

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 638**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4418 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2018 PCT/JP2018/047749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2019 WO19131720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2018 E 18893697 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022 EP 3733177**

54 Título: **Composición para la protección de la córnea**

30 Prioridad:

27.12.2017 JP 2017251839

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

19.10.2022

73 Titular/es:

**KYOTO UNIVERSITY (33.3%)
36-1, Yoshida-honmachiSakyo-ku
Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, JP;
KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY
CORPORATION (33.3%) y
THE DOSHISHA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**IKEDA, HANAKO;
KAKIZUKA, AKIRA;
KINOSHITA, SHIGERU;
NAKAMURA, TAKAHIRO;
NAGATA, MAHO;
KOIZUMI, NORIKO y
OKUMURA, NAOKI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 925 638 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

Composición para la protección de la córnea

5 Campo técnico

La divulgación se refiere a una composición para proteger una córnea.

10 Antecedentes

La córnea es uno de los tejidos que constituyen un ojo. Las células endoteliales corneales ubicadas en la capa más interna de la córnea funcionan como una bomba y son esenciales para mantener la transparencia corneal. El endotelio corneal no tiene capacidad proliferativa y no se regenera una vez dañado. Cuando el endotelio corneal está dañado, las células endoteliales que rodean la parte dañada se expanden para cubrirla. Sin embargo, si se ha reducido demasiado el número de células, no se puede mantener la transparencia corneal y la agudeza visual se deteriora enormemente.

El endotelio corneal puede dañarse por una intervención quirúrgica intraocular tal como cirugía de cataratas o cirugía de glaucoma, hipertensión ocular rápida, inflamación, traumatismo y una enfermedad tal como la distrofia corneal endotelial de Fuchs. Si el daño progresa, es necesario compensar la disminución de las células endoteliales corneales mediante un trasplante de córnea (p. ej., queratoplastia penetrante o queratoplastia endotelial con "pelado" de Descemet). No se dispone de una terapia eficaz para regenerar las células endoteliales corneales o suprimir la disminución de las células.

Las células epiteliales corneales se renuevan a diario en virtud de las células madre presentes en el limbo corneal (límite entre la córnea y la conjuntiva). Sin embargo, una vez que las células madre se agotan debido a, por ejemplo, un traumatismo o una enfermedad inflamatoria de la conjuntiva, las células epiteliales corneales no están suficientemente abastecidas y el epitelio corneal está defectuoso. Como resultado, no se puede mantener la transparencia corneal, el epitelio de la córnea se convierte en una parte de la conjuntiva y la agudeza visual se ve afectada. Además, los trastornos del epitelio corneal suelen ir acompañados de un fuerte dolor ocular. Aunque podría emplearse un agente antiinflamatorio para suprimir la disminución de las células epiteliales corneales y de las células madre epiteliales corneales, el efecto es sólo limitado.

La córnea tiene que protegerse durante la cirugía ocular o la implantación corneal. En las intervenciones quirúrgicas oculares, actualmente se encuentran disponibles algunos productos para la irrigación ocular, que contienen glutatión para proteger las células endoteliales corneales y las células retinales. Generalmente, se utiliza una solución de conservación corneal tal como Optisol-GS para conservar una córnea donada para el trasplante de córnea, pero el efecto de conservación no dura más de unas dos semanas.

Por consiguiente, en diversas situaciones se requiere tanto la protección de córneas como el tratamiento o la prevención de enfermedades corneales.

Se sabe que ciertos derivados del ácido 4-amino-naftaleno-1-sulfónico que tienen una actividad inhibitoria de la ATPasa VCP (proteína que contiene valoresina) (Bibliografía de patentes 1) son eficaces en el tratamiento o la prevención de enfermedades oculares que afectan a los tejidos de la retina y a los nervios ópticos en un segmento posterior del ojo, tales como glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a la edad y enfermedades oculares isquémicas (Bibliografía de patentes 2-4, Bibliografía no de patentes 1 y 2). Sin embargo, no se conoce ningún efecto de los agentes sobre la córnea.

50 Referencias

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES

- [Bibliografía de patentes 1] documento WO2012/014994
- [Bibliografía de patentes 2] documento WO2012/043891
- [Bibliografía de patentes 3] documento WO2014/129495
- [Bibliografía de patentes 4] documento WO2015/129809

BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTES

- [Bibliografía no de patentes 1] Hanako Ikeda *et al.*, Sci Rep 4, 5970, 2014
- [Bibliografía no de patentes 2] Noriko Nakano *et al.*, Heliyon 2, e00096, 2016

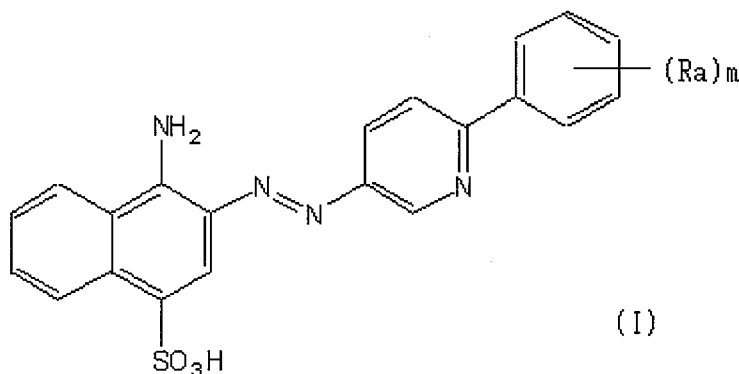
Sumario

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un objeto de la divulgación es proporcionar una composición para proteger una córnea.

5 Los inventores han encontrado que los inhibidores de VCP protegen las células endoteliales corneales y las células epiteliales corneales.

Por consiguiente, un aspecto de la divulgación proporciona una composición para proteger una córnea que comprende un compuesto de fórmula (I):



10

en donde

15 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

20 Otro aspecto de la divulgación proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea que comprende un compuesto de fórmula (I) o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

25 Otro aspecto de la divulgación proporciona una composición para la irrigación ocular que comprende un compuesto de fórmula (I) o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una composición para conservar un injerto de córnea que comprende un compuesto de fórmula (I) o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

30 De acuerdo con la divulgación, se proporciona una composición que protege una córnea. Específicamente, se proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea. Como alternativa, se proporciona una composición para la irrigación ocular o la conservación de un injerto de córnea que tiene un efecto mejorado de protección de la córnea.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 son las imágenes de contraste de fases de células endoteliales corneales de conejo cultivadas en presencia de antimicina u oligomicina, que indican que KUS121 protege las células.

40 La Fig. 2 muestra las imágenes de contraste de fases de células endoteliales corneales de conejo cultivadas en ausencia de glucosa, que indican que KUS121 protege las células.

La Fig. 3 muestra las mediciones de las concentraciones intracelulares de ATP en células endoteliales corneales de conejo cultivadas en presencia de antimicina u oligomicina o en ausencia de glucosa, que indican que se evita que la concentración intracelular de ATP disminuya en presencia de KUS121.

45 La Fig. 4 muestra las imágenes de contraste de fases que demuestran la morfología celular y la apoptosis de células endoteliales corneales humanas inmortalizadas cultivadas en presencia de taspigargina, que indican que KUS121 suprime el daño celular.

La Fig. 5 muestra los resultados del análisis de transferencia de Western de caspasa 3 escindida y PARP en células endoteliales corneales humanas inmortalizadas cultivadas en presencia de taspigargina, que indican que la apoptosis se suprime en presencia de KUS121.

50 La Fig. 6 muestra las imágenes teñidas con HE de secciones tisulares de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una a cuatro semanas, que indican que los cambios morfológicos de los tejidos de la córnea se suprimen en presencia de KUS121 o KUS187.

La Fig. 7 muestra las mediciones de los grosores corneales centrales de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una a cuatro semanas, que indican que la inflamación de la córnea se suprime en presencia de KUS121 o KUS187.

La Fig. 8 muestra las imágenes teñidas con TUNEL de secciones tisulares de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una a cuatro semanas, que indican que la apoptosis se suprime en presencia de KUS121 o KUS187. Se muestran imágenes de tres campos diferentes para cada sección.

La Fig. 9 muestra las imágenes teñidas con yodopropidio (PI) de los mismos campos que la Fig. 8.

La Fig. 10 muestra los porcentajes de células positivas para TUNEL en secciones tisulares de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una a cuatro semanas. Los porcentajes eran menores en presencia de KUS121 o KUS187 que en el grupo de control durante el período de ensayo.

La Fig. 11 muestra las imágenes teñidas con Na⁺/K⁺ ATPasa de secciones tisulares de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una a cuatro semanas, que indican que las células endoteliales corneales se mantuvieron mejor en presencia de KUS121 o KUS187 que en el grupo de control desde la semana 1.

La Fig. 12 muestra las imágenes teñidas con PI de los mismos campos que la Fig. 11.

La Fig. 13 muestra las imágenes de microscopio electrónico de transmisión de secciones tisulares de córneas de conejo conservadas en Optisol-GS durante una semana. En el control se observó vacuolización de las células epiteliales corneales, pérdida de las microvellosidades e hinchazón del estroma corneal y de las células endoteliales corneales, pero no en presencia de KUS121.

20 Descripción detallada

Cuando un valor numérico va acompañado del término "aproximadamente", el valor pretende representar cualquier valor en el intervalo de -10 % del valor a +10 % del valor. Por ejemplo, "aproximadamente 20" significa "un valor de 18 a 22". Un intervalo definido con un valor del límite inferior y un valor del límite superior abarca todos los valores desde el límite inferior hasta el límite superior, incluidos los valores de ambos límites. Cuando un intervalo va acompañado del término "aproximadamente", los dos límites se leen como acompañados del término. Por ejemplo, "de aproximadamente 20 a 30" se lee como "de 18 a 33".

A menos que se defina lo contrario, los términos utilizados en el presente documento se leen tal como se entienden generalmente por un experto en el campo técnico, tal como química orgánica, ciencias médicas, ciencias farmacéuticas, biología molecular y microbiología. Diversos términos utilizados en el presente documento se definen como se describe a continuación. Las definiciones contenidas en el presente documento prevalecen sobre el entendimiento general.

"Alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado monovalente que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos del alquilo incluyen, pero sin limitación, grupos hidrocarbilo lineales y ramificados, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, secbutilo, t-butilo, n-pentilo y neopentilo.

La expresión "sustituido" como palabra que califica el nombre de un grupo significa que uno o más átomos de hidrógeno del grupo están, de forma idéntica o diferente, reemplazados por uno o más sustituyentes definidos en el presente documento.

"Alquileno" se refiere a un grupo hidrocarbilo alifático saturado divalente que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquileno incluyen grupos hidrocarbilo de cadena lineal y ramificada.

"Alcoxi" se refiere al grupo -O-alquilo en el que el alquilo es como se define en el presente documento. Los ejemplos del alcoxi incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi y n-pentoxi.

"Ariilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 14 átomos de carbono que tiene un solo anillo (p. ej., fenilo) o múltiples anillos condensados (p. ej., naftilo o antrilo). Los grupos ariilo típicos incluyen fenilo y naftilo.

"Ariiloxi" se refiere al grupo -O-ariilo, en el que el ariilo es como se define en el presente documento. Los ejemplos del ariiloxi incluyen fenoxi y naftoxi.

"Ciano" se refiere al grupo -CN.

"Carboxilo" o "carboxi" se refiere al grupo -COOH o a una de sus sales.

"Éster carboxi" se refiere al grupo -C(O)O-alquilo en el que el alquilo es como se define en el presente documento.

"Halo" se refiere a un halógeno, especialmente flúor, cloro, bromo o yodo.

"Hidroxi" se refiere al grupo -OH.

Un sustituyente que no se define explícitamente en el presente documento se nombra describiendo primero el nombre del grupo funcional terminal del sustituyente y describiendo secuencialmente el grupo funcional adyacente hacia el punto de unión con el resto del compuesto, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquiloxicarbonilo" se refiere a (aril)-(alquil)-O-C(O)-.

Algunos compuestos de fórmula (I) tienen enantiómeros o diastereómeros, dependiendo de sus sustituyentes. Pueden ser mezclas racémicas o componentes estereoisoméricamente puros separados por un método conocido. Algunos compuestos pueden ser tautómeros.

El término "éster" se refiere a un éster que hidroliza *in vivo*, que puede descomponerse fácilmente en un cuerpo humano para dejar el compuesto original o una de sus sales. Los ésteres adecuados incluyen, por ejemplo, los derivados de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, especialmente ácidos alcanico, alquenoico, cicloalcanico y alcanodioico, en los que cada resto alquilo o alquenilo tiene, p. ej., no más de seis átomos de carbono. Los ejemplos de ésteres incluyen formiatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos y etilsuccinatos.

El término "óxido" se refiere a un óxido en donde un nitrógeno de un grupo heteroarilo se oxida para formar un N-óxido.

El término "profármaco" se refiere a un profármaco de un compuesto que es, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuado para usarlo en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar un efecto adverso indebido tal como toxicidad, irritación y respuesta alérgica, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable y eficaz para su uso previsto. Un profármaco se transforma rápidamente *in vivo*, por ejemplo por hidrólisis en sangre, para producir un compuesto original representado por la fórmula anterior. Se proporciona una discusión general en T. Higuchi y V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 del A.C.S. Symposium Series, y en Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, que se incorporan como referencia en el presente documento.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" puede ser una sal de un compuesto de fórmula (I) con un ácido inorgánico u orgánico. Las sales preferidas incluyen sales con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico; o sales con ácidos carboxílicos orgánicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico o ácido naftalenodisulfónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables también incluyen sales con bases convencionales, tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sal de sodio o potasio), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sal de calcio o magnesio), sales de amonio derivadas de amoníaco o aminas orgánicas (p. ej., dietilamina, trietilamina, etildisopropilamina, procaína, dibencilamina, N-metil morfolina, dihidroabietilamina, metilpiperidina, L-arginina, creatina, colina, L-lisina, etilendiamina, benzatina, etanolamina, meglumina o trometamina), especialmente una sal de sodio.

El término "solvato" significa un compuesto de fórmula (I) en forma de un complejo formado por coordinación con una molécula de disolvente en estado sólido o líquido. Un solvato adecuado es un hidrato.

La expresión "compuesto de fórmula (I)" a la que se hace referencia en la divulgación pretende incluir sus ésteres, óxidos, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos, a menos que sea inadecuado en el contexto.

En una realización, cada radical Ra en la fórmula (I) se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.

En una realización, cada radical Ra en la fórmula (I) se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo y alquilo.

En una realización, la fórmula (I) tiene dos radicales Ra que son halo y alquilo.

En una realización, cada radical Ra en la fórmula (I) se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo y alcoxi.

En una realización, la fórmula (I) tiene tres radicales Ra que son hidroxilo, alquilo y alcoxi.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los Compuestos 1 a 53 enumerados en la Tabla 1 a continuación:

65

[Tabla 1-1]

n.º	Nombre del compuesto
1	Ácido 4-amino-3-(6-fenilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
2	Ácido 4-amino-3-(6-p-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
3	Ácido 4-amino-3-(6-m-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
4	Ácido 4-amino-3-(6-o-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
5	Ácido 4-amino-3-(6-bifenil-2-ilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
6	Ácido 3-[6-(2-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico
7	Ácido 3-[6-(3-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico
8	Ácido 3-[6-(4-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico
9	Ácido 4-amino-3-[6-(2,4-diclorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
10	Ácido 4-amino-3-[6-(2-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
11	Ácido 4-amino-3-[6-(4-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
12	Ácido 4-amino-3-[6-(2-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
13	Ácido 4-amino-3-[6-(3-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
14	Ácido 4-amino-3-[6-(4-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
15	Ácido 4-amino-3-[6-(2-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
16	Ácido 4-amino-3-[6-(4-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
17	Ácido 4-amino-3-[6-(2-isopropoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
18	Ácido 4-amino-3-[6-(4-isopropoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
19	Ácido 4-amino-3-[6-(2-fenoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
20	Ácido 4-amino-3-[6-(3-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico

[Tabla 1-2]

21	Ácido 4-amino-3-[6-(2,3-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
22	Ácido 4-amino-3-[6-(2,5-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
23	Ácido 4-amino-3-[6-(3,5-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
24	Ácido 4-amino-3-[6-(3-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
25	Ácido 4-{4-[5-(1-amino-4-sulfonaftaleno-2-ilazo)piridin-2-il]fenil}-4-oxobutírico
26	Ácido 4-amino-3-(6-bifenil-3-ilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico
27	Ácido 4-amino-3-[6-(3-cianofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
28	Ácido 4-amino-3-[6-(4-cianofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
29	Ácido 4-amino-3-[6-(3,5-bistrifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
30	Ácido 4-amino-3-[6-(4-benzoilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
31	Ácido 4-amino-3-[6-(2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
32	Ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
33	Ácido 4-amino-3-[6-(5-fluoro-2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico

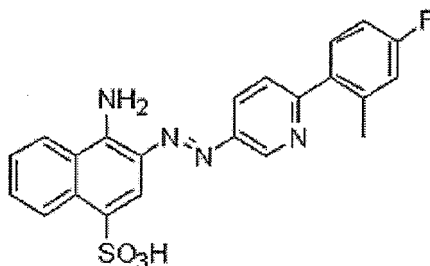
(continuación)

34	Ácido 4-amino-3-[6-(2-fluoro-6-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
35	Ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
36	Ácido 4-amino-3-[6-(5-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
37	Ácido 4-amino-3-[6-(2-fluoro-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
38	Ácido 4-amino-3-[6-(2-butoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
39	Ácido 4-amino-3-[6-(2-hexiloxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
40	Ácido 4-amino-3-[6-(4-butilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico

[Tabla 1-3]

41	Ácido 4-amino-3-[6-(2-hidroxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
42	Ácido 4-amino-3-[6-(2-(6-hidroxihexiloxi)fenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
43	Ácido 4-[2-[5-(1-amino-4-sulfonaftaleno-2-ilazo)piridin-2-il]fenoxi]butírico
44	Ácido 4-amino-3-[6-(2-(3-hidroxiopropoxi)fenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
45	Ácido 4-amino-3-[6-(2-isobutoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
46	Ácido 4-amino-3-[6-(5-cloro-2-hidroxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
47	Ácido 4-amino-3-[6-(4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
48	Ácido 4-amino-3-[6-(4'-cloro-4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
49	Ácido 4-amino-3-[6-(4,3',5'-trimetilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
50	Ácido 4-amino-3-[6-(3'-cloro-4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
51	Ácido 4-amino-3-[6-(2,6-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
52	Ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-isopropoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
53	Ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico

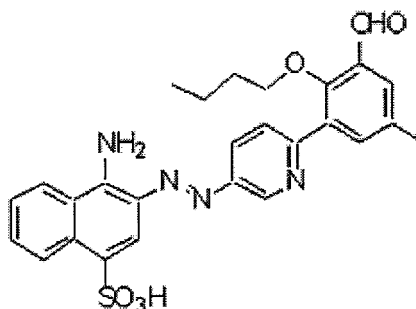
- 5 En una realización, se prefiere el ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico, que se representa por la siguiente fórmula:



- 10 o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, especialmente una sal de sodio.

En una realización, se prefiere el ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico, que se representa por la siguiente fórmula:

15



o un éster, óxido, profármaco, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, especialmente una sal de sodio.

5

Las características de los compuestos de fórmula (I), especialmente los compuestos enumerados anteriormente, y los métodos para sintetizarlos se describen en los documentos WO2012/014994, WO2012/043891, WO2014/129495 y WO2015/129809 (Bibliografía de patentes 1 a 4) en detalle.

10 Como se demuestra por los siguientes ejemplos, los compuestos de fórmula (I) protegen las células endoteliales corneales y las células epiteliales corneales y suprimen la muerte celular y, por lo tanto, pueden proteger una córnea. La expresión "proteger una córnea" o "protección corneal", como se usa en el presente documento, significa inhibir la muerte celular de las células endoteliales corneales y las células epiteliales corneales, inhibir anomalías corneales (p. ej., edema, hinchazón o turbidez) y/o inhibir la progresión de la anomalía corneal, en donde la córnea
15 es una córnea presente en el ojo del sujeto o un injerto de córnea extirpado para trasplante. El sujeto puede padecer o no una enfermedad de la córnea.

Por consiguiente, un aspecto de la divulgación proporciona una composición para proteger una córnea que comprende un compuesto de fórmula (I).

20

Un aspecto de la divulgación proporciona un método para proteger una córnea que comprende administrar un compuesto de fórmula (I) a un sujeto que lo necesite.

Un aspecto de la divulgación proporciona un método para proteger una córnea que comprende permitir que la córnea entre en contacto con un compuesto de fórmula (I).

25

Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en la protección de una córnea.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para proteger una córnea.

30

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para proteger una córnea.

En virtud del efecto de protección de la córnea, los compuestos de fórmula (I) son útiles, por ejemplo, en una
35 composición para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea, una composición para irrigación ocular o una composición para conservar un injerto de córnea.

(1) Composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea

40 La expresión "enfermedad de la córnea" se refiere a una enfermedad acompañada de una lesión, trastorno o daño en la córnea. La enfermedad de la córnea puede ser una enfermedad endotelial corneal o una enfermedad epitelial corneal. Los ejemplos de enfermedades endoteliales corneales incluyen enfermedades que afectan a las células endoteliales corneales, tales como degeneraciones endoteliales corneales (p. ej., córnea Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal y distrofia corneal
45 endotelial hereditaria congénita), enfermedades virales (p. ej., endotelitis por citomegalovirus y endotelitis herpética), síndrome de exfoliación y rechazo del injerto endotelial corneal; así como inflamación o daño físico asociado a factores externos, tales como queratouveítis, queratitis intersticial, endotelitis corneal, pérdida de células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía intraocular (p. ej., cirugía de cataratas, cirugía del vítreo, cirugía del glaucoma), lesión corneal inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso
50 prolongado de lentes de contacto, traumatismo corneal, traumatismo corneal intraparto y queratopatía bullosa. Los ejemplos de enfermedades del epitelio corneal incluyen queratitis punteada superficial, erosión corneal, úlcera corneal, ojo seco, queratoconjuntivitis sicca, úlcera marginal corneal y traumatismo corneal.

El término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa que en un sujeto que padece
55 una enfermedad de la córnea se reduce o elimina la causa de la enfermedad de la córnea, se retrasa o se detiene la

progresión de la enfermedad de la córnea y/o se reduce, alivia, mejora o elimina un síntoma de la enfermedad de la córnea.

5 El término "prevenir" o "prevención", como se usa en el presente documento, significa que en un sujeto, especialmente un sujeto que es susceptible a una enfermedad de la córnea pero que aún no se ha visto afectado por la enfermedad, se previene la aparición de la enfermedad o se disminuye la posibilidad de la aparición de la enfermedad. Los ejemplos de sujetos que son susceptibles a una enfermedad de la córnea pero que aún no se han visto afectados por la enfermedad incluyen sujetos que tienen predisposición genética a una enfermedad de la córnea, tal como distrofia corneal endotelial de Fuchs y distrofia corneal polimorfa posterior, y sujetos que tienen un factor causal de una enfermedad de la córnea. Los ejemplos de los factores causales incluyen la cirugía intraocular (p. ej., cirugía de cataratas, cirugía del vítreo, cirugía del glaucoma), trasplante de córnea, terapia con láser, aumento rápido de la presión intraocular, inflamación, traumatismos y conjuntivitis.

15 El sujeto que recibe tratamiento o prevención de una enfermedad de la córnea puede ser un animal, típicamente un mamífero (p. ej., un ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, bovino, oveja o mono), en especial un ser humano.

20 La composición farmacéutica se puede administrar de cualquier manera a través de una vía de administración generalmente conocida, por ejemplo, por administración oral, administración parenteral, inyección, infusión, administración ocular, administración en la cámara anterior o administración intravítrea. La composición puede estar en una forma farmacéutica adecuada para cada vía de administración.

25 Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen gránulos, gránulos finos, polvos, comprimidos recubiertos, comprimidos, supositorios, polvos finos, cápsulas, microcápsulas, comprimidos masticables, líquidos, suspensiones y emulsiones. Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección pueden ser formas farmacéuticas habituales, p. ej., aquellas que son aptas para inyección intravenosa, infusión, inyección intraocular o liberación prolongada de un principio activo. Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración ocular incluyen líquidos, suspensiones y emulsiones.

30 Dichas formas farmacéuticas se pueden fabricar formulando un principio activo mediante un método convencional. Si es necesario para la formulación, se puede añadir uno cualquiera de diversos excipientes farmacéuticamente aceptables. Puede usarse cualquier excipiente de acuerdo con la forma farmacéutica empleada. Los ejemplos de los excipientes incluyen agentes tamponantes, tensioactivos, estabilizantes, conservantes, cargas, diluyentes, aditivos, disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, lubricantes, agentes lubricantes, agentes aromatizantes, edulcorantes y solubilizantes.

40 En una realización, la composición farmacéutica es un colirio. Típicamente, los colirios se pueden preparar usando un agente isotonzante tal como cloruro de sodio o glicerina concentrada; un agente tamponante tal como fosfato de sodio o acetato de sodio; un tensioactivo tal como monooleato de sorbitán, estearato de polioxilo 40 o aceite de ricino endurecido con polioxietileno; un estabilizante tal como citrato de sodio o edetato de sodio; y un conservante tal como cloruro de benzalconio o parabeno, pero los componentes de los colirios no se limitan a estos. Los colirios pueden tener un pH en un intervalo aceptado para formulaciones oftálmicas, por ejemplo, dentro del intervalo de pH de 4 a 8.

45 La composición farmacéutica puede ser una solución de irrigación ocular o una composición para añadir a una solución de irrigación ocular. La composición farmacéutica puede ser una solución de conservación de la córnea o una composición para añadir a una solución de conservación de la córnea. Los detalles son como se describe más adelante.

50 La posología y el número de dosis de la composición farmacéutica pueden establecerse adecuadamente por los expertos en la materia de modo que se administre al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), basándose en factores tales como la especie animal del sujeto, el estado de salud del sujeto, la edad, el peso, la vía de administración y la forma farmacéutica. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente una cantidad eficaz en una situación dada mediante experimentación de rutina dentro del rango de la habilidad y determinación ordinarias de los médicos. Por ejemplo, para la administración sistémica, se puede administrar un compuesto de fórmula (I) en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 a 300 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal/día o de aproximadamente 1,0 a 30 mg/kg de peso corporal/día. Por ejemplo, un compuesto de fórmula (I) puede administrarse por administración local en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 100 µg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,1 a 10 µg/kg de peso corporal/día o de aproximadamente 0,3 a 3 µg/kg de peso corporal/día. Un compuesto de fórmula (I) se puede administrar una vez al día o más, por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día.

65 Un compuesto de fórmula (I) puede usarse solo o en combinación con al menos otro principio activo, especialmente un principio activo para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender al menos un principio activo además de un compuesto de fórmula (I).

- 5 Cuando algunos ingredientes se usan "en combinación", se puede administrar una forma farmacéutica que contenga todos los ingredientes, o se puede administrar una combinación de formas farmacéuticas que contengan los ingredientes por separado. Todos los ingredientes pueden administrarse simultáneamente, o cualquier ingrediente puede administrarse en un momento posterior, siempre que los ingredientes se utilicen para prevenir y/o tratar una enfermedad de la córnea. Pueden usarse dos o más principios activos adicionales en combinación con un compuesto de fórmula (I). Los ejemplos de los principios activos adecuados para usar en combinación incluyen agentes antiinflamatorios, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes inmunosupresores y agentes antivirales.
- 10 Una terapia oftálmica distinta de la terapia con medicamentos se puede combinar con el tratamiento o prevención de una enfermedad de la córnea con un compuesto de fórmula (I). Los ejemplos de las terapias adecuadas incluyen cirugía, terapia fotodinámica, terapia génica, terapia regenerativa, implante de córnea y terapia con láser.
- 15 Un aspecto de la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea que comprende administrar un compuesto de fórmula (I) a un sujeto que lo necesite.
- Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad de la córnea.
- 20 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea.
- Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea.
- 25 (2) Composición para irrigación ocular
- La cirugía ocular, tal como la cirugía de cataratas, la cirugía vítrea o la cirugía de glaucoma, puede causar una enfermedad de la córnea tal como edema corneal o turbidez corneal. La adición de un compuesto de fórmula (I) a una solución de irrigación ocular, que se suele utilizar en la cirugía ocular para la irrigación y el lavado ocular, puede proteger la córnea y prevenir una enfermedad de la córnea.
- 30 La composición para irrigación ocular puede presentarse en forma sólida, semisólida o líquida. La composición se puede proporcionar como una solución de irrigación ocular lista para usar o una composición para añadir a una solución de irrigación ocular. Cuando la composición se proporciona como una solución de irrigación ocular, otros componentes contenidos en la composición pueden ser equivalentes a los de las soluciones de irrigación ocular existentes y, preferentemente, componentes similares a los del humor acuoso, y pueden contener un componente adicional tal como glutatión, p. ej., oxiglutatión y un antibiótico. Los ejemplos de las soluciones de irrigación ocular existentes incluyen, pero sin limitación, solución salina fisiológica, solución de Ringer lactato, BSS PLUS (nombre comercial), Opeguard (nombre comercial) y solución de irrigación ocular de oxiglutatión (nombre comercial). Cuando la composición se proporciona como una composición para añadir a una solución de irrigación ocular, la composición puede contener cualquier componente, a menos que perjudique la función y seguridad de la solución de irrigación ocular.
- 35 La composición para irrigación ocular puede contener cualquier cantidad de un compuesto de fórmula (I) siempre que el compuesto esté presente en una concentración eficaz cuando la composición se use para irrigación ocular. La concentración eficaz del compuesto de fórmula (I) en uso para irrigación ocular puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 μM a 10 mM, de 1 μM a 1 mM, de 2 μM a 200 μM , de 5 μM a 100 μM o de 10 μM a 100 μM .
- 40 Un aspecto de la divulgación proporciona un método para realizar la irrigación ocular en un sujeto que se somete a una cirugía ocular que comprende el uso de una solución de irrigación ocular que comprende un compuesto de fórmula (I).
- 45 Un aspecto de la divulgación proporciona un método para proteger una córnea que comprende realizar una irrigación ocular en un sujeto que se somete a una cirugía ocular con una solución de irrigación ocular que comprende un compuesto de fórmula (I).
- 50 Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en irrigación ocular.
- 55 Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en la protección de la córnea en la irrigación ocular.
- 60 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para irrigación ocular.
- 65 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para proteger la córnea en la irrigación ocular.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para irrigación ocular.

- 5 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para proteger la córnea en la irrigación ocular.

(3) Composición para conservar de un injerto de córnea

- 10 En el trasplante de córnea, una córnea donada por un donante de córnea debe conservarse hasta la cirugía de trasplante. La adición de un compuesto de fórmula (I) a una solución de conservación de la córnea puede proteger y conservar una córnea en mejores condiciones.

- 15 La composición para conservar un injerto de córnea puede presentarse en forma sólida, semisólida o líquida. La composición se puede proporcionar como una solución de conservación de la córnea lista para usar o una composición para añadir a una solución de conservación de la córnea. Cuando la composición se proporciona como una solución de conservación de la córnea, otros componentes contenidos en la composición pueden ser equivalentes a los de soluciones de conservación de la córnea ya existentes. Los ejemplos de tales componentes incluyen medios basales, agentes tamponantes, sulfato de condroitina, dextrano, vitaminas, precursores de ATP y antibióticos. Los ejemplos de las soluciones de conservación de la córnea ya existentes incluyen, pero sin limitación, medio M199, medio MEM α , medio MK, medio CSM, medio CSMD, medio DMEM/F-12, Optisol-GS (nombre comercial), K-Sol (nombre comercial) y EP2 (nombre comercial). Cuando la composición se proporciona en forma de una composición para añadir a una solución de conservación de la córnea, la composición puede contener cualquier componente siempre que no perjudique la función y la seguridad de la solución de conservación de la córnea.

- 25 La composición para conservar un injerto de córnea puede contener cualquier cantidad de un compuesto de fórmula (I) siempre que el compuesto esté presente en una concentración eficaz cuando la composición se utilice para conservar un injerto de córnea. La concentración eficaz del compuesto de fórmula (I) en uso para conservar un injerto de córnea puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 μ M a 10 mM, de 1 μ M a 1 mM, de 2 μ M a 200 μ M, de 5 μ M a 100 μ M o de 10 μ M a 100 μ M.

Un aspecto de la divulgación proporciona un método para conservar un injerto de córnea que comprende conservar un injerto de córnea en una solución de conservación corneal que comprende un compuesto de fórmula (I).

- 35 Un aspecto de la divulgación proporciona un método para proteger un injerto de córnea que comprende conservar el injerto de córnea en una solución de conservación corneal que comprende un compuesto de fórmula (I).

Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en la conservación de un injerto de córnea.

- 40 Un aspecto de la divulgación proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en la protección de una córnea en la conservación de un injerto de córnea.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para conservar un injerto de córnea.

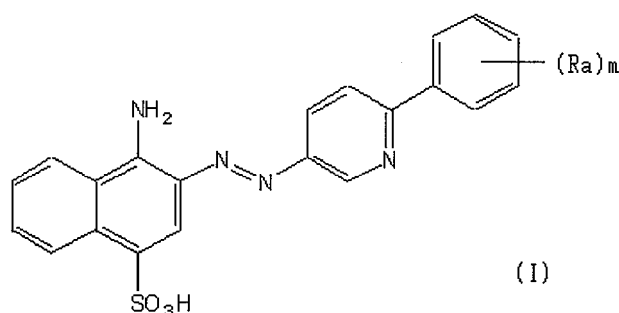
- 45 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para proteger la córnea en la conservación de un injerto de córnea.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para conservar un injerto de córnea.

- 50 Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) para fabricar una composición para proteger una córnea en la conservación de un injerto de córnea.

Por ejemplo, la divulgación proporciona las siguientes realizaciones.

- 55 [1] Una composición para proteger una córnea, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde

- 5 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxilo éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.
- 10 [2] La composición de acuerdo con el punto 1, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.
- [3] La composición de acuerdo con el punto 1 o 2, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo y alquilo.
- 15 [4] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en donde la fórmula (I) tiene dos radicales Ra que son halo y alquilo.
- [5] La composición de acuerdo con el punto 1 o 2, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo y alcoxi.
- 20 [6] La composición de acuerdo con el punto 1, 2 o 5, en donde la fórmula (I) tiene tres radicales Ra que son hidroxilo, alquilo y alcoxi.
- [7] La composición de acuerdo con el punto 1, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los compuestos enumerados en la Tabla 1.
- [8] La composición de acuerdo con el punto 1, 2 o 7, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico o ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
- 25 [9] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4, 7 y 8, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
- [10] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4 y 7 a 9, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
- 30 [11] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1, 2 y 5 a 8, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
- [12] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1, 2, 5 a 8 y 11, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
- [13] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [12], en donde la composición es para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea.
- 35 [14] La composición de acuerdo con el punto 13, en donde la enfermedad de la córnea es una enfermedad endotelial corneal.
- [15] La composición de acuerdo con el punto 14, en donde la enfermedad endotelial corneal es córnea Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, endotelitis por citomegalovirus, endotelitis herpética, síndrome de exfoliación, rechazo del injerto endotelial corneal, queratouveítis, queratitis intersticial, endotelitis corneal, pérdida de células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía intraocular, lesión corneal inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso prolongado de lentes de contacto, traumatismo corneal, traumatismo corneal intraparto o queratopatía bullosa.
- 40 [16] La composición de acuerdo con el punto 14 o 15, en donde la enfermedad endotelial corneal es distrofia corneal endotelial de Fuchs o queratopatía bullosa.
- [17] La composición de acuerdo con el punto 13, en donde la enfermedad de la córnea es una enfermedad epitelial corneal.
- 50 [18] La composición de acuerdo con el punto 17, en donde la enfermedad epitelial corneal es queratitis punteada superficial, erosión corneal, úlcera corneal, ojo seco, queratoconjuntivitis sicca, úlcera marginal corneal o traumatismo corneal.
- [19] La composición de acuerdo con el punto 13, en donde la enfermedad de la córnea es córnea Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, endotelitis por citomegalovirus, endotelitis herpética, síndrome de exfoliación, rechazo del injerto endotelial corneal, queratouveítis, queratitis intersticial, endotelitis corneal,
- 55

pérdida de células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía intraocular, lesión corneal inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso prolongado de lentes de contacto, traumatismo corneal, traumatismo corneal intraparto, queratopatía bullosa, queratitis punteada superficial, erosión corneal, ojo seco, queratoconjuntivitis sicca o úlcera marginal corneal.

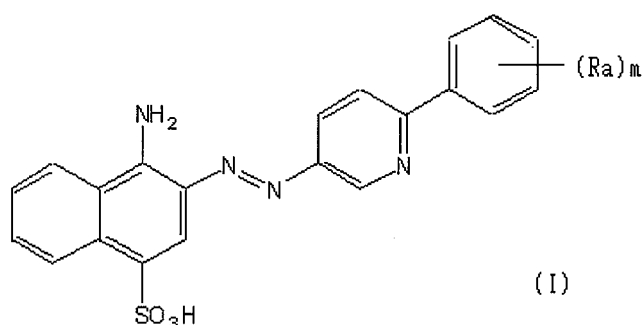
[20] La composición de acuerdo con el punto 13 o 19, en donde la enfermedad de la córnea es distrofia corneal endotelial de Fuchs, queratopatía bullosa, erosión corneal, ojo seco o traumatismo corneal.

[21] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [20], en donde la composición es un colirio.

[22] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [20], en donde la composición es una solución de irrigación ocular o una composición para añadir a una solución de irrigación ocular.

[23] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [20], en donde la composición es una solución para conservar un injerto de córnea o una composición para añadir a una solución para conservar un injerto de córnea.

[24] Una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde

Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y

m es un número entero seleccionado de 0 a 4,

o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

[25] La composición de acuerdo con el punto 24, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.

[26] La composición de acuerdo con el punto 24 o 25, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo y alquilo.

[27] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [26], en donde la fórmula (I) tiene dos radicales Ra que son halo y alquilo.

[28] La composición de acuerdo con el punto 24 o 25, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[29] La composición de acuerdo con el punto 24, 25 o 28, en donde la fórmula (I) tiene tres radicales Ra que son hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[30] La composición de acuerdo con el punto 24, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los compuestos enumerados en la Tabla 1.

[31] La composición de acuerdo con el punto 24, 25 o 30, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico o ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[32] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24 a 27, 30 y 31, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[33] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24 a 27 y 30 a 32, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[34] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24, 25 y 28 a 31, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[35] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24, 25, 28 a 31 y 34, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[36] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [35], en donde la enfermedad de la córnea es una enfermedad endotelial corneal.

[37] La composición de acuerdo con el punto 36, en donde la enfermedad endotelial corneal es córnea Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, endotelitis por citomegalovirus, endotelitis herpética, síndrome

de exfoliación, rechazo del injerto endotelial corneal, queratouveítis, queratitis intersticial, lesión corneal tras cirugía de cataratas, pérdida de células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía de retina, lesión corneal tras cirugía del vítreo, lesión corneal tras cirugía de glaucoma, lesión corneal inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso prolongado de lentes de contacto,

traumatismo corneal, traumatismo corneal intraparto o queratopatía bullosa.

[38] La composición de acuerdo con el punto 36 o 37, en donde la enfermedad endotelial corneal es distrofia corneal endotelial de Fuchs o queratopatía bullosa.

[39] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [35], en donde la enfermedad de la córnea es una enfermedad epitelial corneal.

[40] La composición de acuerdo con el punto 39, en donde la enfermedad epitelial corneal es erosión corneal, ojo seco o traumatismo corneal.

[41] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [35], en donde la enfermedad de la córnea es córnea Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal, distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, endotelitis por citomegalovirus, endotelitis herpética, síndrome de exfoliación, rechazo del injerto endotelial corneal, queratouveítis, queratitis intersticial, lesión corneal tras cirugía de cataratas, pérdida de células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía de retina, lesión corneal tras cirugía del vítreo, lesión corneal tras cirugía de glaucoma, lesión corneal inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso prolongado de lentes de contacto, traumatismo corneal, traumatismo corneal intraparto, queratopatía bullosa, erosión corneal u ojo seco.

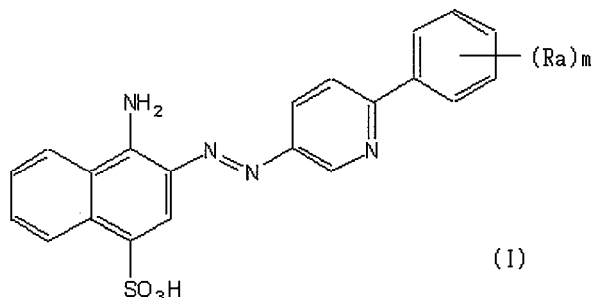
[42] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24 a 35 y 41, en donde la enfermedad de la córnea es distrofia corneal endotelial de Fuchs, queratopatía bullosa, erosión corneal, ojo seco o traumatismo corneal.

[43] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [42], en donde la composición es un colirio.

[44] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [42], en donde la composición es una solución de irrigación ocular o una composición para añadir a una solución de irrigación ocular.

[45] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [24] a [42], en donde la composición es una solución para conservar un injerto de córnea o una composición para añadir a una solución para conservar un injerto de córnea.

[46] Una composición para irrigación ocular, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde

Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, ariloxi, ariloxi sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y

m es un número entero seleccionado de 0 a 4,

o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

[47] La composición de acuerdo con el punto 46, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.

[48] La composición de acuerdo con el punto 46 o 47, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo y alquilo.

[49] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [46] a [48], en donde la fórmula (I) tiene dos radicales Ra que son halo y alquilo.

[50] La composición de acuerdo con el punto 46 o 47, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[51] La composición de acuerdo con el punto 46, 47 o 50, en donde la fórmula (I) tiene tres radicales Ra que son hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[52] La composición de acuerdo con el punto 46, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los compuestos enumerados en la Tabla 1.

[53] La composición de acuerdo con el punto 46, 47 o 52, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazol]naftaleno-1-sulfónico o ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-

metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[54] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 46 a 49, 52 y 53, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[55] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 46 a 49 y 52 a 54, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

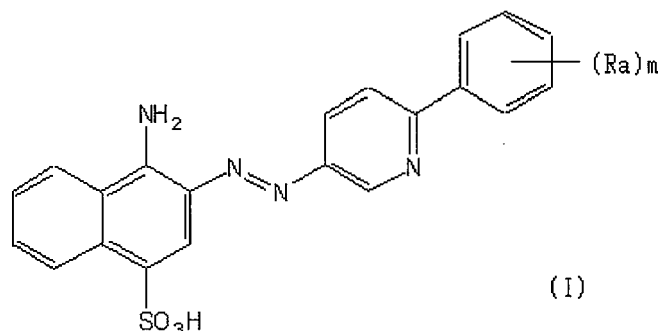
[56] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 46, 47 y 50 a 53, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[57] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 46, 47, 50 a 53 y 56, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[58] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [46] a [57], en donde la composición es una solución de irrigación ocular.

[59] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [46] a [57], en donde la composición es una composición para añadir a una solución de irrigación ocular.

[60] Una composición para conservar un injerto de córnea, que comprende un compuesto de fórmula (I):



en donde

Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxilo éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

[61] La composición de acuerdo con el punto 60, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.

[62] La composición de acuerdo con el punto 60 o 61, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo y alquilo.

[63] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [60] a [62], en donde la fórmula (I) tiene dos radicales Ra que son halo y alquilo.

[64] La composición de acuerdo con el punto 60 o 61, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[65] La composición de acuerdo con el punto 60, 61 o 64, en donde la fórmula (I) tiene tres radicales Ra que son hidroxilo, alquilo y alcoxi.

[66] La composición de acuerdo con el punto 60, en donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de los compuestos enumerados en la Tabla 1.

[67] La composición de acuerdo con el punto 60, 61 o 66, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico o ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[68] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 60 a 63, 66 y 67, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[69] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 60 a 63 y 66 a 68, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[70] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 60, 61 y 64 a 67, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[71] La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 60, 61, 64 a 67 y 70, que comprende sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.

[72] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [60] a [71], en donde la composición es una solución para conservar un injerto de córnea.

[73] La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [60] a [71], en donde la composición es una composición que se añade a una solución para conservar un injerto de córnea.

Ejemplos

En los ejemplos de ensayo, se emplearon los siguientes compuestos.

- 5 KUS121: Sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
 KUS187: Sal de sodio del ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico
 Se prepararon KUS121 y KUS187 mediante el método divulgado en el documento WO2012/014994.

Ensayo 1: Efectos de los compuestos en células endoteliales corneales de conejo cultivadas

- 10 Se cortaron globos oculares enteros de conejos blancos japoneses (Funakoshi Corporation) a lo largo del limbo corneal con una cuchilla de afeitar y se aislaron las córneas. Las células endoteliales corneales se rasparon mecánicamente y se recogieron con un cuchillito crescent. Los cultivos primarios se prepararon en un DMEM con suero bovino fetal al 10 % y 2 ng/ml de bFGF. Las células subconfluentes se trataron con tripsina y se recogieron, después se distribuyeron en placas de 12 pocillos a la misma densidad de 4×10^4 células/pocillo y se cultivaron en el mismo medio durante 24 horas. Las células se cultivaron posteriormente en las siguientes ocho condiciones diferentes: (1) control (el medio + DMSO), (2) el medio + KUS121 (50 μ M), (3) el medio + antimicina (20 μ M), (4) el medio + antimicina (20 μ M) + KUS121 (50 μ M), (5) el medio + oligomicina (10 μ M), (6) el medio + oligomicina (10 μ M) + KUS121 (50 μ M), (7) DMEM con 2 ng/ml de bFGF (sin glucosa); y (8) DMEM con 2 ng/ml de bFGF (sin glucosa) + KUS121 (50 μ M).

- 20 (1) Morfología celular

Después de la adición de los agentes, se obtuvieron imágenes de contraste de fases secuenciales de las células endoteliales corneales cultivadas.

- 25 La Fig. 1 muestra las imágenes de contraste de fases 28 horas después de la adición de los agentes. El tratamiento con antimicina u oligomicina causó la muerte de las células endoteliales corneales, pero la muerte celular se suprimió en presencia de KUS121 (50 μ M). La Fig. 2 muestra las imágenes de contraste de fases de las células cultivadas sin glucosa 96 horas después de la adición de los agentes. La privación de glucosa provocó la muerte de las células endoteliales corneales, pero la muerte celular se suprimió en presencia de KUS121 (50 μ M).

(2) Concentración intracelular de ATP

- 35 Las células endoteliales corneales cultivadas en presencia de los agentes ($P = 1$) se lavaron con PBS(-), se trataron con tripsina, se suspendieron en el medio (DMEM con suero bovino fetal al 10 % y 2 ng/ml de bFGF) y se contaron. Después, se centrifugaron $2,5 \times 10^4$ células, se suspendieron en PBS(-) y se dispensaron en 5 pocillos de una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo. Las células se sometieron a un ensayo de luciferasa (reactivo de ensayo ATP "Cell", TOYO B-Net CO., LTD.). Las intensidades de fluorescencia se midieron como concentraciones relativas intracelulares de ATP utilizando un luminómetro.

- 40 La Fig. 3 muestra las mediciones de las concentraciones intracelulares de ATP. Las concentraciones intracelulares de ATP disminuyeron en las células tratadas con antimicina u oligomicina durante 27 horas y en las células cultivadas en ausencia de glucosa durante 96 horas, pero la disminución se suprimió en presencia de KUS121.

Ensayo 2: Efectos de los compuestos en células endoteliales corneales humanas de córneas de donantes sanos

- 50 Se importaron córneas para investigación, de SightLife™ (Seattle, WA). Las células endoteliales corneales se extrajeron de las córneas con membranas de Descemet y se sumergieron en una solución de conservación corneal (Optisol-GS, Bausch & Lomb Incorporated). Las células endoteliales corneales se trataron con colagenasa y se recogieron. Las células se cultivaron en un medio acondicionado que se preparó cultivando células 3T3 en OptiMEM (Gibco, 3195070) con suero bovino fetal (FBS) al 10 % durante 24 horas y añadiendo después SB203580 10 μ M (Funakoshi, 13067) y SB431542 1 μ M (Wako, 192-16541) al medio de cultivo.

- 55 Las células endoteliales corneales se immortalizaron mediante los siguientes procedimientos. Los genes del antígeno T grande de SV40 y hTERT se amplificaron por PCR y se introdujeron en un vector lentiviral (pLenti6.3-V5-TOPO; Life Technologies Inc.). El vector lentiviral y tres plásmidos auxiliares (pLP1, pLP2, pLP/VSFG; Life Technologies Inc.) se transfectoron en células 293T (RCB2202; Riken Bioresource Center, Ibaraki, Japón) con un reactivo de transfección (Fugene HD; Promega Corp., Madison, WI). El sobrenadante del cultivo que contenía el virus se recogió 48 horas después de la transfección y se añadió al medio de cultivo de las células endoteliales corneales con 5 pg/ml de Polybrene, de este modo se introdujeron en las células los genes del antígeno T grande de SV40 y hTERT. Se observó la línea celular immortalizada establecida de las células endoteliales corneales normales (iHCEC) por microscopía de contraste de fases. Las células tenían una morfología de una monocapa de células poligonales como las células endoteliales corneales normales. Las iHCEC se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + suero bovino fetal (FBS) al 10 %.

- 65 El medio de cultivo se eliminó de las células endoteliales corneales humanas immortalizadas cultivadas, las células

se lavaron dos veces con 1 x PBS(-) calentado a 37 °C. Después, se añadió 1 x PBS(-) y las células se incubaron a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 3 minutos. Después de la eliminación del PBS (-), se añadieron EDTA-tripsina al 0,05 % (NACALAI TESQUE, INC. 322778-34) y las células se incubaron a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 5 minutos. Las células se suspendieron en el siguiente medio y se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos.

5 Medio: DMEM (NACALAI TESQUE, INC. 08456-36) + 10 % de FBS (Biowest, S1820-500) + 1 % de P/S (NACALAI TESQUE, INC., 26252-94)

10 Las células endoteliales corneales humanas inmortalizadas (lote: iHCEC1-1) se distribuyeron en placas de 12 pocillos a una densidad de 7×10^4 células/pocillo y se cultivaron a 37 °C (CO₂ al 5 %) durante 24 horas.
Medio: DMEM + 10 % de FBS + 1 % de P/S

15 El medio se cambió al medio que contenía KUS121 (10 µM, 25 µM, 50 µM o 100 µM) y las células se cultivaron durante 24 horas.
Medio: DMEM + 10 % de FBS + 1 % de P/S

20 El medio se cambió al medio que contenía taspigargina 10 µM (WAKO, 209-17281) y KUS121 (10 µM, 25 µM, 50 µM o 100 µM) y las células se cultivaron durante 8 horas.
Medio: DMEM + 10 % de FBS + 1 % de P/S

25 Ocho horas después de añadir taspigargina, se observaron la morfología celular y la apoptosis por microscopía de contraste de fases. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Cuando las células endoteliales corneales humanas inmortalizadas se trataron con taspigargina (TG) en ausencia de KUS121, se observó deformación de las células, lo que indica daño celular. En los grupos celulares cultivados en presencia de KUS121, se suprimió la deformación. Los resultados sugieren que KUS121 disminuye el daño celular causado por la taspigargina.

Después de la observación de la morfología, se realizó un análisis de transferencia de Western mediante los siguientes procedimientos.

30 Los medios de cada pocillo se recogieron en hielo, las células se lavaron dos veces con 1 x PBS(-) y los lavados se recogieron. Para recolectar células suspendidas y células muertas, los medios y los lavados recogidos se centrifugaron a 4 °C, 800 g, durante 12 minutos, los sobrenadantes se desecharon y se obtuvieron los sedimentos. Se añadieron tampones de extracción de proteínas (RIPA; Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0,1 %, DOC al 0,5 %, NP-40 al 1 %) a las células lavadas en hielo. Las células se suspendieron junto con los sedimentos de las células suspendidas y las células muertas. Las suspensiones recolectadas se sonicaron tres veces durante 30 segundos en agua fría con un sonicador (BIORUPTOR, TOSHO DENKI) y se centrifugaron a 4 °C, 15000 rpm durante 10 minutos para recoger los sobrenadantes que contenían proteínas.

40 Los extractos de proteínas (7 µg cada uno) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios; anticuerpo anti-caspasa 3 de conejo (Cell Signaling, 9662), anticuerpo anti-PARP de conejo (Cell Signaling, 9542) y anticuerpo anti-GAPDH de ratón (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., M171-3). Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón marcados con peroxidasa (GE Healthcare Biosciences, NA931V, NA934V). Los anticuerpos primarios, anti-caspasa 3 de conejo, anticuerpo anti-PARP de conejo y anticuerpo anti-GAPDH de ratón, se diluyeron a 1:1000, 1:1000 y 1:3000, respectivamente. Los anticuerpos secundarios se diluyeron a 1:5000. Las señales se detectaron por Chemi Lumi ONE Ultra (NACALAI TESQUE, INC., 11644-40). Las intensidades de las bandas detectadas se analizaron mediante el analizador de imágenes luminiscentes LAS-4000 mini (Fujifilm Corporation) y el software Image-Quant™ (GE Healthcare).

50 Los resultados se muestran en la Fig. 5. Cuando las células endoteliales corneales humanas inmortalizadas se trataron con taspigargina en ausencia de KUS121, se detectó una banda de caspasa 3 escindida (aproximadamente 17 kDa), la forma activa de caspasa 3. Por otro lado, la caspasa 3 escindida apenas se detecta en presencia de KUS121. Por lo tanto, el análisis de transferencia de Western reveló que KUS121 suprime la activación de caspasa inducida por taspigargina. Los resultados sugieren que KUS121 suprime el daño celular debido al estrés del RE inducido por taspigargina.

Ensayo 3: Efectos de los compuestos en córneas de conejo

60 Se sacrificaron conejos blancos japoneses, se extirparon globos oculares enteros y se prepararon preparaciones esclerocorneales utilizando una cuchilla de afeitar. Cada una de cuatro preparaciones esclerocorneales se conservó en las siguientes soluciones de conservación a 4 °C durante 4 semanas; (1) Optisol-GS (control), (2) Optisol-GS + KUS121 (50 µM), o (3) Optisol-GS + KUS187 (20 µM). Los tejidos se incrustaron y seccionaron secuencialmente.

(1) Hallazgos microscópicos y grosor corneal central

65 Las secciones tisulares se tiñeron con tinción HE y se observaron al microscopio. Se compararon las imágenes a lo

largo del tiempo entre las condiciones de conservación (Fig. 6). Se obtuvieron imágenes microscópicas de las secciones que incluían las partes centrales de las córneas y los grosores corneales centrales se midieron y se compararon a lo largo del tiempo entre las condiciones de conservación (Fig. 7). En las córneas conservadas en Optisol-GS (control), las células endoteliales corneales se hincharon en la semana 1 y el estroma corneal se hinchó en la semana 3. En presencia de KUS121 o KUS187, la inflamación de las células se suprimió hasta la semana 2 y la inflamación del estroma corneal se mantuvo leve hasta la semana 4. Los epitelios corneales y los grosores de la córnea se mantuvieron mejor en los grupos KUS121 y KUS187 que en el grupo de control, especialmente en la semana 3 o después. Los resultados sugieren que KUS121 y KUS187 protegen las células epiteliales corneales y las células endoteliales corneales.

(2) Apoptosis de células epiteliales corneales evaluada mediante ensayo TUNEL

Las secciones tisulares se tiñeron con fluorescencia mediante el método TUNEL y se observaron por microscopía confocal. Se obtuvieron imágenes de las capas epiteliales alrededor de los centros de las córneas en tres campos diferentes (Fig. 8). La Fig. 9 muestra las imágenes teñidas con yodopropidio (PI) de los mismos campos. Se contaron las células epiteliales corneales totales teñidas con PI y las células positivas para TUNEL y se calcularon los porcentajes de células positivas para TUNEL. Los porcentajes se compararon en el tiempo entre las condiciones de conservación (Fig. 10). Las células apoptóticas positivas para TUNEL aumentaron en las células epiteliales corneales del grupo de control después de la semana 1. La apoptosis se suprimió en los grupos KUS121 y KUS187. Las células positivas para TUNEL en los grupos KUS121 y KUS187 fueron menos durante el período de ensayo que en el grupo de control. Los resultados sugieren que KUS121 y KUS187 suprimen la apoptosis de las células epiteliales corneales.

(3) Función de los endotelios corneales evaluada mediante tinción de inmunofluorescencia de Na⁺/K⁺ ATPasa

Las secciones tisulares se tiñeron con fluorescencia con anticuerpo anti-Na⁺/K⁺ ATPasa, los endotelios corneales alrededor de los centros de las córneas se observaron mediante microscopía de inmunofluorescencia indirecta y las imágenes se compararon a lo largo del tiempo entre las condiciones de conservación (Fig. 11). La Fig. 12 muestra las imágenes teñidas con PI de los mismos campos. Las células endoteliales corneales se mantuvieron mejor en los grupos KUS121 y KUS187 que en el grupo de control desde la semana 1. Los resultados sugieren que KUS121 y KUS187 protegen las células endoteliales corneales desde la fase anterior.

(4) Microscopía electrónica

Las córneas conservadas durante una semana se sumergieron en tampón fosfato 0,1 M que contenía glutaraldehído al 2 % a 4 °C para la prefijación, en tampón fosfato 0,1 M a 4 °C durante la noche para el lavado y en solución acuosa de osmio al 2 % a 4 °C durante 3 horas para la posfijación. Para la deshidratación, las córneas se sumergieron sucesivamente en soluciones de etanol de altas concentraciones (50, 70, 90, 100, 100 y 100 %) a 4 °C (50 %) o a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para la sustitución, las córneas se sumergieron en óxido de propileno a temperatura ambiente durante 45 minutos y después en una mezcla de óxido de propileno y resina epoxi a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Para la incrustación, las muestras y la resina epoxi se introdujeron en cápsulas y se curaron a 60 °C durante 48 horas. Después, se prepararon secciones de 80-90 nm utilizando un ultramicrotomo y se colocaron en mallas 200. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y plomo y se reforzaron mediante deposición de carbono (refuerzo de secciones contra haces de electrones). Las muestras se observaron por microscopía electrónica de transmisión y se obtuvieron imágenes (Fig. 13).

En el control se observó vacuolización de las células epiteliales corneales y pérdida de microvellosidades, pero no en las córneas conservadas en una solución que contenía KUS121. En el control, se observó hinchazón del estroma corneal y de las células endoteliales corneales, pero no en las córneas conservadas en una solución que contenía KUS121. Los resultados sugieren que KUS121 protege las células epiteliales corneales, el estroma corneal y las células endoteliales corneales de la fase anterior.

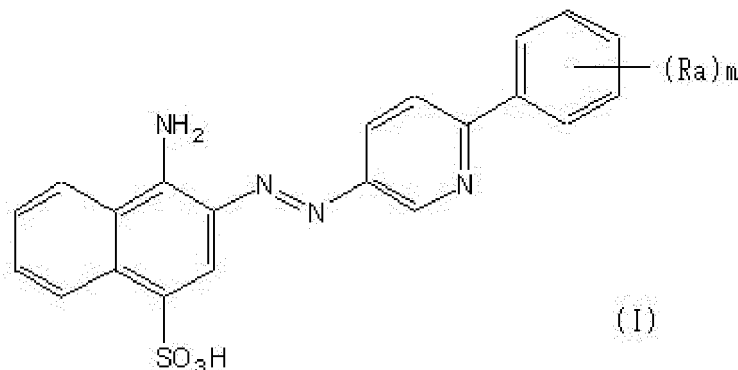
Los resultados de los Ensayos 1 a 3 revelaron que KUS121 y KUS187 protegen las células endoteliales corneales y las células epiteliales corneales y suprimen la muerte celular, que la función de bombeo es normal y que el edema corneal se suprime en las células endoteliales corneales protegidas de la muerte celular.

Aplicabilidad industrial

La composición divulgada en el presente documento puede usarse ampliamente en el campo de la medicina oftálmica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso para la protección de una córnea, que comprende un compuesto de fórmula (I):



5

en donde

10 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

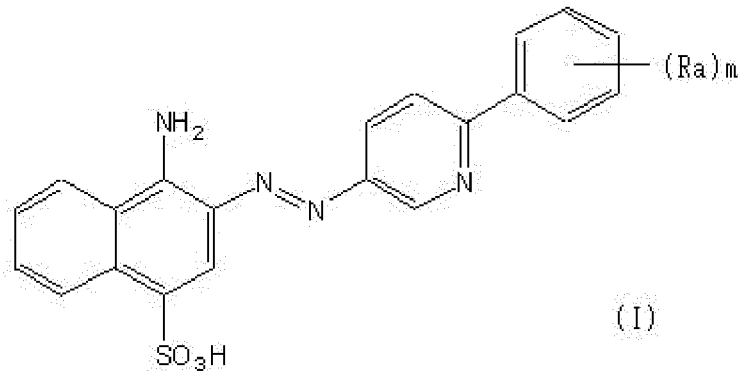
15 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada radical Ra se selecciona independientemente del grupo que consiste en halo, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo y alcoxi.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en

20

ácido 4-amino-3-(6-fenilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-(6-p-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-(6-m-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-(6-o-tolilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 25 ácido 4-amino-3-(6-bifenil-2-ilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 3-[6-(2-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico;
 ácido 3-[6-(3-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico;
 ácido 3-[6-(4-acetilfenil)piridin-3-ilazo]-4-aminonaftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2,4-diclorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 30 ácido 4-amino-3-[6-(2-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-clorofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 35 ácido 4-amino-3-[6-(2-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-isopropoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-isopropoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 40 ácido 4-amino-3-[6-(2-fenoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3-metoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2,3-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2,5-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3,5-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 45 ácido 4-amino-3-[6-(3-trifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-[4-[5-(1-amino-4-sulfonaftaleno-2-ilazo)piridin-2-il]fenil]-4-oxobutírico;
 ácido 4-amino-3-(6-bifenil-3-ilpiridin-3-ilazo)naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3-cianofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-cianofenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3,5-bistrifluorometilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 50 ácido 4-amino-3-[6-(4-benzoilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;

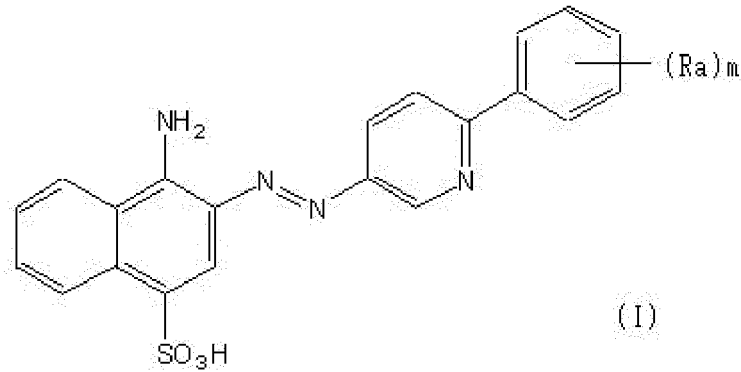
- ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(5-fluoro-2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-fluoro-6-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 5 ácido 4-amino-3-[6-(4-fluoro-2-propoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(5-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-fluoro-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-butoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-hexiloxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 10 ácido 4-amino-3-[6-(4-butilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2-hidroxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-[2-(6-hidroxihexiloxi)fenil]piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-{2-[5-(1-amino-4-sulfonaftaleno-2-ilazo)piridin-2-il]fenoxi}butírico;
 ácido 4-amino-3-[6-[2-(3-hidroxiopropoxi)fenil]piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 15 ácido 4-amino-3-[6-(2-isobutoxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(5-cloro-2-hidroxifenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4'-cloro-4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(4,3',5'-trimetilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 20 ácido 4-amino-3-[6-(3'-cloro-4-metilbifenil-2-il)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(2,6-dimetilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico;
 ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-isopropoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico; y
 ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de fórmula (I) es ácido 4-
 25 amino-3-[6-(4-fluoro-2-metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico o ácido 4-amino-3-[6-(3-formil-2-butoxi-5-
 metilfenil)piridin-3-ilazo]naftaleno-1-sulfónico.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la
 30 composición es para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de la córnea es una
 enfermedad endotelial corneal.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de la córnea es una
 35 enfermedad epitelial corneal.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de la córnea es córnea
 Guttata, distrofia corneal endotelial de Fuchs, distrofia corneal polimorfa posterior, síndrome endotelial iridocorneal,
 40 distrofia endotelial corneal hereditaria congénita, endotelitis por citomegalovirus, endotelitis herpética, síndrome de
 exfoliación, rechazo del injerto endotelial corneal, queratouveítis, queratitis intersticial, endotelitis corneal, pérdida de
 células endoteliales corneales tras un trasplante de córnea, lesión corneal tras cirugía intraocular, lesión corneal
 inducida por ataque glaucomatoso, lesión corneal causada por el uso prolongado de lentes de contacto, traumatismo
 45 corneal, traumatismo corneal intraparto, queratopatía bullosa, queratitis punteada superficial, erosión corneal, úlcera
 corneal, ojo seco, queratoconjuntivitis sicca o úlcera marginal corneal.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad de la córnea es distrofia
 corneal endotelial de Fuchs, queratopatía bullosa, erosión corneal, ojo seco o traumatismo corneal.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la
 50 composición es un colirio.
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la
 composición es una solución de irrigación ocular o una composición para añadir a una solución de irrigación ocular.
- 55 12. Una composición farmacéutica para su uso para tratar o prevenir una enfermedad de la córnea, que comprende
 un compuesto de fórmula (I):



en donde

- 5 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxilo éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4,
- 10 o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

13. Una composición para su uso para irrigación ocular, que comprende un compuesto de fórmula (I):

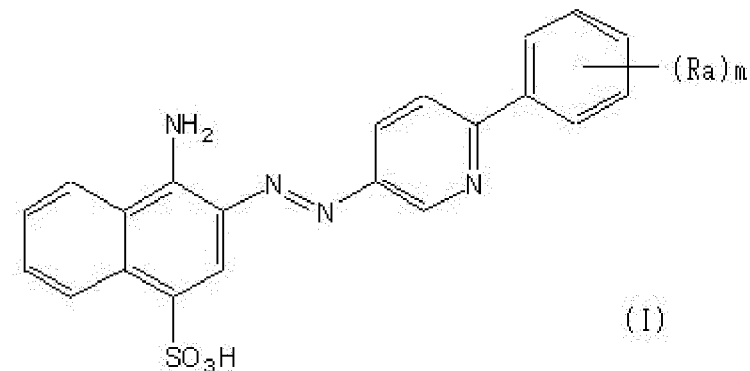


15 en donde

- 20 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxilo éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4,
- o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

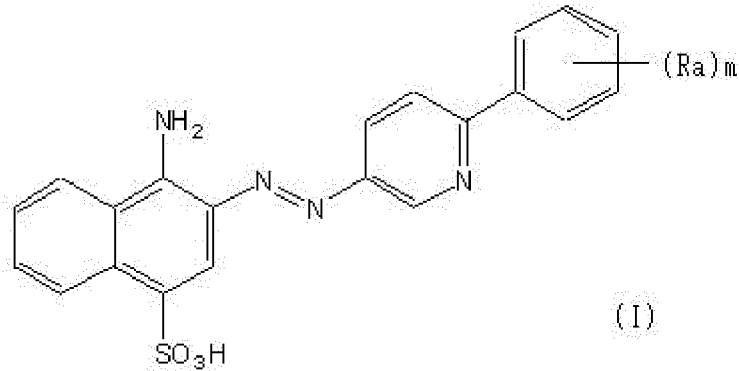
14. Uso de una composición para conservar un injerto de córnea, comprendiendo la composición un compuesto de fórmula (I):

25



en donde

- 5 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.
- 10 15. Un método para conservar o proteger un injerto de córnea, que comprende conservar un injerto de córnea en una solución de conservación corneal que comprende un compuesto de fórmula (I):



15 en donde

- 20 Ra se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido con halo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, alcoxi, alcoxi sustituido con hidroxilo o carboxilo, arilo, arilo sustituido con halo o alquilo, CHO, -C(O)-alquilo, C(=O)-arilo, C(O)-alquil-carboxilo, C(O)-alquilen-carboxi éster y ciano, y m es un número entero seleccionado de 0 a 4, o un éster, óxido, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

Fig. 1

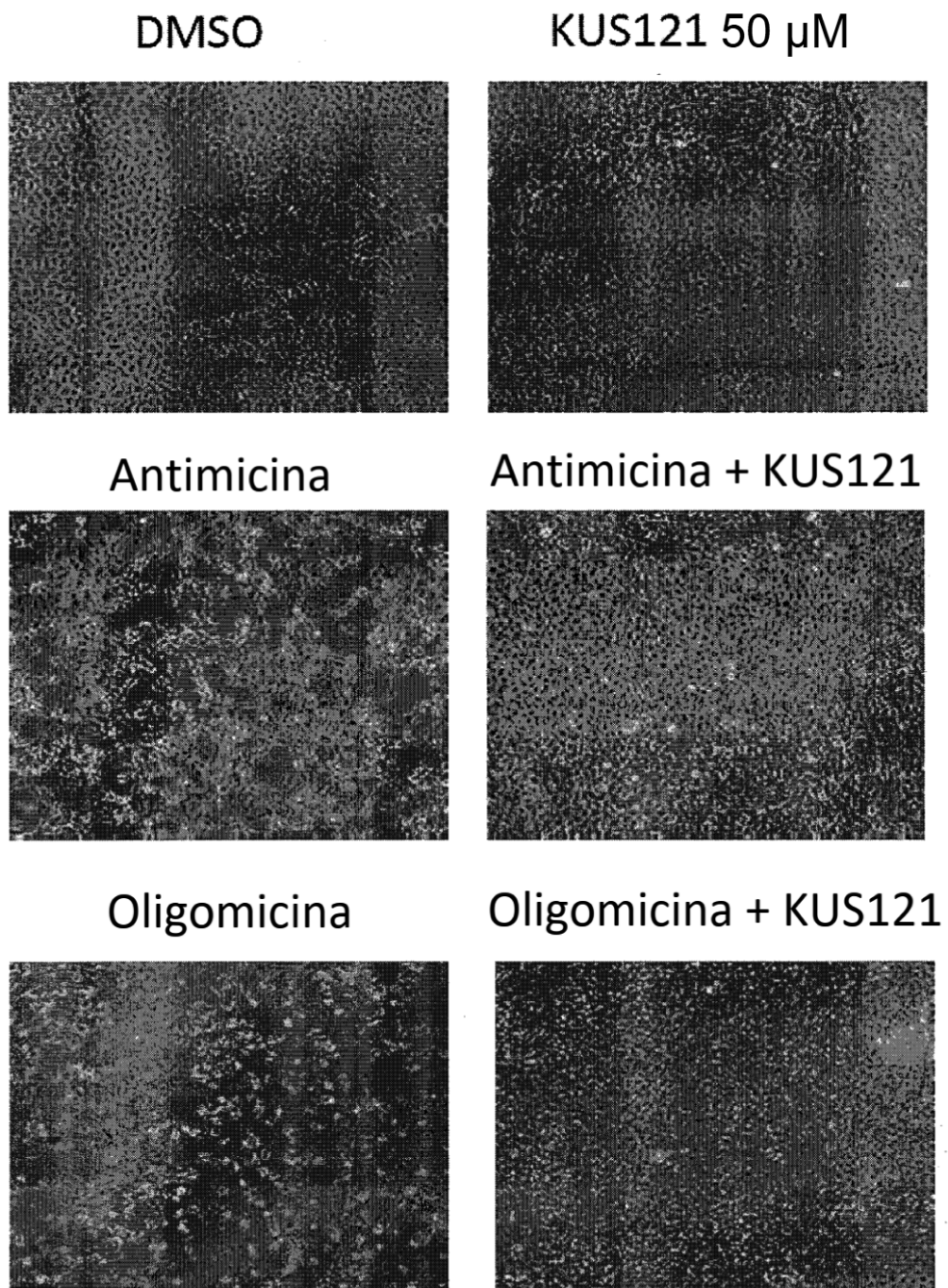
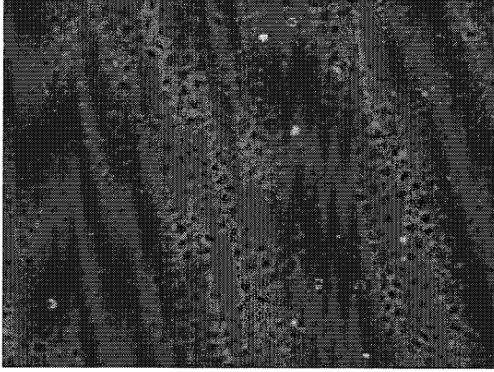
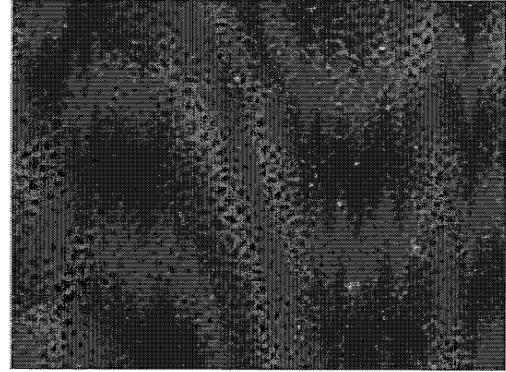


Fig. 2

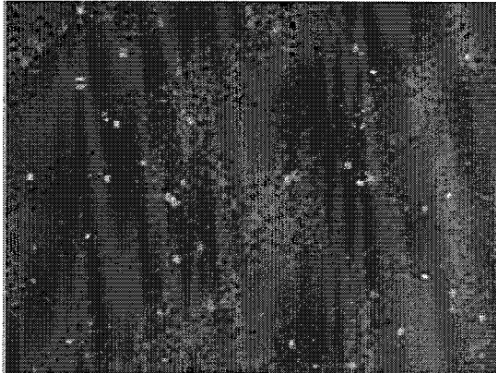
DMSO



KUS121 50 μ M



Sin glucosa



Sin glucosa + KUS121

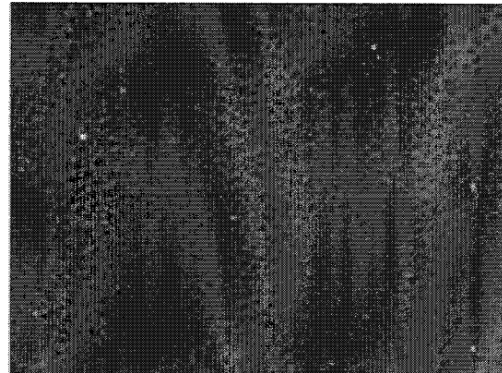


Fig. 3

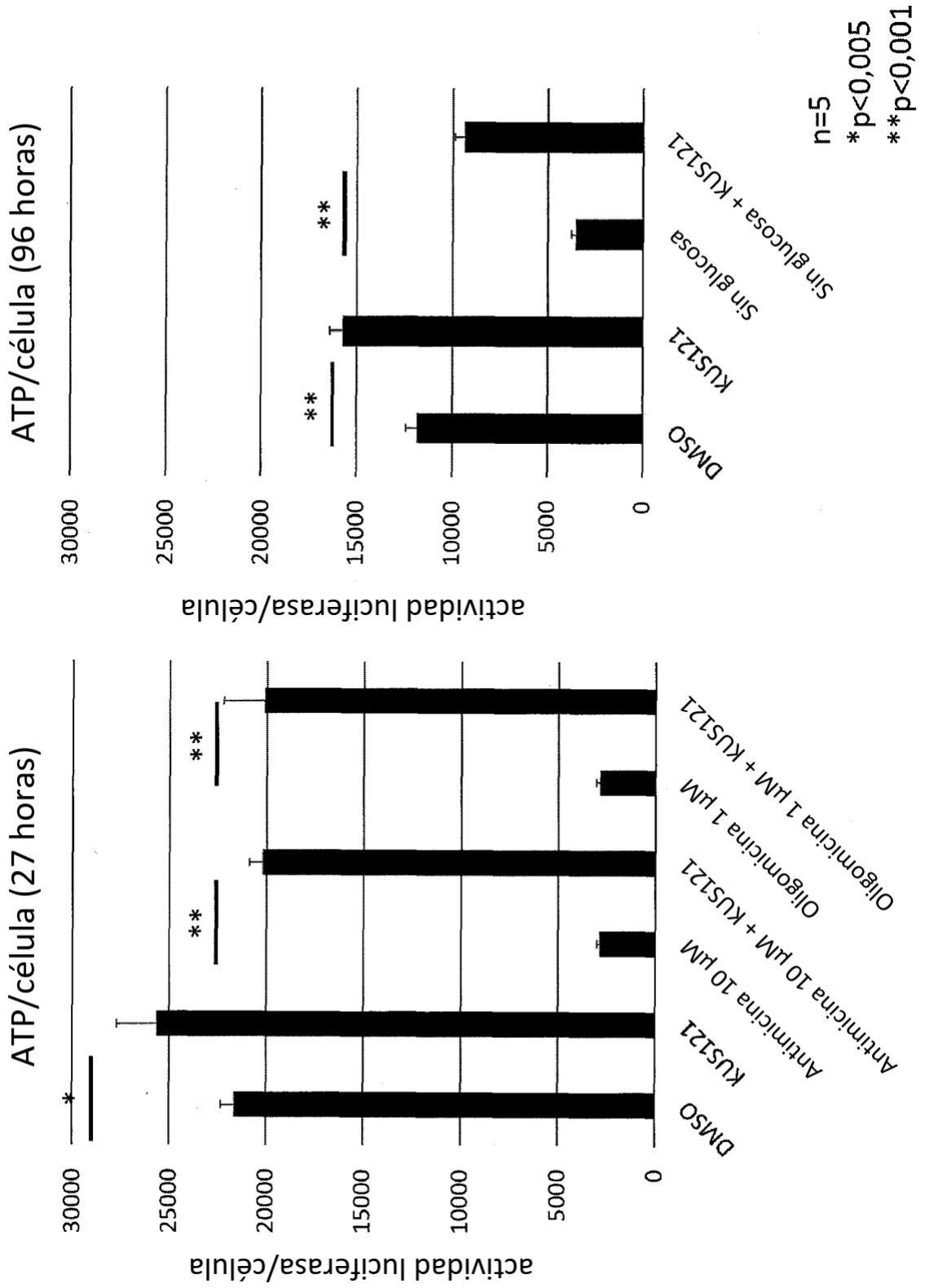


Fig. 4

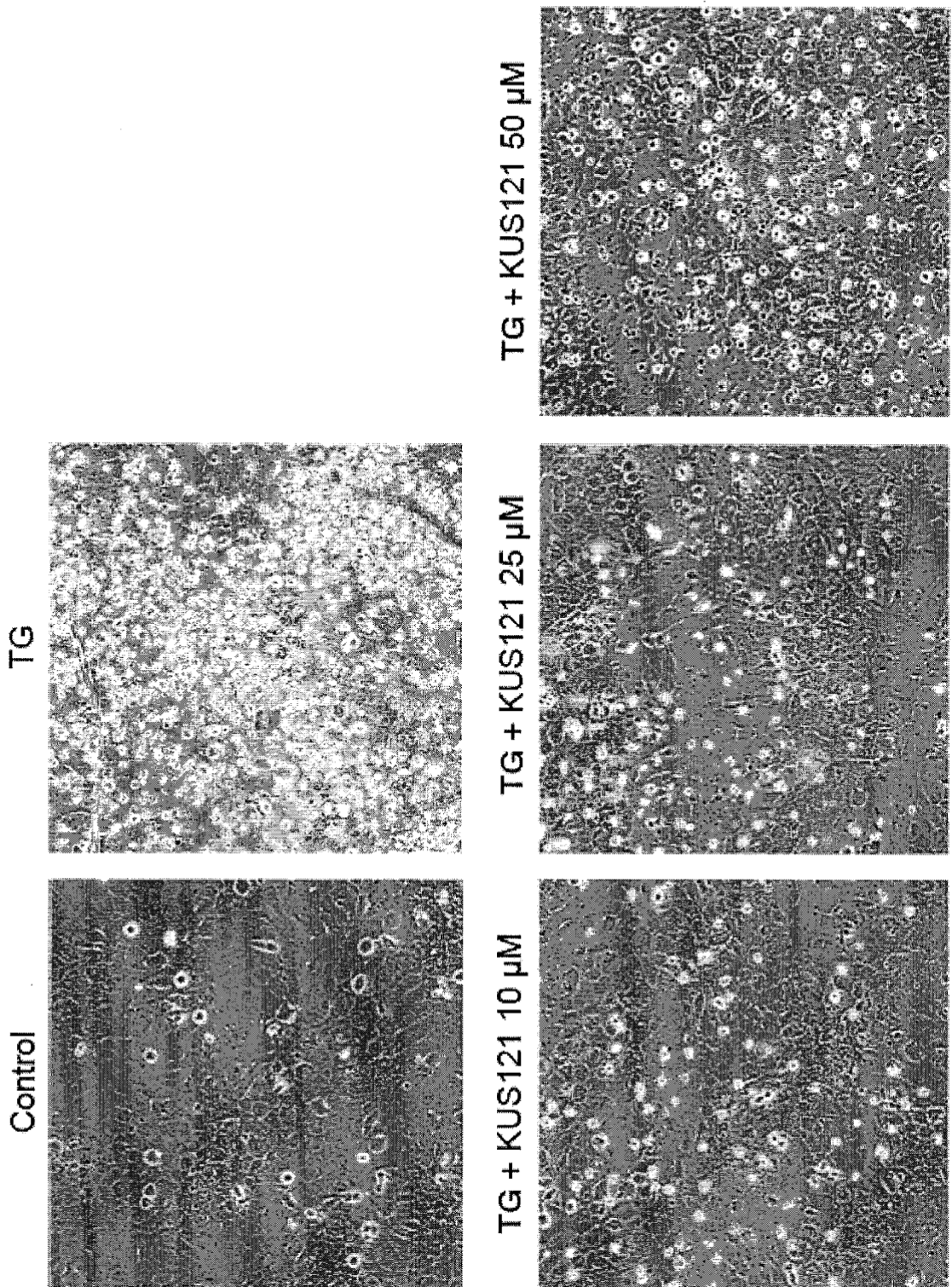


Fig. 5

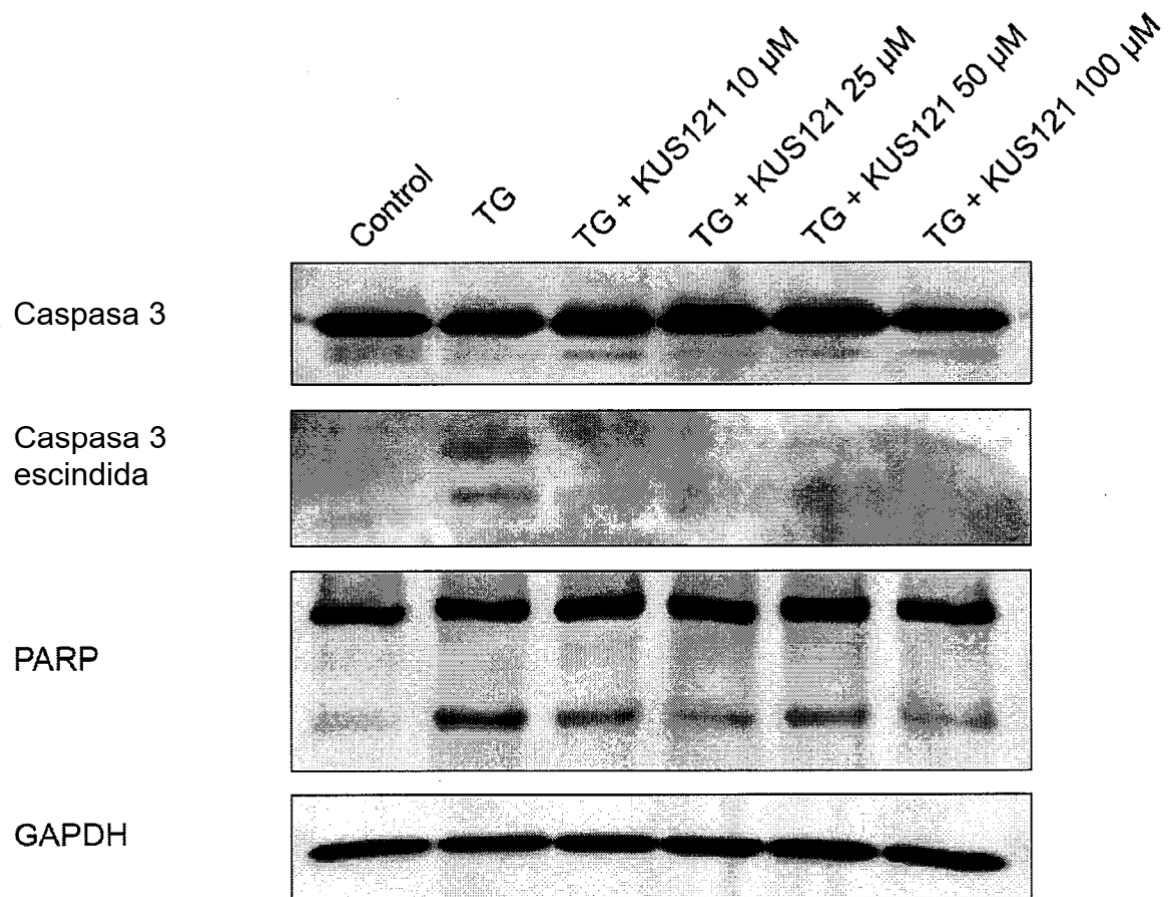


Fig. 6

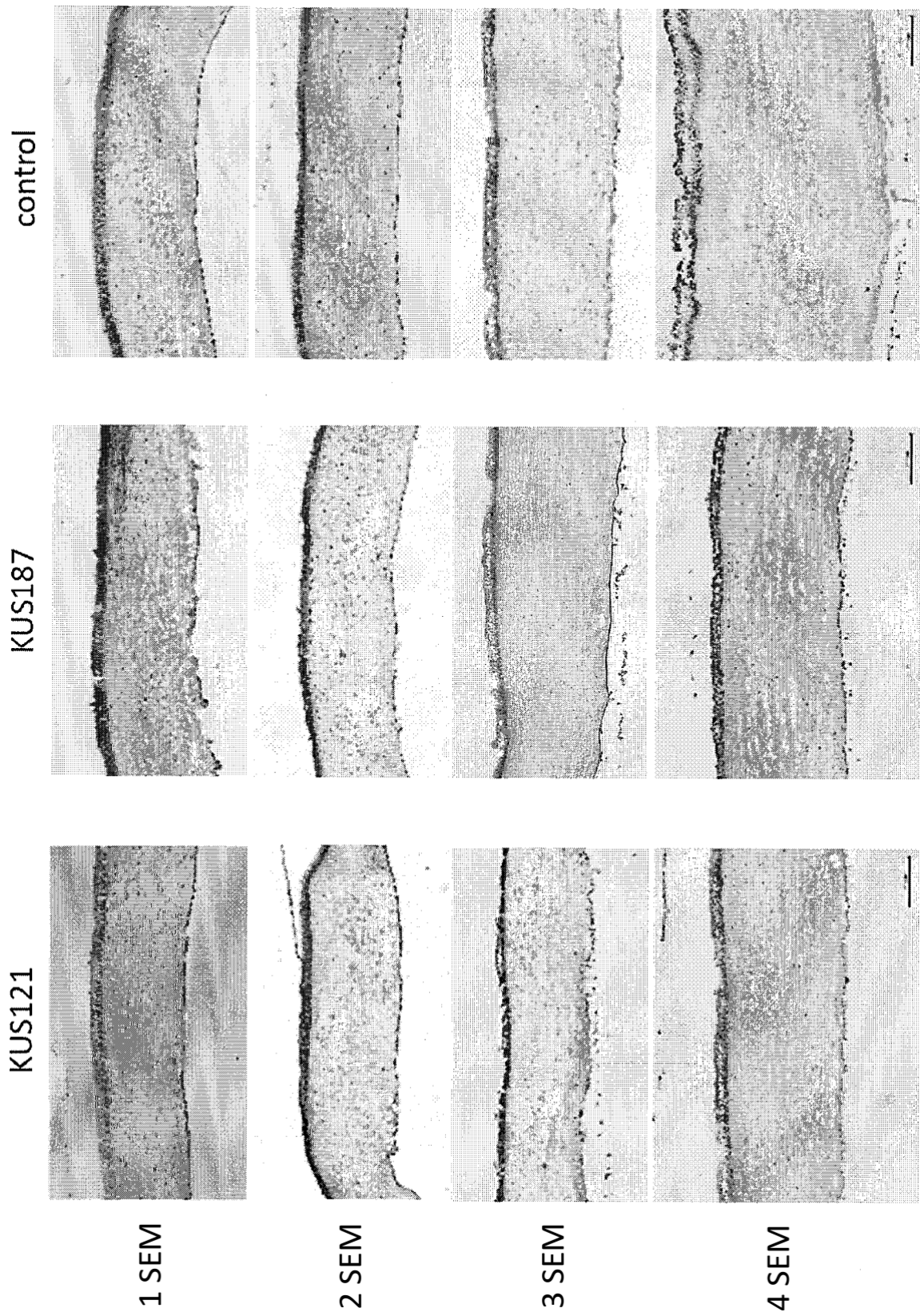


Fig. 7

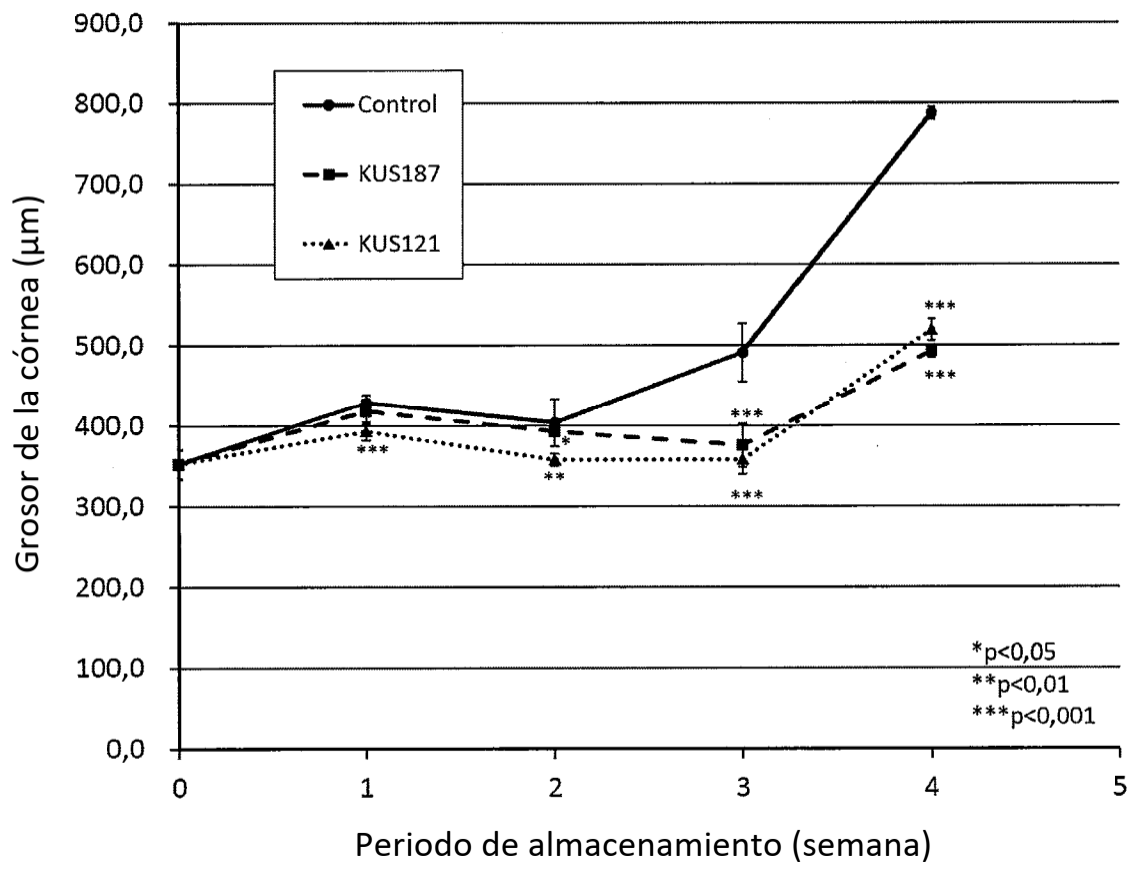


Fig. 8

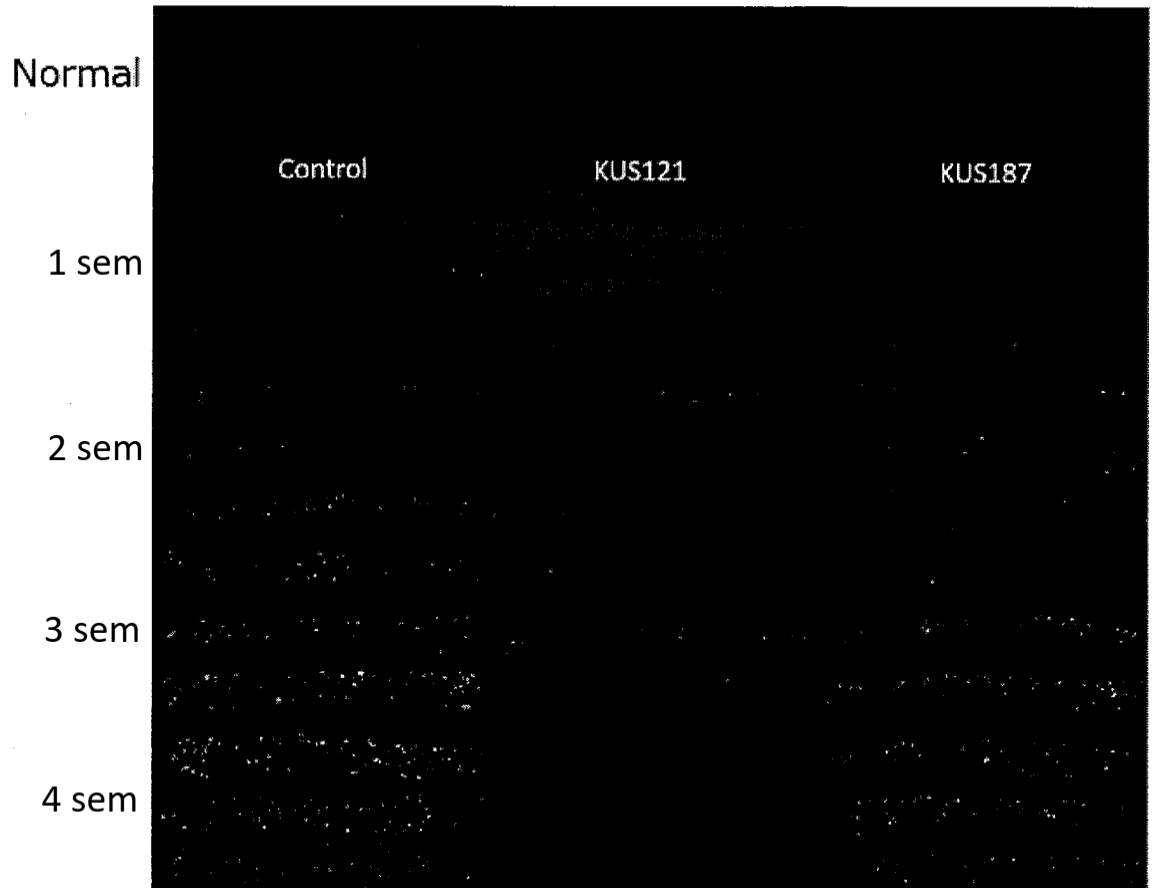


Fig. 9

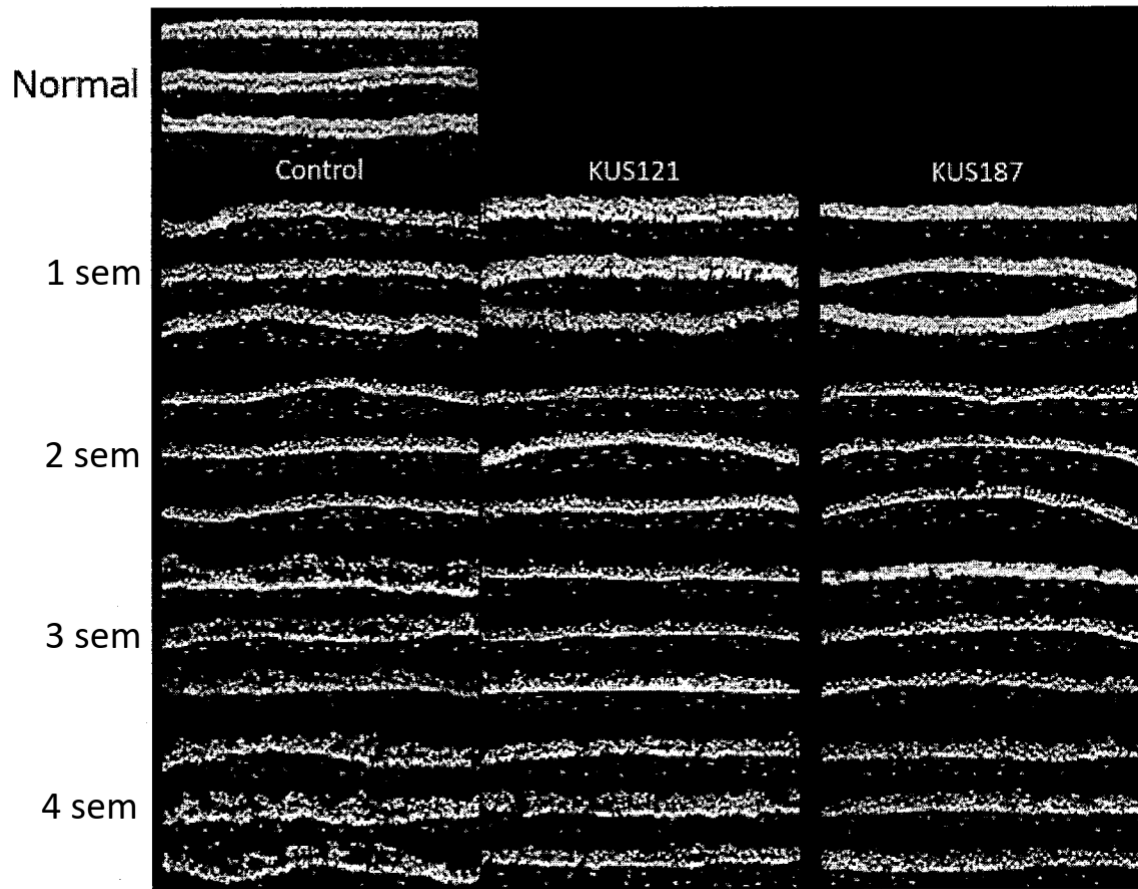


Fig. 10

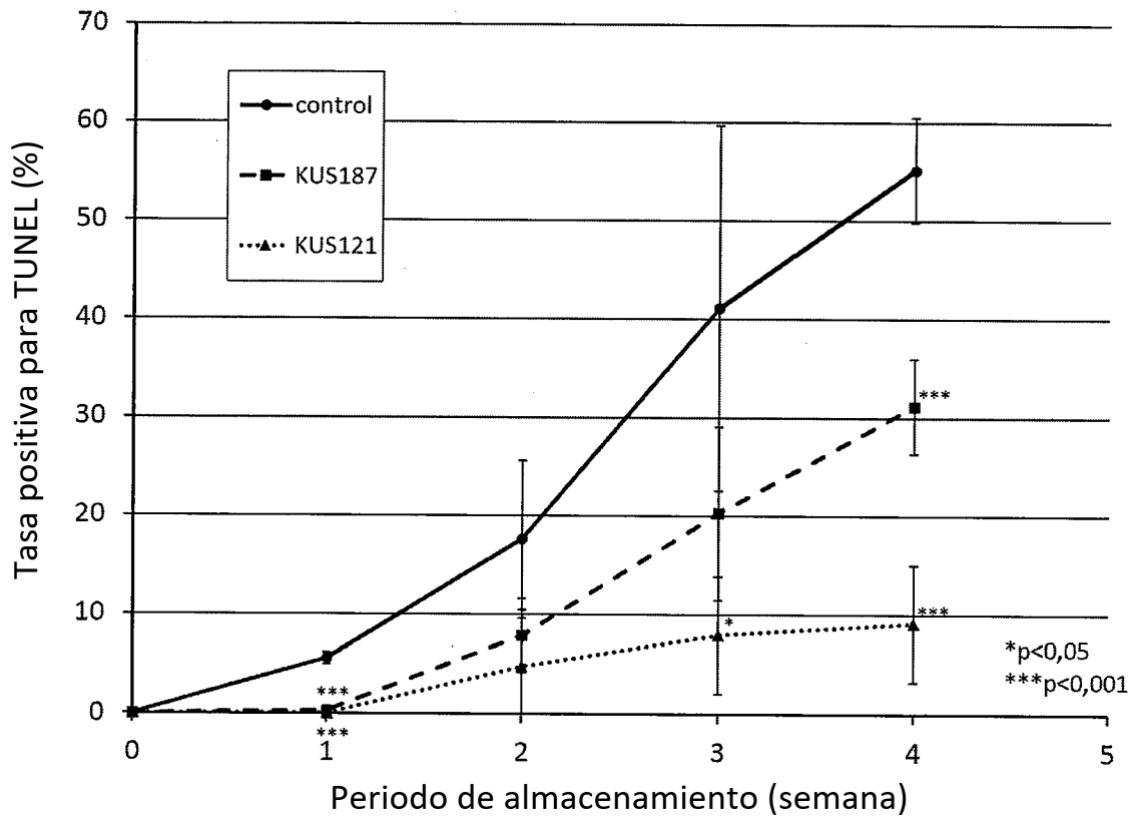


Fig. 11

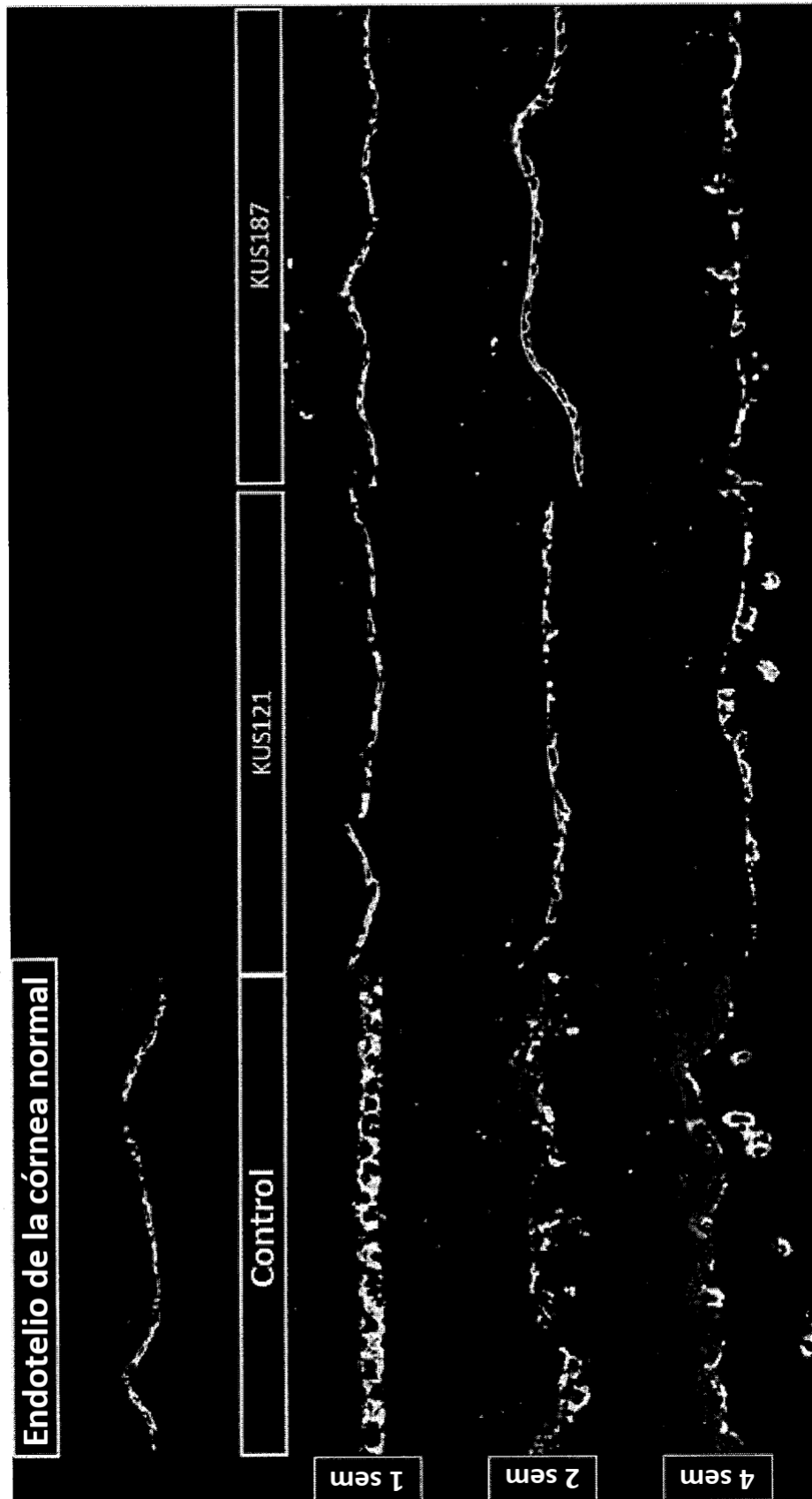


Fig. 12

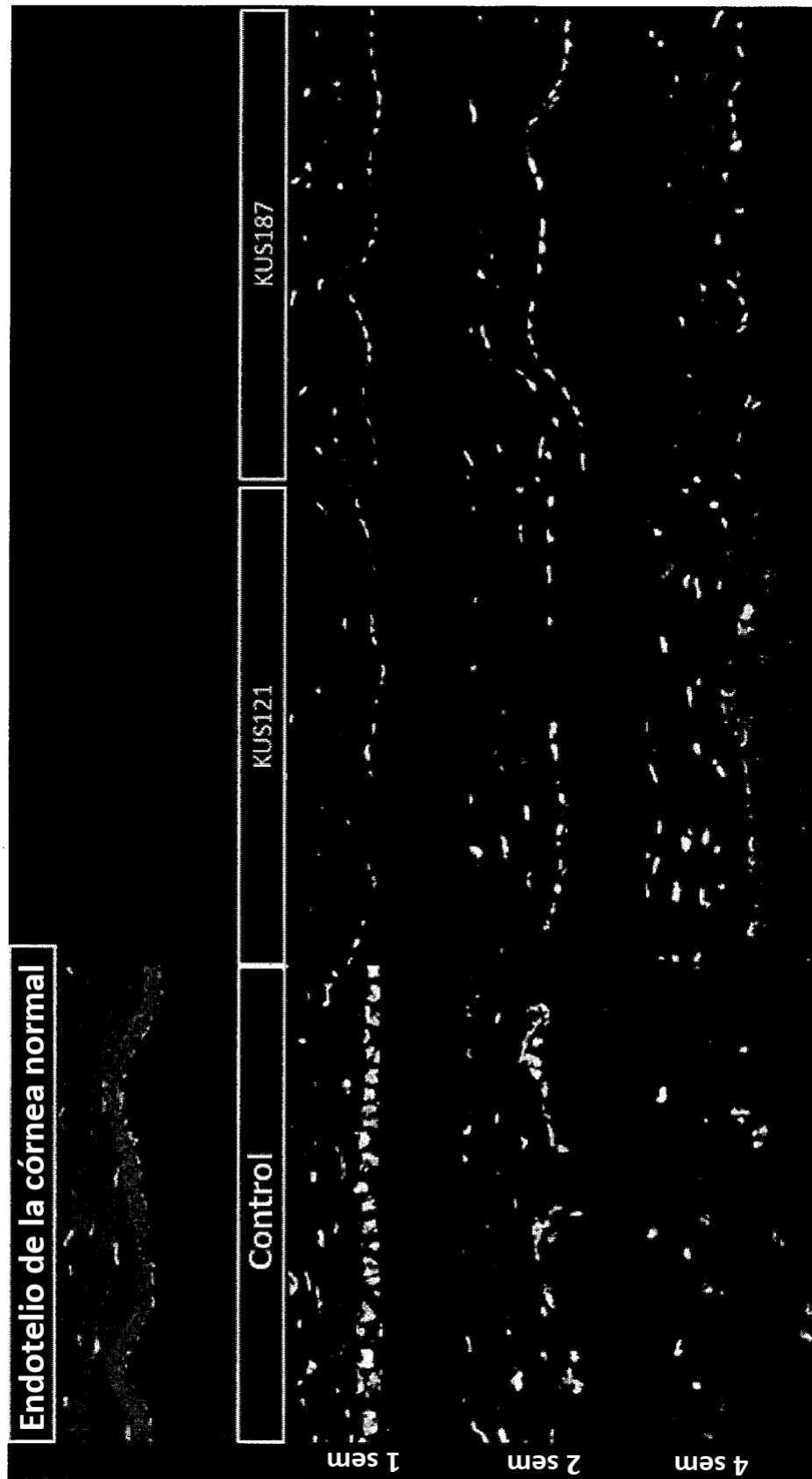


Fig. 13

