de Rho cinasa

Se prepara la siguiente inyección intracameral según un método convencional.

Y-27632	10 mg
dihidrogenofosfato de sodio	0,1 g
cloruro sódico	0,9 g
hidróxido sódico	e.q.
agua purificada por esterilización	e.q.
cantidad total	100 ml (pH 7)

Se usa Y-27632 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Ejemplo de formulación 2

Líquido de perfusión intraocular que contiene inhibidor de Rho cinasa

Se prepara el siguiente líquido de perfusión intraocular según un método convencional.

Y-27632	1,0 mg
OPEGUARD MA	e.q.
cantidad total	100 ml

Se usan OPEGUARD MA fabricado por Senju Pharmaceutical Co., Ltd. y Y-27632 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Ejemplo de formulación 3

Medio de cultivo que contiene inhibidores de Rho cinasa para la preparación de la hoja de endotelio corneal

Se prepara el siguiente medio de cultivo según un método convencional.

Y-27632	0,5 mg
FBS	10 ml
solución de penicilina-estreptomicina	1 ml
FGF básico	200 ng
DMEM	e.q.
cantidad total	100 ml

Se usan FBS fabricado por Invitrogen, solución de penicilina-estreptomicina fabricada por Nacalai Tesque (que contiene penicilina 5000 u/ml y estreptomicina 5000 µg/ml), FGF básico fabricado por Invitrogen, Y-27632 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y DMEM fabricado por Invitrogen.

Ejemplo de formulación 4

Solución de conservación de la córnea que contiene inhibidor de Rho cinasa

Se prepara la siguiente solución de conservación según un método convencional.

Y-27632	0,2 mg
Optisol-GS	e.q.
cantidad total	100 ml

Se usan Optisol-GS fabricado por Bausch & Lomb, Inc. y Y-27632 fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Ejemplo 4

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre cultivo primario de célula endotelial corneal de mono

A partir del tejido de la córnea aislado de *Macaca fascicularis* sacrificado, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. Del mismo modo que en el Ejemplo 2, para el grupo de inhibidores de ROCK (+), la membrana de Descemet se colocó en un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) y se incubó en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 10 min. Para el grupo de inhibidores de ROCK (-), la membrana se puso en un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 y se incubó durante 10 min en las mismas condiciones. Al igual que el medio para el endotelio corneal, se usó el mismo medio de cultivo celular que en el Ejemplo 1. La membrana de Descemet después de la incubación se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se agitaron en los medios para el endotelio corneal con Y-27632(+) y Y-27632(-) a la misma concentración, y las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 2000 células por pocillo. A las 72 h desde el inicio del cultivo, el medio de cultivo se intercambió y, después de 72 h, se cultivaron tanto el grupo de inhibidores de ROCK (+) como el grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio normal para el endotelio corneal libre de Y-27632. En el día 10 de cultivo, las células se fijaron con 4 % de para-formaldehído a temperatura ambiente durante 10 min, y se tiñeron con azul de toluidina (Fig. 6A y 6B). El área total de las células se midió usando Imagen J (National Institutes of Health) y se analizó (Fig. 6C).

En el cultivo primario de células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* en el día 10 después del inicio del cultivo, el inhibidor de ROCK (+) (Fig. 6B) aumentó significativamente el área total de células cultivadas a aproximadamente 1,6 veces (Fig. 6C) en comparación con el inhibidor de ROCK (-) (Fig. 6A), promoviendo adherencia en las fases tempranas de cultivo. A partir de esto se mostró que Y-27632 es un fármaco útil para el cultivo primario incluso en células endoteliales de la córnea de mono que se considera que son difíciles de cultivar fuera del cuerpo.

Ejemplo 5

Estudio de concentración óptima de Y-27632 para células endoteliales de la córnea de mono

Se pusieron células endoteliales de la córnea de mono (cultivo primario) recogidas del mismo modo que en el Ejemplo 2 en medios para el endotelio corneal cada uno añadido con Y-27632 a 1, 10, 33 y 100 μ M y un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632, y se agitaron a la misma concentración, y las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 2000 células por pocillo. A las 24 h desde el inicio del cultivo, se contaron las células viables usando CellTiter-Glo (marca registrada, Promega) (Fig. 7).

Cuando las células endoteliales de la córnea a las 24 h desde el inicio del cultivo se cultivaron en un medio que contenía Y-27632 10 μ M, el número de células que se adhirieron sobre la placa fue significativamente alto (Fig. 7) en comparación con el cultivo celular en un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 y un medio para el endotelio corneal que contenía diferentes concentraciones de Y-27632. A partir de esto, se mostró que Y-27632 a una concentración de 10 μ M es la más eficaz para células endoteliales de la córnea de mono.

Ejemplo 6

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre el cultivo de pases de célula endotelial corneal de mono

A partir del tejido de la córnea aislado de *Macaca fascicularis* sacrificado, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. La membrana de Descemet se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se sembraron en un medio para el endotelio corneal. Las células endoteliales de la córnea que alcanzaron la confluencia se incubaron con 0,05 % de tripsina en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 10 min, y se cultivaron en pases. Después de 4 a 6 pases, las células endoteliales de la córnea se colocaron en una placa de 96 pocillos a una dilución de 1/2, 1/6 o 1/8. El cultivo de pases continuó usando un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) para el grupo de inhibidores de ROCK (+) y un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 para el grupo de inhibidores de ROCK (-). A las 24 h después del pase, las células se contaron del mismo modo que en el Ejemplo 5 usando CellTiter-Glo (marca registrada, Promega) (Fig. 8).

Cuando las células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* cultivadas 24 h después del pase se cultivaron en pases en un medio que contenía Y-27632, el número de células que se adhirieron sobre la placa fue significativamente alto (Fig. 8) en comparación con un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632. A partir de esto se mostró que Y-27632 también fue eficaz para, además de cultivo primario, cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de mono.

Ejemplo 7

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre la morfología celular en cultivo de pases de célula endotelial corneal de mono

Se subcultivaron células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* cultivadas en pases del mismo modo que en el Ejemplo 6 sobre un portaobjetos a una dilución de 1/4. A las 24 h a partir del cultivo de pases, se observó la morfología celular con un microscopio de contraste de fases (Figs. 9A y 9B). Además, las células endoteliales de la córnea sobre el portaobjetos se fijaron con 4 % de para-formaldehído a temperatura ambiente durante 10 min, y se tiñó la fibra de actina por tinción de fluorescencia con faloidina (Figs. 10A y 10B).

En las células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* cultivadas 24 h después del pase, cuando el cultivo de pases se realizó en un medio que contenía Y-27632 (Fig. 9B), aumentó la adherencia de las células sobre el portaobjetos, se promovió el aplanamiento a células de tipo células endoteliales de la córnea, y también aumentó la agregación de células en comparación con un medio para el endotelio corneal sin que contuviera Y-27632 (Fig. 9A). Además, por tinción de fluorescencia con faloidina, cuando el cultivo de pases se realizó en un medio que contenía Y-27632 (Fig. 10B), se observó claramente la fibra de estrés de actina en comparación con un medio para el endotelio corneal sin que contuviera Y-27632 (Fig. 10A), y se encontró que Y-27632 promovía la formación de citoesqueleto.

Ejemplo 8

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre el ciclo celular de célula endotelial corneal de mono

Se subcultivaron células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* cultivadas en pases del mismo modo que en el Ejemplo 6 sobre un portaobjetos a una dilución de 1/4. Se usó un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) para el grupo de inhibidores de ROCK (+) y un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 para el grupo de inhibidores de ROCK (-). En los días 1, 2 y 14 del cultivo de pases, las células endoteliales de la córnea sobre el portaobjetos de vidrio se fijaron con 4 % de para-formaldehído a temperatura ambiente durante 10 min, y se inmunotifieron con anticuerpo anti-Ki67 (Fig. 11). Similarmente, además, las células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* se cultivaron en pases a una dilución de 1/4 en cada uno del grupo de inhibidores de ROCK (+) y el grupo de inhibidores de ROCK (-). En los días 1 y 2 del cultivo de pases, las células se recogieron usando 0,05 % de tripsina y se sometieron a citometría de flujo usando anticuerpo anti-Ki67, y se examinó el ciclo celular (Figs. 12 y 13).

Al igual que en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-), el grupo de inhibidores de ROCK (+) contuvo muchas células Ki67 positivas en los días 1 y 2 del cultivo de pases. Sin embargo, cuando las células alcanzaron casi la confluencia en el día 14, el número de células positivas del grupo de inhibidores de ROCK (+) fue inferior al del grupo de inhibidores de ROCK (-) (Fig. 11). También en la citometría de flujo, el grupo de inhibidores de ROCK (+) contuvo muchas menos células Ki67 positivas en los días 1 y 2 del cultivo de pases en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-) (Figs. 12 y 13).

Como el antígeno Ki67 se encuentra en el núcleo celular en el ciclo de proliferación celular G1, y de las fases S a M, se mostró que Y-27632 tiene una acción de promover el ciclo celular en las fases tempranas después del cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* y es un fármaco útil para el eficiente cultivo celular.

Ejemplo 9

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre la apoptosis de célula endotelial corneal de mono

Se subcultivaron células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis* cultivadas en pases del mismo modo que en el Ejemplo 6 a una dilución de 1/4. Se usó un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 μ M) para el grupo de inhibidores de ROCK (+) y se usó un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 para el grupo de inhibidores de ROCK (-). En el día 1 del cultivo de pases, todas las células que incluyen aquellas en el medio se recogieron usando 0,05 % de tripsina y se sometieron a citometría de flujo usando Annexin V y PI (yoduro de propidio), y se examinó la apoptosis (Figs. 14 y 15).

El grupo de inhibidores de ROCK (+) mostró una disminución significativa en la relación de células apoptóticas con respecto a las células completas en el día 1 del cultivo de pases (Fig. 14) en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-). Además, una comparación del número de células apoptóticas por cada 1×10^4 células reveló una disminución significativa en el grupo de inhibidores de ROCK (+) en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-) (Fig. 15).

A partir de esto se mostró que Y-27632 tiene una acción de suprimir la apoptosis durante el cultivo de pases de células endoteliales de la córnea de *Macaca fascicularis*.

Ejemplo 10

Estudio de la influencia de Y-27632 sobre la densidad de célula endotelial corneal de mono

5 A partir del tejido de la córnea aislado de *Macaca fascicularis* sacrificado, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. La membrana de Descemet se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la

10 córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se sembraron sobre un medio para el endotelio corneal. Las células endoteliales de la córnea que alcanzaron la confluencia se incubaron con 0,05 % de tripsina en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante

15 10 min, y se cultivaron en pases. Se usó un medio para el endotelio corneal añadido con Y-27632 (10 µM) para el grupo de inhibidores de ROCK (+) y se usó un medio para el endotelio corneal sin adición de Y-27632 para el grupo de inhibidores de ROCK (-). A las 72 h desde el inicio del cultivo, el medio de cultivo se intercambió y, después de 72 h, se cultivaron tanto el grupo de inhibidores de ROCK (+) como el grupo de inhibidores de ROCK (-) en un medio normal para el endotelio corneal libre de Y-27632. En casa pase, se tomaron fotografías de las células con un microscopio de contraste de fases, se midió la densidad celular, y se estudió la influencia de Y-27632 sobre la densidad de las células endoteliales de la córnea de mono cultivadas.

20 El pase se repitió 7 veces, y el grupo de inhibidores de ROCK (+) mostró densidad celular más alta (Fig. 16) durante todo el periodo del cultivo de pases en comparación con el grupo de inhibidores de ROCK (-). A partir de esto se considera que el uso de Y-27632 permite el cultivo de células endoteliales de la córnea que tienen alta densidad, que también serán útiles en el futuro para la medicina regenerativa tal como el trasplante de hoja de endotelio corneal de cultivo.

25 Ejemplo 11

Estudio de la influencia de fasudil sobre el cultivo de célula endotelial corneal de mono

30 A partir del tejido de la córnea aislado de *Macaca fascicularis* sacrificado, se separó la membrana de Descemet con células endoteliales de la córnea unidas a ella. La membrana de Descemet se incubó junto con Dispase II (1,2 U/ml, Roche Applied Science) en las condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ durante 45 min, y las células endoteliales de la córnea se separaron mecánicamente por una operación de pipeteado. Se centrifugaron las células endoteliales de la córnea separadas y se cultivaron en pases en un medio para el endotelio corneal. Al igual que el medio para el endotelio corneal, se usó el mismo medio de cultivo celular que en el Ejemplo 1. Se separaron las células

35 endoteliales de la córnea de mono cultivadas recogidas durante el cultivo de pases por una tratamiento con 0,05 % de tripsina y se centrifugaron, y se agitaron a la misma concentración en un medio para el endotelio corneal añadido con fasudil (10 µM, SIGMA-ALDRICH) en el grupo de fasudil y en un medio para el endotelio corneal sin adición de fasudil en el grupo de control, y las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 2000 células por pocillo. A las 24 h desde el inicio del cultivo, se contaron las células adheridas

40 usando CellTiter-Glo (marca registrada) Luminescent Cell Viability Assay (Promega) (Fig. 17). También se encontró un efecto de la adherencia celular promovida de las células endoteliales de la córnea usando fasudil, un inhibidor de ROCK.

45 Ejemplo de formulación 5

Inyección intracameral que contiene inhibidor de Rho cinasa

Se prepara la siguiente inyección intracameral según un método convencional.

fasudil	10 mg
dihidrogenofosfato de sodio	0,1 g
cloruro sódico	0,9 g
hidróxido sódico	e.q.
agua purificada por esterilización	e.q.
cantidad total	100 ml (pH 7)

50

Ejemplo de formulación 6

Medio de cultivo que contiene inhibidor de Rho cinasa para la preparación de la hoja de endotelio corneal

55 Se prepara el siguiente medio de cultivo según un método convencional.

fasudil	0,5 mg
FBS	10 ml
solución de penicilina-estreptomicina	1 ml
FGF básico	200 ng

DMEM

e.q.
cantidad total 100 ml

Se usan FBS fabricado por Invitrogen, solución de penicilina-estreptomicina fabricada por Nacalai Tesque (que contiene penicilina 5000 u/ml y estreptomicina 5000 µg/ml), FGF básico fabricado por Invitrogen y DMEM fabricado por Invitrogen.

5

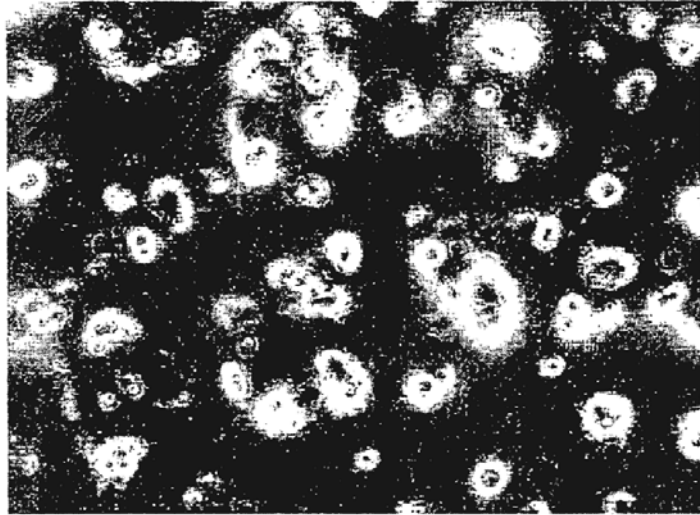
La presente solicitud se basa en las solicitudes de patente N.º 2007-223141 (fecha de presentación: 29 de agosto de 2007) y 2008-016088 (fecha de presentación: 28 de enero de 2008) presentada en Japón, cuyos contenidos se incorporan por completo en el presente documento por esta referencia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de Rho cinasa para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de disfunción endotelial de la córnea.
2. El inhibidor de Rho cinasa para su uso según la reivindicación 1, que es al menos uno seleccionado de (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina y una sal farmacológicamente aceptable de los mismos.
- 10 3. El inhibidor de Rho cinasa para su uso según la reivindicación 1, en el que la disfunción endotelial de la córnea es queratopatía bullosa o endotelitis de la córnea.
4. El inhibidor de Rho cinasa para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de una inyección intracameral o líquido de perfusión intraocular.
- 15 5. Uso de un medio de cultivo que comprende un inhibidor de Rho cinasa para producir una preparación endotelial de la córnea, en el que el inhibidor de Rho cinasa se usa para promover la adherencia entre células endoteliales de la córnea o entre células endoteliales de la córnea y un sustrato de cultivo.
- 20 6. El uso según la reivindicación 5, en el que el medio de cultivo comprende al menos un inhibidor de Rho cinasa seleccionado de (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano, 1-(5-isoquinolinsulfonil)homopiperazina y una sal farmacológicamente aceptable de los mismos.
7. El uso según la reivindicación 5, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.
- 25 8. Un método de producción de una preparación endotelial de la córnea, que comprende una etapa de cultivar una célula endotelial de la córnea usando un medio de cultivo como se define en la reivindicación 5 o 6.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.
- 30 10. Una preparación endotelial de la córnea producida por el método según la reivindicación 8 para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de disfunción endotelial de la córnea.
- 35 11. Uso *in vitro* de un inhibidor de Rho cinasa para promover la adherencia entre células endoteliales de la córnea o entre células endoteliales de la córnea y un sustrato de cultivo.
12. Un método de promoción de la adherencia celular en una preparación endotelial de la córnea que comprende una etapa de cultivar una célula endotelial de la córnea usando un medio de cultivo como se define en la reivindicación 5 o 6.
- 40 13. El método según la reivindicación 12, en el que la célula endotelial de la córnea deriva de ser humano.

FIG. 1

A



B

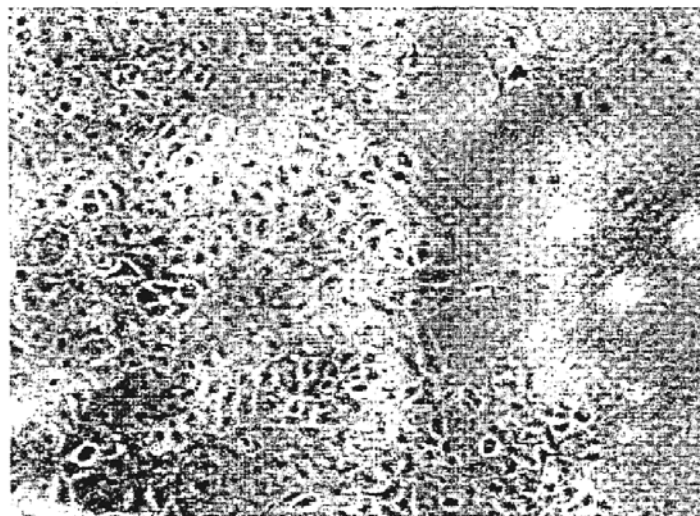
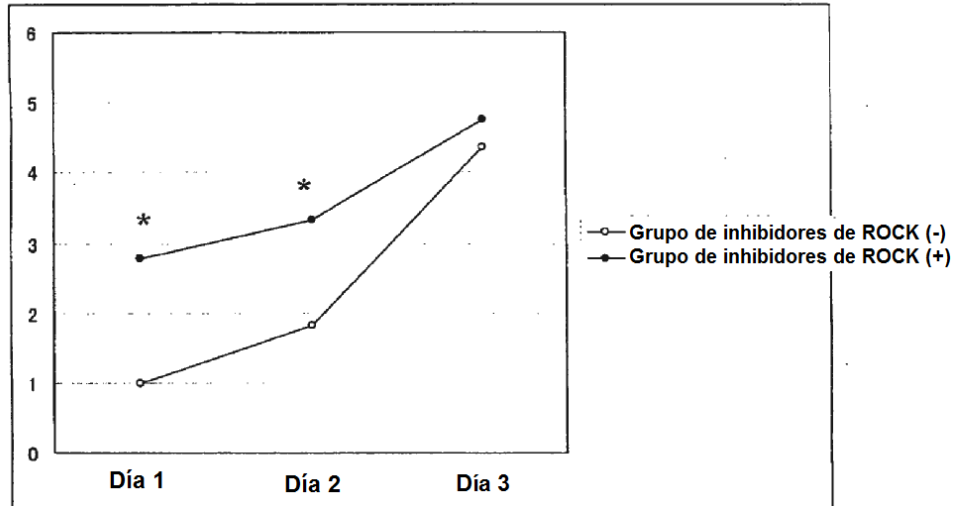
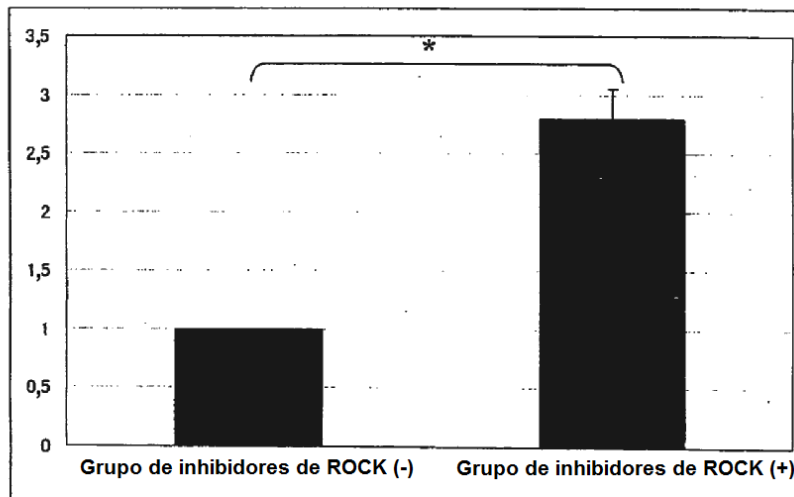


FIG. 2



*: $p < 0,001$, prueba de la t de Student

FIG. 3



*: $p < 0,001$, prueba de la t de Student

FIG. 4

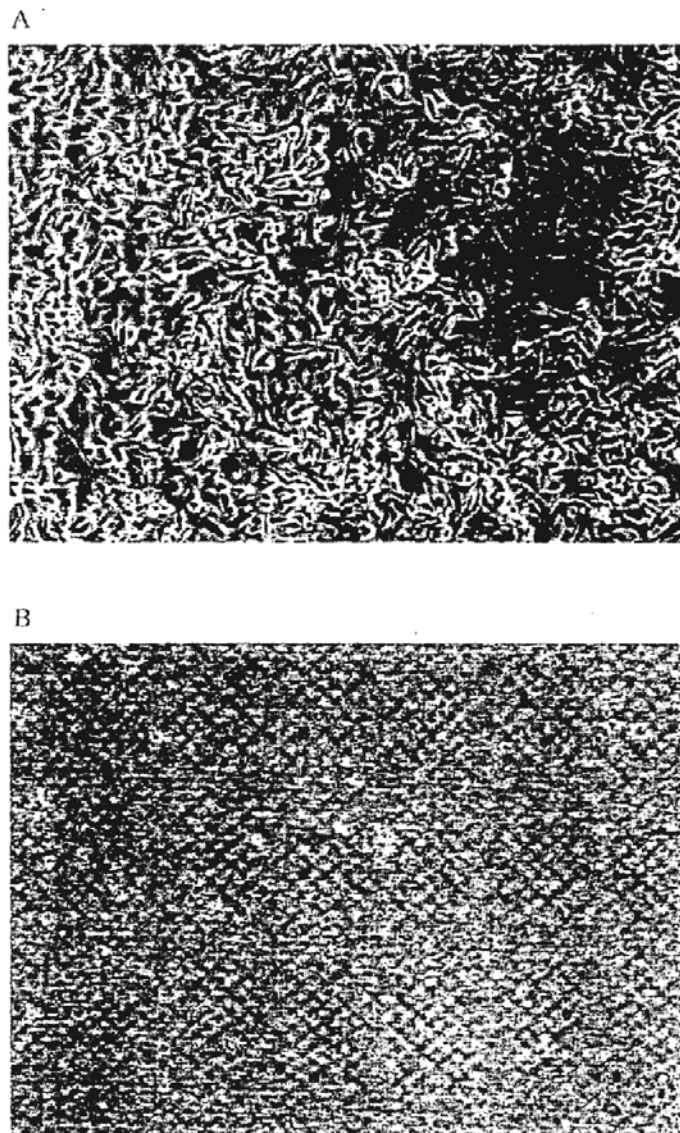
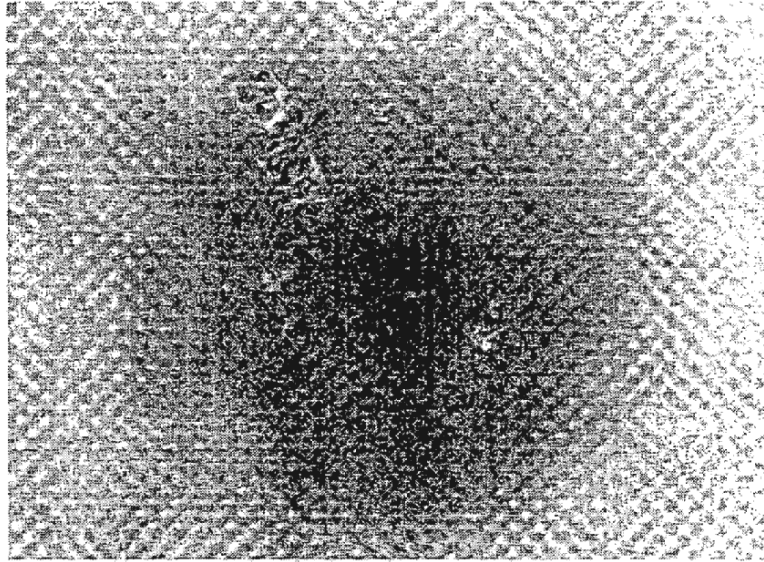


FIG. 5

A



B

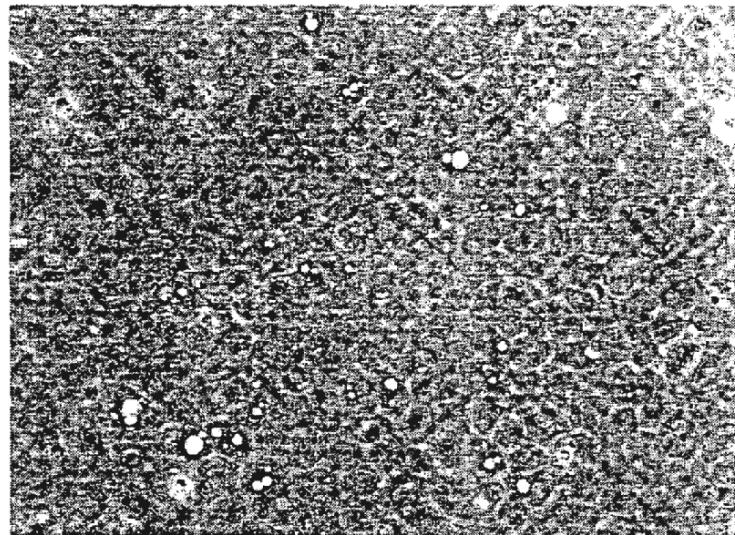


FIG. 6

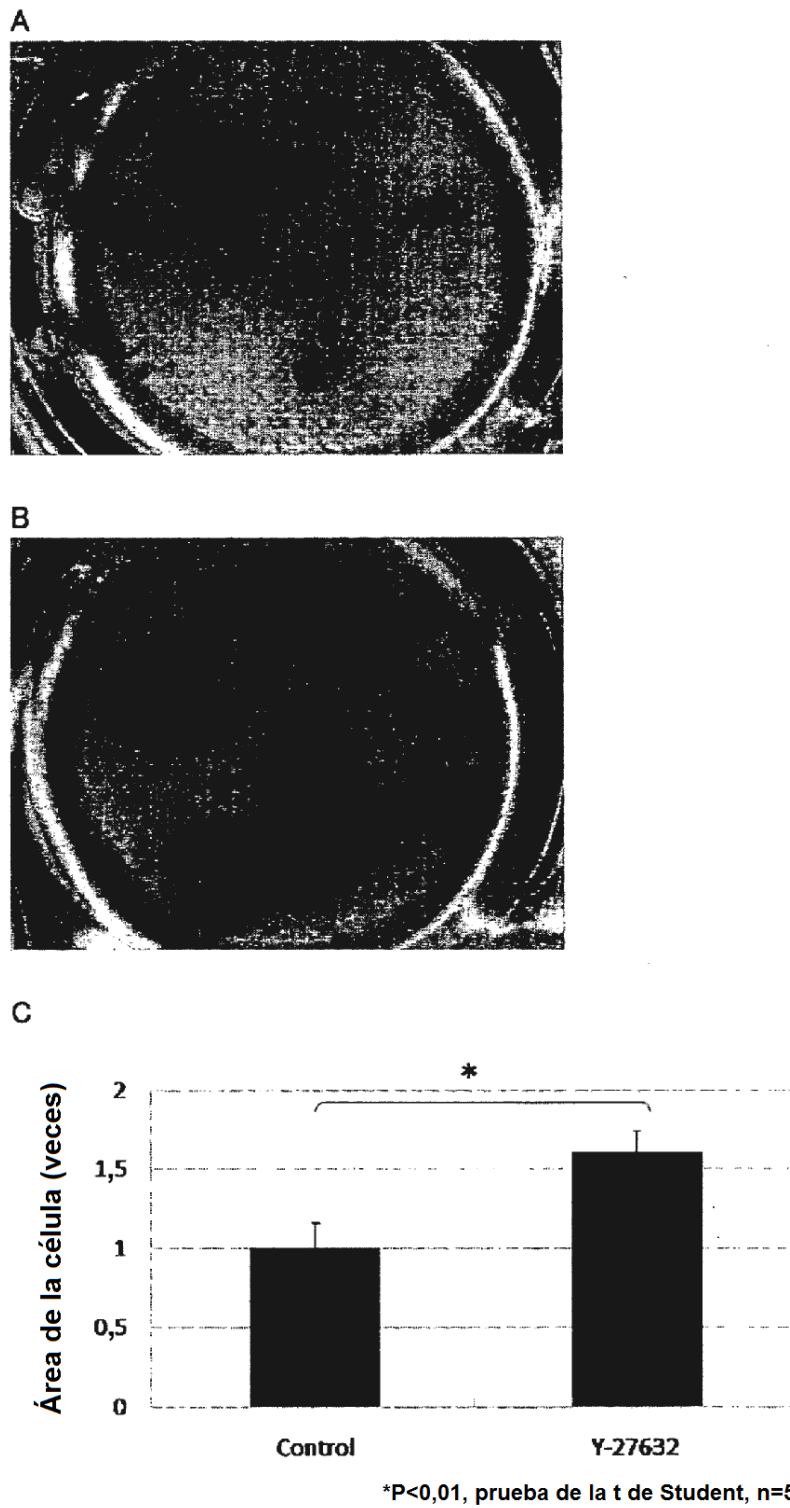
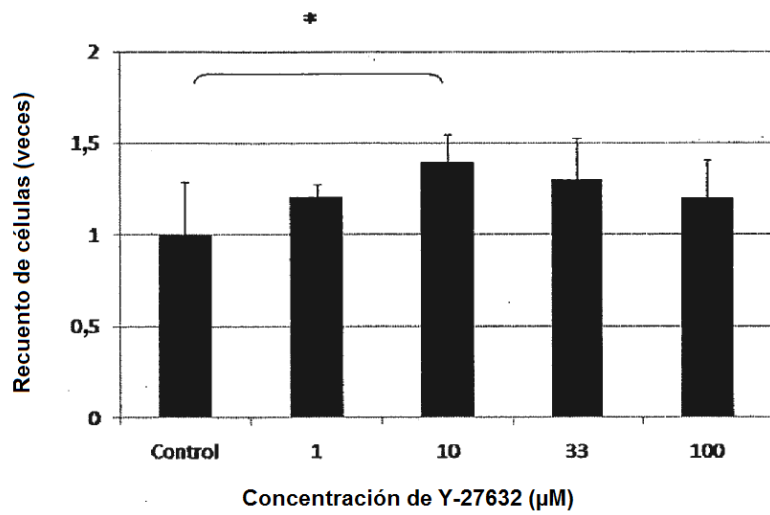
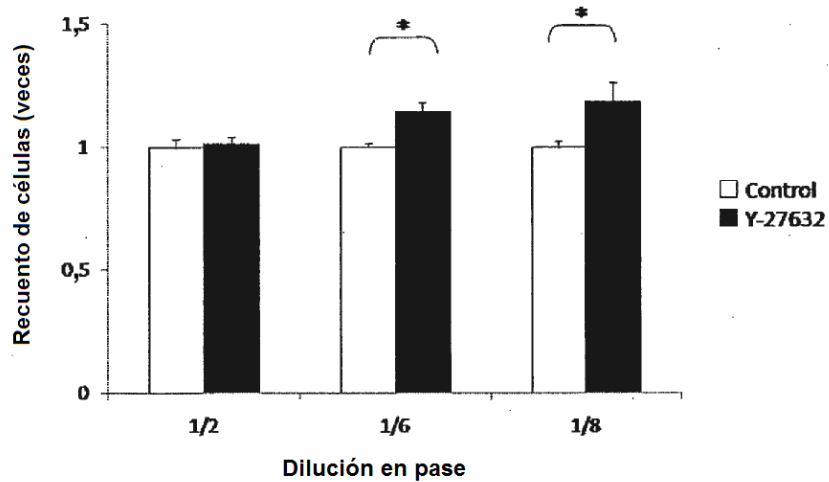


FIG. 7



*P<0,05, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, n=5

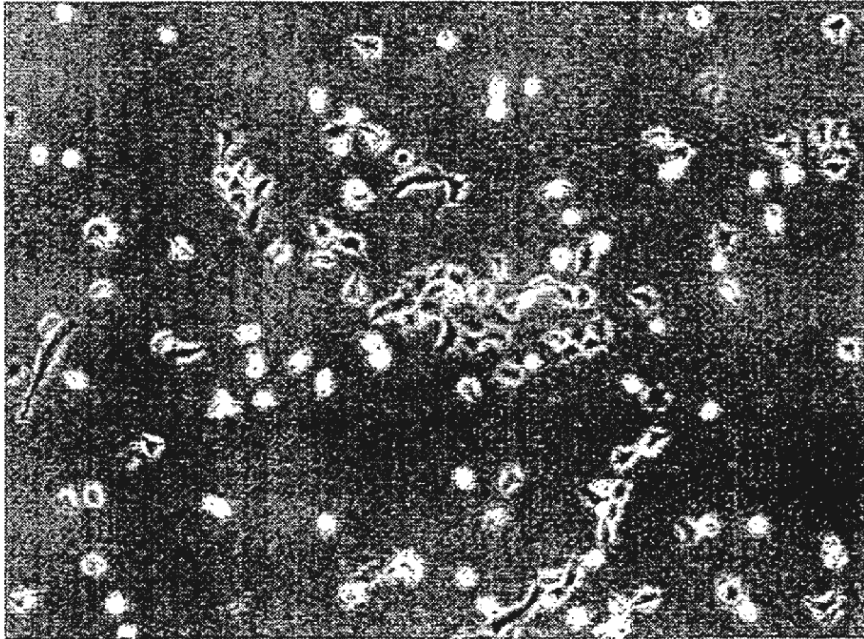
FIG. 8



*P<0,01, prueba de la t de Student, n=5

FIG. 9

A



B

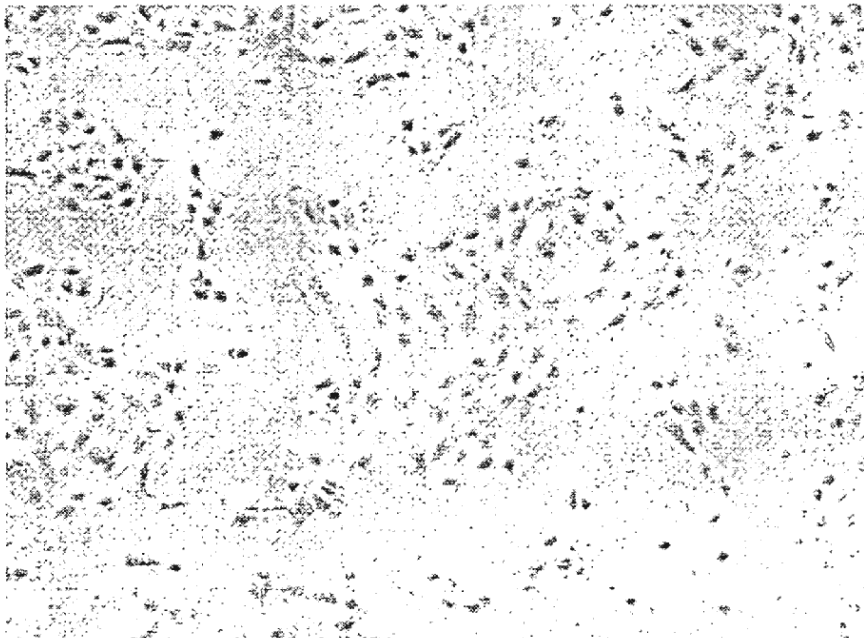
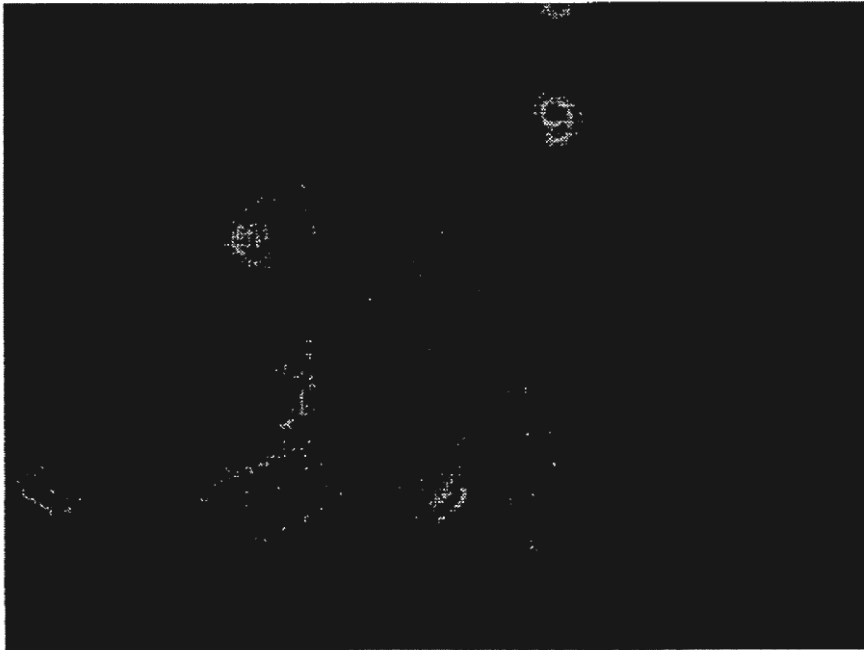


FIG. 10

A



B



FIG. 11

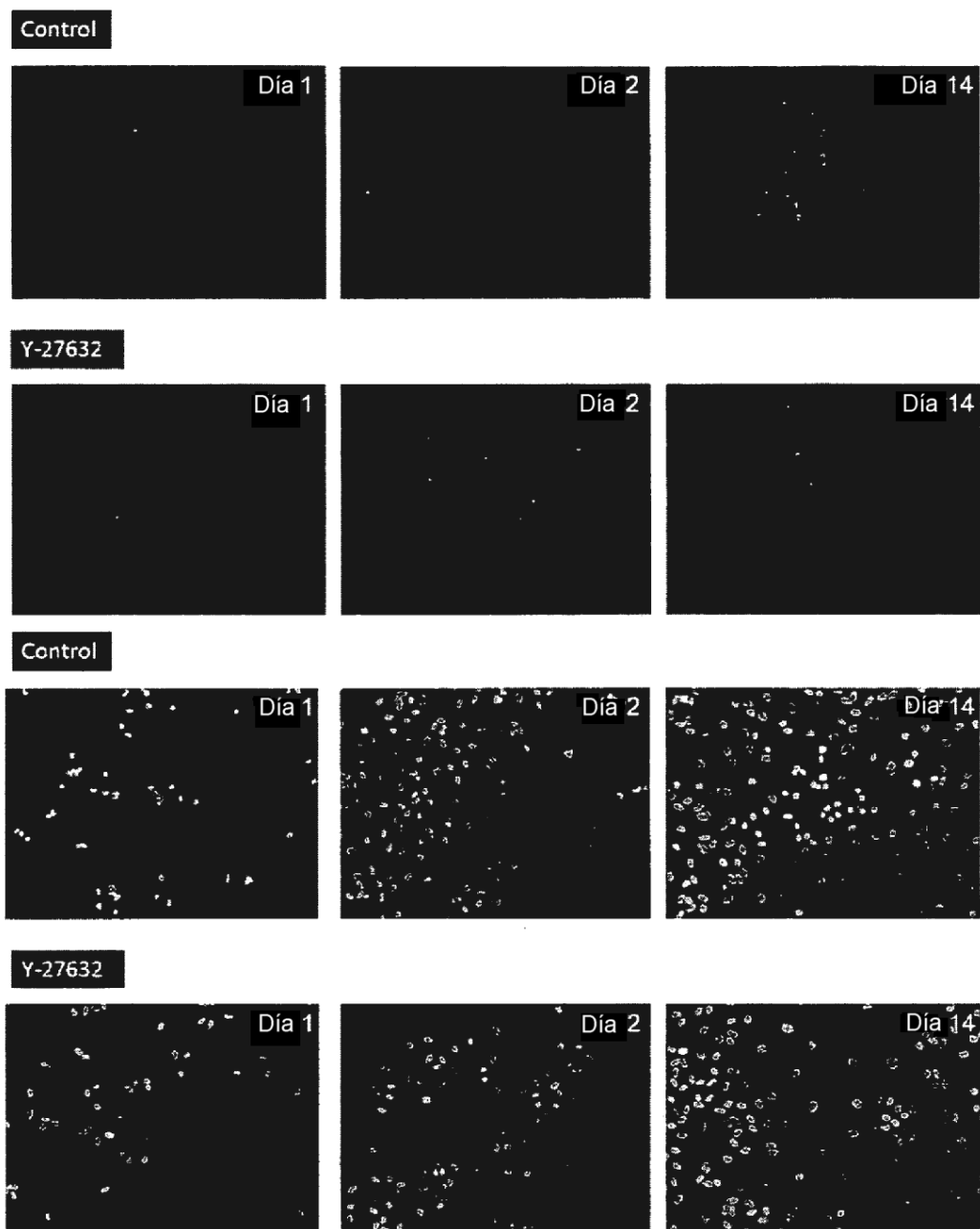


FIG. 12

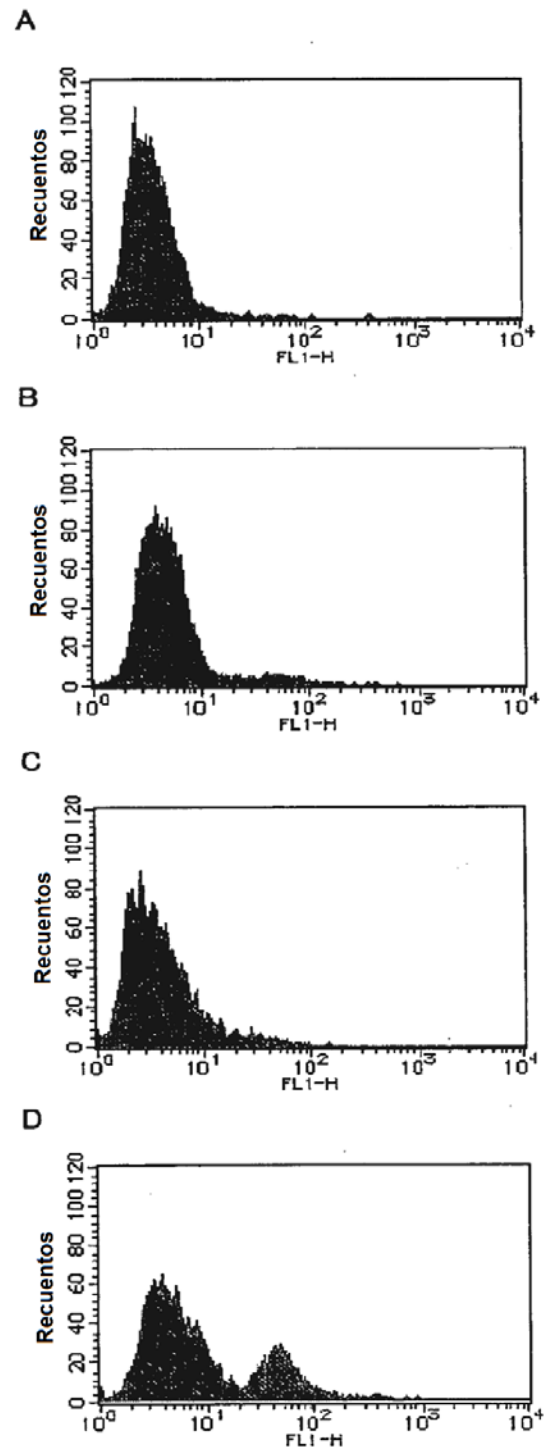


FIG. 13

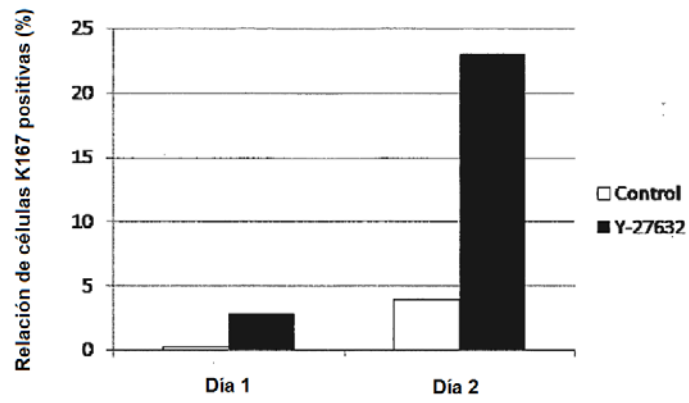


FIG. 14

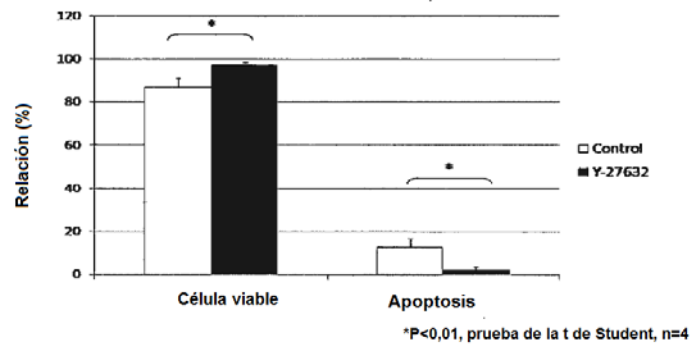


FIG. 15

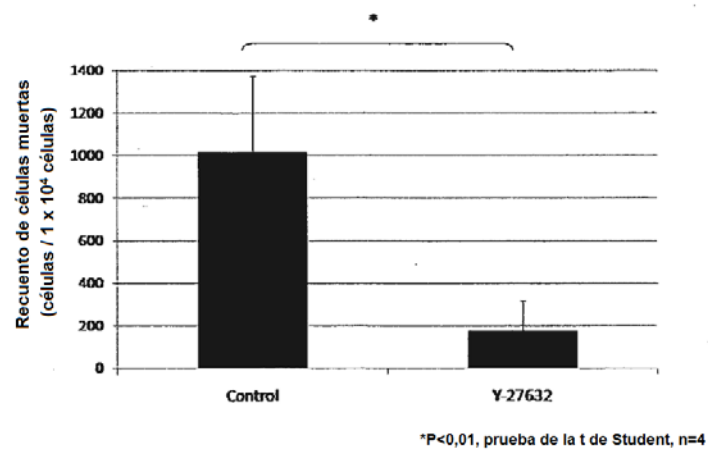


FIG. 16

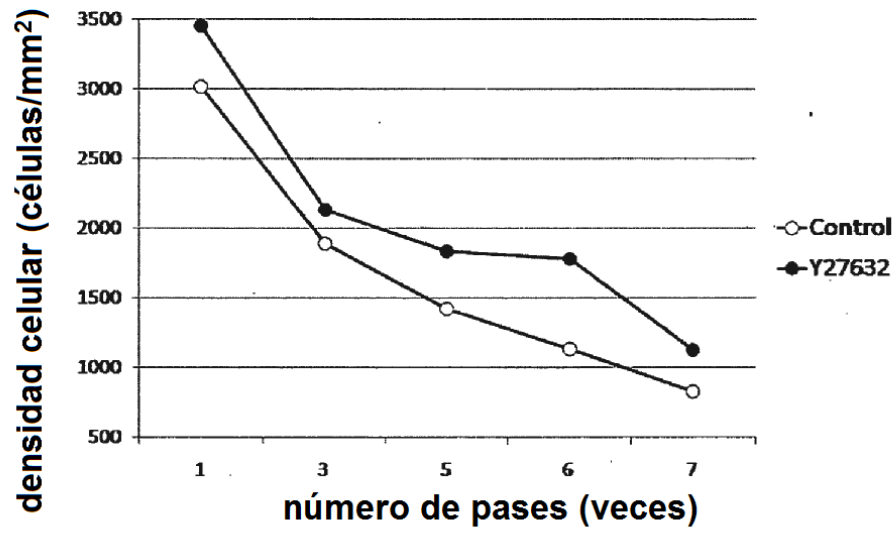
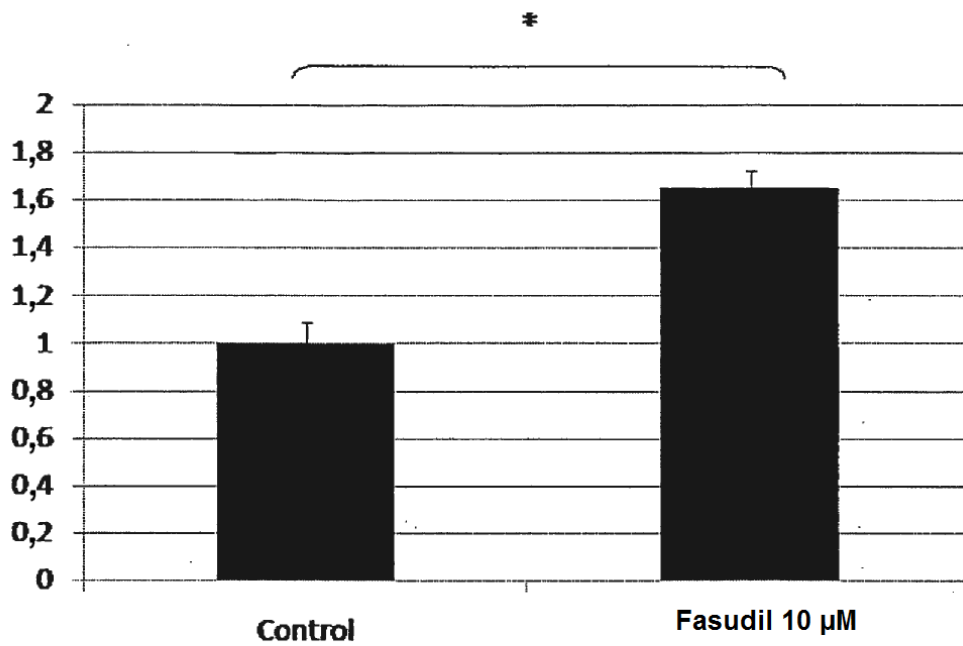


FIG. 17



*P<0,01, prueba de la t de Student