

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 945**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07748079 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2015767**

54 Título: **Uso de un factor antisecretor para tratar la hipertensión intraocular**

30 Prioridad:

**27.04.2006 SE 0600932**

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

**01.03.2016**

73 Titular/es:

**LANTMANNEN AS-FAKTOR AB (100.0%)  
BOX 30192  
104 25 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

**HANSSON, HANS-ARNE;  
LANGE, STEFAN y  
JENNISCHE, EVA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 561 945 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

Uso de un factor antisecretor para tratar la hipertensión intraocular

### Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas que comprenden factores antisecretores en el tratamiento y/o la prevención de la hipertensión intraocular, que se caracteriza preferiblemente por la obstrucción del flujo de salida del líquido corporal que da como resultado una presión elevada en el ojo. La invención proporciona un enfoque novedoso para el tratamiento y/o prevención de esta afección volviendo la presión intraocular a un nivel aceptable, opcionalmente 21mm Hg, o menos. La invención también se refiere a un método para tratar y/o prevenir la hipertensión intraocular mediante la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden factores antisecretores.

### Antecedentes de la invención

15 Los niveles de presión elevados en el ojo son causados por bien por la elevada producción de líquido o por la obstrucción del flujo de salida de líquido del ojo, o, alternativamente, por combinaciones las mismas. La presión intraocular (IOP) en el ojo de un mamífero es similar para una amplia variedad de especies y del orden de 11-21mm Hg, tal como 10-20 mm Hg, tal como 12-18 mm Hg. Para los seres humanos, un intervalo normal es de aproximadamente entre 11-21mmHg. Se considera elevada si es superior a 20 mm Hg, tal como 21 mm Hg, tal como 21-24 mm Hg, o 22-30mm Hg durante un período de tiempo prolongado. El nivel de la IOP está regulado por la formación de un fluido, el humor acuoso (AH), procedente de la sangre y transferido a través de los procesos ciliares a la cámara posterior del ojo. El AH pasa el cuerpo vítreo y el cristalino de la cámara posterior y luego a través de la pupila a la cámara anterior. Desde allí la mayor parte del AH finalmente fluye hacia el ángulo irido-corneal y sale del ojo a través de la malla trabecular por el canal de Schlemm, las venas acuosas y las venas esclerales y episclerales. Hay un intercambio de fluido y metabolitos entre el AH y, por ejemplo el cristalino en la cámara posterior y la córnea en la cámara anterior. Una pequeña parte del AH entra en la vía uveoescleral, es decir, el iris, el músculo ciliar y la esclerótica y eventualmente se mezcla con el fluido de los tejidos producido localmente antes de salir del ojo (Jemdal, Hansson & Bill, 1990; Oyster, 1999). La IOP se controla en gran medida por el flujo de salida, mientras que la formación de la AH en los seres humanos adultos se considera que es menos variable. Los principales reguladores de la IOP son el endotelio de la malla trabecular, la malla endotelial yuxtacanalicular y la pared interna del endotelio del canal de Schlemm (Lütjen-Drecoll 1998; Sacca et al 2005). Esta última es de especial importancia en la rectificación y control del flujo desde la cámara anterior al sistema vascular. En las células endoteliales, invaginaciones, denominadas caveolas, se forman y se llenan con AH, y después se transfieren principalmente como vacuolas gigantes a través de las células endoteliales para vaciar su contenido en el canal de Schlemm. El aumento de la IOP da como resultado la formación de un gran número de estas vacuolas gigantes y sucede lo contrario si la IOP se reduce (Jemdal, Hansson & Bill, 1990; Lütjen-Drecoll 1998). Además, estas células pueden tener provisionalmente la capacidad de controlar su volumen celular, influyendo de ese modo aún más en la pérdida paracelular de AH (Starner et al., 2001). La Figura 1a muestra una figura esquemática del ojo humano y la Figura 1b una micrografía electrónica de barrido del ángulo irido-corneal de un ojo humano adulto.

40 El término hipertensión intraocular se utiliza en la práctica médica como un diagnóstico para una enfermedad crónica con una IOP superior a 20 mm Hg, tal como 21-24 mm Hg, tal como de 22-30 mm Hg. Los pacientes con hipertensión intraocular pueden sufrir esta enfermedad sin que se produzca ningún signo de secuela como la pérdida del campo visual u otros signos de alteraciones de la retina y del nervio óptico. El aumento agudo de la IOP puede ocurrir transitoriamente por ejemplo por la tos, por una alta carga de trabajo, después de un traumatismo del bulbo ocular y por la maniobra de Valsalva. Normalmente hay una variación diurna de la IOP, siendo más alta en los seres humanos a primera hora del día. En un humano adulto, se forman aproximadamente 2-3  $\mu$ L de AH por minuto, dando como resultado que el AH en un ojo se renueva en aproximadamente 1½ h. Eso significa que la formación y la salida deben estar controladas dentro de límites estrechos para mantener la presión intraocular dentro del intervalo normal. La IOP no debe ser ni demasiado alta ni demasiado baja. Las principales funciones del AH son proporcionar nutrientes, oxígeno, iones y líquido a, por ejemplo al cristalino y la córnea y drenar los metabolitos y desechos. Además, la IOP y el AH interactúan para mantener las propiedades ópticas y la forma del ojo. La producción de AH se puede detectar por varios métodos, como por ejemplo mediante la determinación de la renovación del AH y su flujo de salida. La presión intraocular se determina con precisión por ejemplo, por tonometría.

55 Se puede demostrar la presencia de IOP anormal, en algunos pacientes con glaucoma. Sin embargo no todos los pacientes con glaucoma muestran signos de hipertensión intraocular. El término hipertensión intraocular por lo tanto no debe ser confundido con el diagnóstico médico del glaucoma. A diferencia de la hipertensión intraocular, el glaucoma se define como una enfermedad caracterizada por aumentar el deterioro con el tiempo y, finalmente la ceguera debido a la pérdida progresiva de las células nerviosas de la retina y la degeneración del nervio óptico. Bajo el término glaucoma se incluyen una amplia gama de enfermedades, teniendo todas en común que finalmente dan como resultado el deterioro de la visión (Ritch et al., 1996). Por lo tanto, el diagnóstico del glaucoma se refiere a la pérdida visual y no a la presencia anormal de IOP.

La IOP se rige principalmente por el flujo de salida del AH de la cámara anterior en el ojo a las venas a través del ángulo iridocorneal al canal de Schlemm. Si la salida del AH del ojo se ve obstaculizada o incluso bloqueada, la IOP se convertirá en elevada. La resistencia a la salida, que normalmente tiene como resultado una IOP en el intervalo de 10-20 mm Hg, tal como 12 a 18 mm Hg, se localiza principalmente a la malla trabecular y el revestimiento endotelial de la canal de Schlemm. Las células endoteliales en la malla trabecular y el canal de Schlemm interactúan en la regulación del flujo de salida del AH (Alvarado et al, 2005; Jerndal et al, 1991). No hay comunicación directa entre la cámara anterior por un lado y el canal de Schlemm, que incluye las venas escleral y episclerales, por el otro. En pacientes con hipertensión intraocular la malla trabecular se caracteriza por la degeneración en un grado variable, la acumulación de material de placa derivado de la cubierta y el aumento de la resistencia al flujo de salida del AH (Rohen et al, 1993). Además, la acumulación de pigmentos y material de exfoliación, así como de células sanguíneas y coágulo puede añadirse además en ciertos casos y obstaculizar aún más el flujo de salida, la elevando la IOP. La hipersecreción, es decir, la formación excesiva de AH, es raramente una causa única de hipertensión intraocular. Por lo tanto, el control mantenido mejorado de la renovación de AH, especialmente el control del flujo de salida de AH a través del ángulo iridocorneal es de importancia clave en el descenso y la normalización de la IOP, con el fin de controlar la hipertensión intraocular.

Las terapias disponibles para el tratamiento de la hipertensión intraocular en la práctica clínica tienen como objetivo aumentar preferentemente la salida de AH, pero algunos medicamentos, como por ejemplo, la dorzolamida y la brinzolamida, disminuyen la producción de AH. Algunos de los medicamentos que se utilizan actualmente influyen tanto en la formación como las rutas del flujo de salida. Se debe destacar que la composición, así como la renovación de AH es importante puesto que el AH suministra por ejemplo al cristalino y a la córnea, nutrientes, líquido y oxígeno y se encarga de la gran mayoría de los productos formados. Los efectos secundarios son frecuentes con los medicamentos usados en la actualidad y, a menudo obstaculizan el tratamiento adecuado. Además, hay pacientes con hipertensión intraocular, a los que no es posible tratar adecuadamente con los medicamentos disponibles. Por lo tanto, son necesarios métodos terapéuticos para reducir la IOP a los niveles normales. El documento WO96/17602 describe un método para reducir la presión intraocular aumentando el flujo de salida del humor acuoso mediante compuestos que inhiben el co-transporte de NA-K-Cl.

La proteína antisecretora es una proteína de 41 kDa, descrita originalmente para proporcionar una protección contra las enfermedades diarreicas y la inflamación intestinal (para una revisión, véase Lange y Lönnroth, 2001). La proteína antisecretora ha sido secuenciada y su ADNc clonado. La actividad antisecretora parece que se ejerce principalmente por un péptido situado entre las posiciones 1-163, o más específicamente, entre las posiciones 35 y 50 en la secuencia de aminoácidos de la proteína antisecretora. Las investigaciones inmunoquímicas e inmuno histoquímicas han revelado que la proteína antisecretora está presente y también se puede sintetizar por la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo. Los péptidos sintéticos, que comprenden la secuencia antidiarreica han sido caracterizados (WO 97/08202; WO 05/030246). Se ha descrito previamente que los factores antisecretos normalizan el transporte de fluidos patológico y/o las reacciones inflamatorias, en el intestino y en el plexo coroideo del sistema nervioso central tras la estimulación con la toxina del cólera (WO 97/08202). Por lo tanto, se sugirió que la adición de factores antisecretos a alimentos y piensos era útil para el tratamiento del edema, la diarrea, la deshidratación y la inflamación en el documento WO 97/08202. El documento WO 98/21978 describe el uso de productos que tienen actividad enzimática para la producción de un alimento que induce la formación de proteínas antisecretoras. El documento WO 00/038535 describe además los productos alimenticios enriquecidos en proteínas antisecretoras como tales.

También se ha demostrado que la proteína antisecretora y fragmentos de la misma mejora la reparación del tejido nervioso, y la proliferación, apoptosis, diferenciación y/o migración de las células madre y progenitoras y de las células derivadas de los mismos en el tratamiento de enfermedades asociadas con la pérdida y/o ganancia de células (WO 05/030246).

Los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente que la proteína del factor antisecretor, homólogos y fragmentos peptídicos derivados de la misma reducen la resistencia al flujo de salida del AH a través del ángulo iridocorneal del ojo al sistema venoso. Esto presenta una nueva aplicación terapéutica para proteínas antisecretoras, homólogos y fragmentos de la misma, es decir, el uso de tales proteínas y fragmentos en la preparación de medicamentos para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular.

### Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas que comprenden factores antisecretos en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular. La invención se basa en el hallazgo de que los factores antisecretos, i.e. proteínas y péptidos antisecretos, homólogos y fragmentos de los mismos que tienen actividad antisecretora, aumentan el flujo de salida de líquido en el ojo, lo que reduce la presión intraocular.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o un fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:4, que tiene una actividad antisecretora, y/o

una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión intraocular.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a uso de una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o un fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:4, que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica para administración intraocular.

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere a una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o un fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:4, que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión intraocular.

### Descripción de las figuras

15 **Fig. 1a** muestra una figura esquemática de un ojo humano (1-1). El canal del Schwann (Sch) se ve a mayor aumento, separado de la cámara anterior (AC) por la malla trabecular (T) (1-2). También se describe que cada trabécula (Tr) está envuelta por las células endoteliales (EC) (1-3). El humor acuoso se forma en los procesos ciliares se ve a la derecha de la zona enmarcada en la Fig. 1-1. L = cristalino; C = córnea; I = iris; S = esclerótica; Modificado de: R.V. Krstić, 1991.

20 **Fig. 1b** es una micrografía electrónica de barrido del ángulo irido-corneal de un ojo humano de un hombre de 55 años de edad, quien tenía un ojo enucleado debido a un tumor retrobulbar. La malla trabecular, marcada con una U, se ve separada de canal de Schlemm por un tejido bastante denso C = córnea; Sp = espolón escleral; I = iris; Cp = procesos ciliares; S = línea de Schwalbe. El aire está en la parte superior derecha. De Jerndal et al., 1991.

**Fig. 2** muestra la presión intraocular en el tratamiento tópico de los ojos de conejos con AF-16 (triángulos al revés), con el fármaco Timolol ® (triángulos), y con vehículo PBS (cuadrados), respectivamente, de acuerdo con el Ejemplo 7.

25 **Fig. 3** muestra la presión intraocular después de 5 días de tratamiento tópico de ojos de conejos con AF-16 (triángulos al revés), con el fármaco Timolol ® (triángulos), y con vehículo PBS (cuadrados), respectivamente, de acuerdo con el Ejemplo 7.

**Fig. 4** muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína antisecretora de acuerdo con SEQ ID NO 6 de la presente invención. La secuencia corresponde a la SEQ ID NO 2 de US 6344440.

### 30 Definiciones

En la presente solicitud la cámara anterior [ojo] se define como el espacio entre la superficie anterior del iris y la superficie endotelial de la córnea, conectadas por el ángulo iridocorneal.

La cámara posterior [ojo] se define como el espacio entre la superficie anterior del cuerpo vítreo y el cristalino y la superficie posterior del iris. La cámara posterior y la cámara anterior están conectadas a través de la pupila.

35 Proteína antisecretora en el presente contexto se refiere a una proteína con propiedades antisecretoras tal como se definen anteriormente en los documentos WO 97/08202 y WO 00/38535.

40 En el presente contexto el factor antisecretor (AF) se refiere a una proteína o un péptido antisecretor o un homólogo, y/o un fragmento de la misma que tiene actividad antisecretora. En el presente contexto, este péptido, homólogo, o fragmento tiene actividad biológica análoga en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular. Los factores antisecretos se han descrito previamente por ejemplo, en WO 97/08202 y en WO 05/030246. En el presente contexto los términos factor antisecretor, proteína del factor antisecretor, proteína antisecretora, péptido antisecretor, derivado antisecretor y fragmento antisecretor se utilizan indistintamente. También se entiende con el término factor antisecretor yema de huevo enriquecida con factores antisecretos como se describe en SE 900028-2 y WO 00/38535 como se describe más adelante.

45 Por humor acuoso, AH, se entiende un líquido acuoso formado a partir de la sangre en los procesos ciliares, que fluye a través de la cámara posterior y la pupila hacia la cámara anterior y luego sale de la cámara anterior a través principalmente de la malla trabecular y del canal de Schlemm y, finalmente, por los vasos sanguíneos venosos.

CNS es el sistema nervioso central, que comprende el cerebro y la médula espinal.

50 Por edema se entiende la acumulación de una cantidad excesiva de fluido acuoso en las células, tejidos o cavidades serosas (véase, por ejemplo Diccionario médico de Stedman, 5th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, 2005).

Por glaucoma se entiende un grupo de enfermedades caracterizadas por un daño progresivo a la retina y al nervio óptico, que tienen como resultado la pérdida y el estrechamiento del campo visual y, finalmente, la pérdida de la visión.

La presión intraocular (IOP) es la presión ejercida por el humor acuoso en el globo ocular.

- 5 La hipertensión intraocular es una enfermedad en la que la presión en el globo ocular es superior a 20 mm Hg, tal como 21 mm Hg, tal como de 22-30 mm Hg en un paciente despierto. Así, en el presente contexto, la expresión hipertensión intraocular y presión intraocular anormal se usan de manera indistinta.

Por hipotensión intraocular se entiende que la presión en el globo ocular es inferior a 11 mm Hg, tal como 10 mm Hg en un paciente despierto.

- 10 El ángulo iridocorneal es la unión dentro la cámara anterior entre el iris y la parte posterior de la córnea.

PBS es una disolución salina tamponada con fosfato.

- 15 En el presente contexto los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren al tratamiento terapéutico con el fin de curar o aliviar la enfermedad de la hipertensión intraocular. También se pretende en la presente invención la "prevención" de la hipertensión intraocular, que está relacionada con el tratamiento profiláctico para evitar la ocurrencia de hipertensión intraocular.

Por malla trabecular se entiende la malla de trabéculas y láminas de tejido conectivo colagenoso recubierta por las células endoteliales, interpuesta en el ángulo iridocorneal entre la cámara anterior y el canal de Schlemm.

- 20 Por el canal de Schlemm se entiende el canal venoso circular en la parte exterior del surco escleral interno en la región del limbo del ojo, conectado a través de las venas del humor acuoso al sistema de drenaje venoso del ojo. El canal de Schlemm es el principal sistema de flujo de salida para el humor acuoso desde la cámara anterior del ojo.

- 25 Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se denominan polipéptidos. Normalmente, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos y por lo tanto tienen pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 6000 a aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se denominan péptidos u oligopéptidos. El término "proteína" y "péptido" se pueden usar indistintamente en el presente contexto.

- 30 Una "composición farmacéutica", en el presente contexto, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente activa de una proteína antisecretora, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente activo, tal como un transportador o un vehículo. Dicha composición farmacéutica se formula para la vía de administración apropiada, que puede variar dependiendo de la enfermedad del paciente, así como de otros factores, tales como la edad o la opción preferida. Una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora sirve como un sistema de administración de fármacos. La composición farmacéutica después de su administración expone la sustancia activa al cuerpo de un ser humano o de un animal. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la presente invención se describen a continuación.

### 35 Descripción detallada de la invención

- 40 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los factores antisecretorios (AF), como la proteína antisecretora y homólogos, o fragmentos de la misma causan una reducción de la resistencia al flujo de salida del humor acuoso a través del ángulo iridocorneal del ojo al sistema venoso, lo que aumenta el flujo de salida de líquido anormalmente acumulado en el ojo. De esta manera el flujo de salida del humor acuoso se incrementa, lo que lleva a una disminución en la presión intraocular en el ojo. Esto presenta una nueva aplicación terapéutica para las proteínas antisecretoras y fragmentos de las mismas, es decir, el uso de tales proteínas y fragmentos en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular. El uso de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención es probable que sea más útil para los pacientes con riesgo de desarrollar o que sufren de hipertensión intraocular.

- 45 Como se describió anteriormente, el flujo de salida del humor acuoso se produce principalmente a través del ángulo del iris y está regulado por las células que forman la malla trabecular. La mayor parte del humor acuoso se transporta fuera del ojo a través del canal de Schlemm. El humor acuoso se transporta encerrado en pequeñas vesículas a través de las células de la malla trabecular hacia el canal de Schlemm, así como, en cierta medida por vía paracelular. Adicionalmente y en un grado menor, el AH sale del ojo a través de las estructuras del ángulo del iris y la esclerótica. El flujo fuera del ojo del humor acuoso, en el que "pequeñas porciones" de líquido son transportados a la vez, es radicalmente diferente del transporte de iones y agua, por ejemplo en el intestino, en el que las bombas de iones y el agua de las células epiteliales del intestino transportan una molécula cada vez. Por lo tanto, aunque anteriormente se han sugerido factores antisecretorios para su uso en el tratamiento de enfermedades tales como el edema, la diarrea, la deshidratación, el glaucoma y la inflamación (WO 97/08202), el mecanismo de acción de los factores antisecretorios en el tratamiento de estas enfermedades es diferente del mecanismo de acción de acuerdo

con la presente invención, en el que la resistencia al flujo de salida del humor acuoso a través del ángulo iridocorneal del ojo al sistema venoso se reduce por los factores antiseoretos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta no obstante, que la hipertensión intraocular en una etapa posterior puede o no dar lugar al glaucoma.

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere por tanto al uso de una proteína antisecretora y/o un homólogo, o fragmento de la misma que tiene actividad antisecretora, es decir, un factor antisecretor, y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un producto farmacéutico composición para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión intraocular.

10 El factor antisecretor es una proteína que se produce de forma natural en el cuerpo. El factor antisecretor humano es una proteína de 41 kDa, que comprende 382 aminoácidos cuando se aíslan a partir de la glándula pituitaria. El sitio activo con respecto al efecto de disminución de la presión intraocular según la presente invención parece estar localizado en una región cerca del N terminal de la proteína, localizado en los aminoácidos 1-163 de la SEQ ID NO 6, o en fragmentos de esta región.

15 Los presentes inventores han demostrado que el factor antisecretor es hasta cierto punto homólogo de la proteína S5a, también denominada Rpn 10, que constituyen una subunidad de un constituyente predominante en todas las células de vertebrados, el proteosoma 26 S, más específicamente en la pestaña 19 S/PA 700. En la presente invención, las proteínas antisecretoras se definen como una clase de proteínas homólogas que tienen las mismas propiedades funcionales. Los proteosomas tienen una multitud de funciones relacionadas con la degradación de las proteínas sobrantes, así como proteínas de corta duración, no deseadas, desnaturalizadas, mal plegadas y con cualquier otra anomalía. Además, el factor antisecretor /S5a/Rpn10 está involucrado en la distribución celular y en el transporte de constituyentes celulares, la mayoría evidentemente proteínas, como se describe más detalladamente en los libros de texto comúnmente disponibles.

20 Los homólogos y los fragmentos de las proteínas y/o los péptidos antisecretos de acuerdo con la presente invención tienen todos una actividad biológica análoga de ser capaces de disminuir la presión intraocular. Los homólogos antisecretos y los fragmentos, en el presente contexto, comprenden al menos 4 aminoácidos de una proteína antisecretora de origen natural, que se puede modificar adicionalmente mediante el cambio de uno o más aminoácidos con el fin de optimizar la actividad biológica del factor de antisecretor en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular.

25 Un fragmento de una proteína antisecretora comprenderá generalmente la secuencia de aminoácidos/ péptidos o un fragmento de los mismos en una preparación en la que más del 90%, por ejemplo 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la proteína de la preparación es una proteína, péptido y/o fragmentos de los mismos de la invención.

30 Además, cualquier secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica, tales como al menos 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína antisecretora, péptido, homólogo, y/o fragmento de acuerdo con la invención, también se considera que esta dentro del alcance de la presente invención. En el presente contexto los términos homólogos e identidad se usan indistintamente, es decir, una secuencia de aminoácidos que tiene un grado específico de identidad con otra secuencia de aminoácidos tiene el mismo grado de homología con una secuencia de aminoácidos específica.

35 Los factores antisecretos de acuerdo con la invención pueden comprender un grupo protector del N y/o del C terminal. Un ejemplo de grupo protector del N terminal incluye un acetilo. Un ejemplo de un grupo protector del C terminal incluye una amida.

40 Por proteínas, homólogos, péptidos y/o fragmentos de los mismos que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica al menos por ejemplo en un 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos de por ejemplo, el péptido es idéntica a la secuencia de referencia, con la excepción de que la secuencia de aminoácidos pueda incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5% de los aminoácidos de la secuencia de referencia puede ser eliminado o sustituido por otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta un 5% de los aminoácidos totales de la secuencia de referencia puede ser insertado en la secuencia de referencia.

45 Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas bien de manera individual entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

50 En la presente invención, un programa de algoritmo local es el más adecuado para determinar la identidad. Los programas de algoritmos locales, (como Smith-Waterman) comparan una subsecuencia de una secuencia con una subsecuencia en una segunda secuencia, y encuentran la combinación de subsecuencias y el alineamiento de las subsecuencias, que produce la mayor puntuación global de similitud. Los espacios internos, si se permiten, se

penalizan. Los algoritmos locales funcionan bien para comparar dos proteínas multidominio, que tienen en común un único dominio o simplemente un sitio de unión.

Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas de acceso público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete de programas GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de análisis de la secuencias tiene una matriz de puntuación por defecto y penalizaciones por espacios por defecto. En general, se espera que un biólogo molecular utilice las configuraciones predeterminadas establecidas por el programa de software seleccionado.

5 Las proteínas antiselectoras o un péptido o un homólogo, o un fragmento de las mismas que tiene actividad antiselectoras de acuerdo con la presente invención pueden tener 4 aminoácidos o más, tales como 5-16 aminoácidos, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos o más. En otras realizaciones preferidas el factor antiselector consiste en 42, 43, 45, 46, 51, 80, 128, 129 o 163 aminoácidos. En realizaciones preferidas el factor antiselector consiste en 5, 6, 7, 8 ó 16 aminoácidos.

15 En otra realización preferida, la proteína antiselectoras, péptido y/o homólogo, o fragmento de la misma que tiene actividad antiselectoras de acuerdo con la presente invención consiste en una secuencia de acuerdo con las siguientes fórmulas:

X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5

20 donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.

25 El factor antiselector de acuerdo con la presente invención puede producirse *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, de forma recombinante, sintetizado químicamente, y/o aislado de una fuente natural de factores antiselectores, como de las glándulas pituitarias de cerdo o los huevos de las aves. Después de la producción, los factores antiselectores pueden procesarse adicionalmente, mediante la escisión química o enzimática de fragmentos activos antiselectores más pequeños o por modificación de los aminoácidos. Es en la actualidad no es posible obtener el factor antiselector en forma pura mediante la purificación. Sin embargo, es posible producir una proteína del factor antiselector biológicamente activa de forma recombinante como se describe previamente en el documento WO 97/08202 y WO 05/030246. Los documentos WO 05/030246 y WO 97/08202 también describen la producción de fragmentos biológicamente activos de esta proteína.

30 El factor antiselector de acuerdo con la invención puede comprender además un grupo protector del N terminal y/o del C terminal. Un ejemplo de un grupo protector del N terminal incluye un acetilo. Un ejemplo de un grupo protector del C terminal incluye una amida.

35 El término "sal farmacéuticamente activa", se refiere a una sal de una proteína antiselectoras, que puede ser cualquier sal derivada de la misma, sobre la base de la llamada serie Hofmeister. Dado que las proteínas y péptidos son anfóteros, sin limitar el alcance de la invención, el término "sal farmacéuticamente aceptable" por lo tanto cuando se almacenan, por ejemplo, como trifluoroacetato o acetato, también se refiere a una forma más estable de un factor antiselector de acuerdo con la invención.

La composición farmacéutica o medicamento de la invención pueden comprender adicionalmente uno o más portadores, receptores o diluyentes farmacológicamente aceptables tales como los conocidos en la técnica.

40 Las composiciones o medicamentos pueden estar en forma de, por ejemplo, líquidos, semi-líquidos, composiciones sólidas o semisólidas tales como, pero no limitado a, líquidos de transfusión disueltos, tales como disolución salina estéril, disoluciones de varias sales, disoluciones de glucosa, disolución salina de amortiguador fosfato, sangre, plasma o agua, polvos, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, pulverizadores, aerosoles, dispositivos de inhalación, soluciones, dispersiones, suspensiones, emulsiones y mezclas de los mismos. Las composiciones pueden tener en cuenta la estabilidad y la reactividad de los péptidos o de la proteína.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, por ejemplo de acuerdo con "Remington: The science and practice of pharmacy", 21<sup>th</sup> edition, ISBN 0-7817-4673-6 o "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2<sup>nd</sup> edition, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7.

50 En una realización preferida de la presente invención el factor antiselector es una proteína antiselectoras con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 6 o un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 38-42 de la SEQ ID NO 6.

55 En una realización preferida de la presente invención el factor antiselector es una selección de la SEQ ID NO por 1-6, es decir, VCHSKTRSNPENNVGL (SEQ ID NO 1, en este contexto también llamada AF-16), IVCHSKTR (SEQ ID NO 2), VCHSKTR (SEQ ID NO 3), CHSKTR (SEQ ID NO 4), o la secuencia de aminoácidos de una proteína antiselectoras de acuerdo con SEQ ID NO 6 (también se muestra en la Figura 4) utilizando las abreviaturas de una

letra comunes para los aminoácidos. Las SEQ ID NO 1, 2, y 3 se han descrito previamente en, por ejemplo WO 05/030246 y la SEQ ID NO 6 en el documento US 6344440. Como se especifica en la lista de secuencias adjunta, algunos de los aminoácidos en las secuencias anteriormente especificados pueden sustituirse por otros aminoácidos. En lo que sigue en este párrafo, la posición de un aminoácido particular en una secuencia de aminoácidos particular se calcula desde la izquierda, que indica al aminoácido más N-terminal en la posición 1 de esa secuencia particular. Cualquier sustitución de aminoácidos como se especifica a continuación puede realizarse independientemente de cualquier otra sustitución de aminoácidos en esa secuencia. En SEQ ID NO 1, la C de la posición 2 puede ser sustituida por S, la H de la posición 3 puede ser sustituida por R o K, la S de la posición 4 puede ser sustituida por L, y/o la T de la posición 6 puede ser sustituida por A. En la SEQ ID NO 2, la C de la posición 3 puede ser sustituida por S, la H de la posición 4 puede estar sustituida por R o K, la S de la posición 5 puede ser sustituida por L, y/o la T de la posición 7 puede ser sustituida por A. En la SEQ ID NO 3, la C de la posición 2 puede ser sustituida por S, la H de la posición 3 puede ser sustituida por R o K, la S de la posición 4 puede ser sustituida por L, y/o la T de la posición 6 puede ser sustituida por A. En la SEQ ID NO 4, la C de la posición 1 puede ser sustituida por S, la H de la posición 2 puede ser sustituida por R o K, la S en la posición 3 puede ser sustituida por L, y/o la T en la posición 5 puede ser sustituida por A. En la SEQ ID NO 5, la H en la posición 1 puede ser sustituida por R o K, la S en la posición 2 puede ser sustituida por L, y/o la T en la posición 4 puede ser sustituida por A.

En una realización preferida de la presente invención, dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 1.

En una realización preferida de la presente invención, dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 2.

En una realización preferida de la presente invención, dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 3.

En una realización preferida de la presente invención, dicho fragmento comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 4.

También se pretende con la presente invención la combinación de dos o más cualquiera de los factores antiseoretos de acuerdo con la presente invención, opcionalmente también en combinación con yema de huevo enriquecida con los factores antiseoretos.

En una realización preferida de la presente invención el factor antisecretor se utiliza para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de, o en un método de tratamiento y/o la prevención de la hipertensión intraocular, en donde la tensión intraocular es de 21 mm Hg o más, 22 mm Hg o más. En otra realización preferida de la presente invención, la tensión intraocular es normal o incluso baja, es decir por debajo de 21-24 mm Hg, preferiblemente por debajo de 10-12 mm Hg, entre 11-21 mm Hg. Un IOP por debajo de 11 mm Hg, por debajo de 10 mm Hg, por debajo de 10 mm Hg 12, se considera como inferior a la normal, es decir baja. Los efectos beneficiosos de la administración de las composiciones farmacéuticas según la presente invención también a los mamíferos que tienen una presión intraocular que es normal, o incluso por debajo de lo normal, es que esos mamíferos también pueden tener picos en la presión intraocular durante el día, que pueden ser entonces tratados y/o evitados por las composiciones farmacéuticas de la invención. En otra realización preferida la tensión intraocular es superior a 21 mm Hg, tal como 21-24 mm Hg, tal como 22-30mm Hg.

También se pretende con la presente invención la posibilidad de tratar y/o prevenir la hipertensión intraocular y/o preparar una composición farmacéutica usando la yema de huevo enriquecida con factores antiseoretos. El documento SE 9000028-2 describe cómo la formación de factores antiseoretos se puede estimular en las aves y recuperar o concentra los factores antiseoretos de hidrolizados de yema de huevo. El documento WO 00/38535 describe además cómo estos factores antiseoretos recuperados o concentrados se pueden administrar a animales o a seres humanos con un alimento o un pienso, o, como productos más o menos aislados, formulados en productos farmacéuticos. Por lo tanto, también se pretende con la presente solicitud el uso de yema de huevo enriquecida con factores antiseoretos para la preparación de productos, tales como composiciones farmacéuticas, para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular o para uso en este método de tratamiento. En una realización preferida, dicha proteína antisecretora se proporciona en una concentración de al menos 1000 unidades FIL / ml en la yema de huevo. A partir de ahora en este contexto la unidad FIL corresponde a una reducción del 50% del flujo de fluido en el intestino comparado con un control sin suministro de factores antiseoretos, como se describe en el documento WO 00/38535 y SE 9000028-2. El factor antisecretor de acuerdo con la presente invención puede por lo tanto también ser administrado en la forma de un "alimento médico". En el presente contexto, un alimento médico se refiere a un alimento, que ha sido preparado con una composición con una proteína antisecretora. Este alimento puede ser cualquier alimento adecuado, en forma líquida o sólida, tales como un líquido o un polvo, o cualquier otra sustancia alimenticia adecuada. Ejemplos de estas sustancias se pueden encontrar en el documento WO 00/38535.

En una realización preferida de la presente invención, la hipertensión intraocular que se va a tratar y/o prevenir está causada por una resistencia del flujo de salida del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo.

En otra realización preferida la composición farmacéutica utilizada según la presente invención reduce la resistencia del flujo de salida del humor acuoso desde la cámara anterior a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm.

5 En una realización de la presente invención la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección de excipientes farmacéuticamente aceptables y su concentración óptima para el uso según la presente invención pueden determinarse fácilmente por el experto mediante experimentación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para el uso según la presente invención incluyen disolventes, agentes amortiguadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o disolventes.

10 Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es sustancialmente inocua para el individuo al que se administra la composición. Este excipiente normalmente cumple con los requisitos dados por las agencias nacionales de medicamentos. Las farmacopeas oficiales, como la Farmacopea los Estados Unidos de América y la Farmacopea Europea establecen normas bien conocidas para los excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Lo que sigue es una revisión de las composiciones farmacéuticas relevantes para su uso según la invención. La revisión se basa en la vía de administración específica. Sin embargo, se aprecia que en aquellos casos en los que un excipiente farmacéuticamente aceptable se puede emplear en diferentes formas de dosificación o composiciones, la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable específico no se limita a una forma de dosificación particular o a una función particular del excipiente.

Composiciones parenterales:

20 Para la aplicación sistémica, las composiciones según la invención pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales no tóxicos y excipientes, incluyendo microesferas y liposomas.

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden incluir todo tipo de composiciones sólidas, semisólidas y líquidas.

25 Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes amortiguadores, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o diluyentes. A continuación se incluyen ejemplos de los diferentes agentes.

Ejemplos de diversos agentes:

Los ejemplos de disolventes incluyen, pero no se limitan al agua, alcoholes, sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido de ascitis y líquido linfático.

30 Los ejemplos de agentes amortiguadores incluyen, pero no se limitan al ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido hidrogenofosfórico, bicarbonatos, fosfatos, dietilamina, etc.

Los ejemplos de agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a EDTA de sodio y ácido cítrico.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a hidroxibutilanisol (BHA), ácido ascórbico y derivados del mismo, tocoferol y derivados del mismo, cisteína, y mezclas de los mismos.

35 Los ejemplos de disolventes y agentes disgregantes incluyen, pero no se limitan a lactosa, sacarosa, emdex, fosfatos de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio, manitol, almidones y celulosa microcristalina.

Los ejemplos de aglutinantes incluyen, pero no se limitan a sacarosa, sorbitol, goma de acacia, alginato de sodio, gelatina, almidones, celulosa, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

40 La composición farmacéutica o la sustancia utilizada de acuerdo con la invención se administran preferiblemente a través de infusión intravenosa periférica o por medio de una inyección intramuscular o subcutánea en el paciente o por vía bucal, pulmonar, nasal, cutánea o vías orales. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica o la sustancia farmacéuticamente activa a través de un tubo insertado quirúrgicamente en un ventrículo del cerebro del paciente.

45 En una realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se formula para la administración intraocular, intranasal, oral, subcutánea y/o sistémica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar una o más veces al día. En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se formula para administración como un spray, aerosol, por medio de un nebulizador o de un inhalador. En otra realización preferida, la composición de la invención sirve para ser administrada mediante la aplicación como una suspensión o, incluso más preferiblemente, un polvo para inhalación con un spray, aerosol o nebulizador nasal y/o para el tracto respiratorio. Un nebulizador es un dispositivo médico que proporciona un medicamento líquido en forma de vapor a las vías respiratorias. Los compresores de los nebulizadores fuerzan el aire a través del tubo en un recipiente para medicamentos lleno con el medicamento líquido. La fuerza del aire

rompe el líquido en partículas diminutas de vapor que pueden ser inhaladas profundamente por las vías respiratorias. El término "aerosol" en el presente contexto, se refiere a una suspensión gaseosa de partículas finas sólidas o líquidas. La composición farmacéutica en forma de polvo que comprende los factores antisecretores tiene ventajas adicionales en términos de la estabilidad y la dosificación del polvo seco y de que puede ser administrada con un inhalador. La composición farmacéutica también puede ser aplicada de forma tópica al ojo, de forma intraocular, intranasal, oral, subcutánea y/o de manera sistémica a través de los vasos sanguíneos. En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para administración tópica en el ojo. Normalmente, cuando se usa para la aplicación tópica en el ojo, la concentración diaria aplicada de la composición de la invención es de 1 µg a 10 mg por aplicación, de 1 µg a 1 mg por aplicación, preferiblemente de 50-1000 µg por día, 50-500 µg por día, 50-250 µg por día, 100-250 µg por día, 500-250 µg por día, 500-750 µg por día, o 50-100 µg por día, ya sea como una dosis única al día o repetida varias veces al día y ojo. Cuando se administra sistémicamente a la sangre, la dosis está normalmente en el intervalo de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y por kg de peso corporal y día, tal como 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000 µg/kg de peso corporal, preferiblemente otra vez de 1-100 µg/kg de peso corporal, ya sea como una sola dosis al día o repetida varias veces por día. Cuando la yema de huevo enriquecida con factores antisecretores se utiliza de acuerdo con la presente invención, este se administra preferiblemente por vía oral. Una característica importante de la proteína AF, del péptido, fragmento y/o derivado de la misma es que no se han mostrado efectos secundarios locales o sistémicos incluso a dosis altas, lo que permite el tratamiento intenso sin riesgos conocidos.

La presente invención también se refiere al uso de una proteína antisecretora o un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la preparación de una composición farmacéutica para administración intraocular.

La presente invención también se refiere a un péptido como se muestra en la SEQ ID NO 4, un homólogo, y/o fragmento de la misma per se. La invención se refiere además al uso de un péptido de acuerdo con SEQ ID NO 4 para uso médico.

Un péptido de este tipo también se describe en una solicitud en tramitación del mismo solicitante para el uso en la preparación de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención del síndrome compartimental.

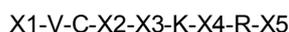
La presente invención también se refiere a un método para tratar y/o prevenir la hipertensión intraocular en un mamífero que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene actividad antisecretora actividad, y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Las composiciones farmacéuticas para uso en este método se han descrito anteriormente.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para tratar y/o prevenir la hipertensión intraocular en un mamífero que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína antisecretora, un homólogo y/o fragmento de la misma que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En una realización preferida, el método de acuerdo con la presente invención comprende administrar dicha composición farmacéutica de forma intraocular.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención dicha composición farmacéutica comprende uno o más de los fragmentos que comprenden una secuencia de aminoácidos como se muestra en las secuencias SEQ ID NO a 1-6.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia de acuerdo con las siguientes fórmulas:



donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la proteína antisecretora es una proteína con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 6, un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 38-42 de la SEQ ID NO 6.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicho fragmento de una proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 1.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicho fragmento de una proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como en SEQ ID NO 2.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicho fragmento de una proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como en SEQ ID NO 3.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicho fragmento de una proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos como en SEQ ID NO 4.

- 5 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, dicha composición farmacéutica comprende dos o más de cualquiera de los factores antisecretores según la presente invención, opcionalmente también en combinación con la yema de huevo enriquecida en factores antisecretores.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención la tensión intraocular en el mamífero es de 21 mm Hg o más.

- 10 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención la tensión intraocular es normal o baja.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la proteína antisecretora se suministra en la yema de huevo enriquecido con esta proteína antisecretora, y esta proteína antisecretora se proporciona preferiblemente en una concentración de al menos 1000 unidades FIL/ ml en dicha yema de huevo.

- 15 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la hipertensión intraocular está causada por una resistencia del flujo de salida del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención la composición farmacéutica reduce la resistencia del flujo de salida del humor acuoso desde la cámara anterior a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm.

- 20 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención la composición farmacéutica se formula para administración intraocular, intranasal, oral, subcutánea y/o la sistémica.

- 25 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se formula como un spray, aerosol, o para la administración mediante un nebulizador o un inhalador.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra sistémicamente a la sangre en una dosis de 0,1  $\mu$ g a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-1000  $\mu$ g por aplicación y kg de peso corporal. Una característica importante de la proteína AF, péptido, fragmento de la misma es que no se han manifestado efectos secundarios locales o sistémicos incluso a dosis altas, lo que permite un tratamiento intenso sin riesgos conocidos.

- 30

En una realización igualmente preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra sistémicamente a la sangre a una dosis de 0,1  $\mu$ g a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, como por ejemplo a una dosis de 0,1  $\mu$ g a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, preferiblemente 1-100  $\mu$ g por aplicación y kg de peso corporal.

- 35 En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención la composición farmacéutica se formula para administración tópica en el ojo.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra localmente a una dosis de 1  $\mu$ g a 10 mg por aplicación, preferentemente 50-1000  $\mu$ g, al día.

- 40 En una realización igualmente preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra a una dosis de 0,1  $\mu$ g a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal y día, como por ejemplo a una dosis de 1  $\mu$ g a 1 mg por aplicación, preferiblemente de 50 - 250  $\mu$ g, al día.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica se administra una o más veces al día.

Sección experimental

- 45 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes (New Zealand White, NZW) mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP, ya que la IOP en conejos normales aumenta cuando se inicia la

oscuridad. El depósito unilateral de 10-50 µg de AF-16 (SEQ IN NO 1) (disuelto en PBS con etanol añadido al 10 o 50%) entre el bulbo ocular y la cápsula de Tenon dio como resultado en conejos anestesiados una caída transitoria de la IOP de 2,5 mm Hg en 2 h, según se determinó con la ayuda de un TonoPen® (Medtronic Inc., Minneapolis MN, EE.UU.). Se inyectó el colorante fluoresceína (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO, EE.UU.; sal de sodio, disuelto en PBS) por vía intravenosa y se determinó la aparición del trazador determinado con un microscopio de operación, equipado con una de lámpara de hendidura. No hubo diferencias con respecto al momento de aparición de la fluoresceína entre el ojo tratado con AF-16 y el ojo opuesto tratado sólo con el vehículo.

El procedimiento descrito se repitió y se documentó el mismo resultado. Se consiguió un efecto similar de reducción de la IOP con una dosis más alta, 100 µg de AF-16. Por lo tanto, se concluye que la producción del AH obviamente no se vio marcadamente afectada por el tratamiento con AF-16, tal como se refleja en el hecho demostrado de que el trazador utilizado, fluoresceína, aparece más o menos de manera simultánea en los ojos tratados con AF-16 y en los tratados con el vehículo, respectivamente.

#### Ejemplo 2

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. El depósito unilateral de 10-50 µg de AF-16 (disuelto en 50 o 10µL de PBS con etanol añadido al 10 o 50%) entre el bulbo ocular y la cápsula de Tenon dio como resultado en conejos anestesiados una caída de la IOP de ≈ 2,5 mm Hg en 2 h, según se determinó con la ayuda de un TonoPen®. A continuación se inyectaron, 20 o 50 pL de una solución en PBS, que contiene 3% de azul de Evans (Merck, Sigma) y 2% de albúmina de suero bovino (Sigma), en los dos ojos a través de la pars plana en el límite entre la cámara posterior del ojo y el cuerpo vítreo. Se rodearon con suturas oftálmicas los lugares de inyección para evitar el reflujo y las fugas. Se observó que el colorante azul entraba en la cámara anterior y salía del ojo a través de las venas episclerales, más rápidamente en el ojo pre-tratado con AF-16 que en el ojo opuesto tratados solamente con el vehículo. El experimento se repitió otra vez al día siguiente con el mismo resultado. Por lo tanto, el flujo de salida del AH, tal y como se visualiza por el complejo albúmina-colorante a través del ángulo iridocorneal en el canal de Schlemm y sus venas de conexión, fue aparentemente facilitado por la aplicación del péptido AF-16.

#### Ejemplo 3

Los animales anestesiados adultos tendrán el flujo de AH y la resistencia al flujo de salida determinado de acuerdo con la técnica de succión perilímbica, un enfoque establecido y publicado en varias ocasiones. Se utilizarán enfoques adicionales para determinar estos parámetros. Se obtendrán con ello figuras cuantitativas y cualitativas con respecto a los efectos de AF-16 sobre la dinámica del AH y de la IOP en los animales normales y en los animales con IOP elevada experimentalmente. Lo mismo sucede para los animales con hipertensión intraocular congénita.

#### Ejemplo 4

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, la IOP aumenta varios mm Hg durante las primeras horas de oscuridad. La inyección unilateral (50 a 250 µL) de hasta 100 µg de AF-16, disuelta en PBS, con etanol añadido al 10%, bajo la cápsula de Tenon a los animales anestesiados causa en una hora una caída significativa de la IOP, hasta 5 mm Hg, en comparación con la IOP en el ojo opuesto, en el que solo se aplicó vehículo (PBS con 10% de etanol). La reducción de la IOP después del tratamiento con AF-16 persistió durante al menos 4 h, y luego se volvió igual a la del ojo opuesto como se determinó al día siguiente. Fue posible repetir estos resultados durante 3 días consecutivos, y en 3 conejos. Se concluye que la AF-16 reduce de manera eficiente la IOP en un ojo normal con pocos mm Hg, lo que se corresponde con lo que se ha publicado que se logra con otros fármacos utilizados para reducir la IOP.

#### Ejemplo 5

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. Una doble aplicación unilateral con un intervalo de 2 min de 25 µg de AF-16 (en total 50 µg), en 25 µL de disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), en el fórnix conjuntival inferior (fondo de saco) a los animales anestesiados dio como resultado después de una hora una caída de la IOP de 1,5 – 2,5 mm Hg, en comparación con la IOP en el ojo opuesto, en el que solo se aplicó el vehículo PBS. La reducción de la IOP tras el tratamiento con AF-16 persistió durante al menos 4 h, y luego se volvió igual a la del ojo opuesto al día siguiente.

Fue posible repetir estos resultados durante 2 días consecutivos, y en 2 conejos. Por lo tanto, estos experimentos demuestran que la aplicación local de AF-16 en el fondo de saco de conejos normales tiene como resultado una disminución transitoria de la IOP.

#### Ejemplo 6

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. Una doble aplicación unilateral con un intervalo de 2 min de 50 µg de AF-16 (en total 100 µg), en 50 µL de PBS, en el fondo de saco inferior realizado a animales anestesiados dio como resultado después de una hora una caída de la IOP de 2 - 4 mm Hg, en comparación con la IOP en el ojo opuesto, en el que solo se aplicó el vehículo PBS. La reducción de la IOP tras el tratamiento con AF-16 persistió durante al menos 4 h, y luego se volvió igual a la del ojo opuesto al día siguiente. Fue posible repetir estos resultados durante 3 días consecutivos, y en 2 conejos. Se concluye que el tratamiento local de un ojo normal con una dosis doble de AF-16, como se indica en el Ejemplo 5, reducen también transitoriamente la IOP, sin efectos secundarios locales o sistémicos obvios reconocidos.

#### Ejemplo 7

El objetivo de este experimento, realizado en nombre del solicitante por Visionar AB, Uppsala, Suecia, era estudiar la dinámica de la IOP en conejos después de un tratamiento tópico con AF-16, y comparar los efectos logrados con los del fármaco Timolol® (2,5 mg / mL; Alcon Sweden AB, Estocolmo, Suecia), conocido por reducir la hipertensión intraocular, y el vehículo, PBS. Veinte conejas albinas NZW, con un peso de 2,1-2,4 kg, se compraron y alojaron individualmente en jaulas individuales con libre acceso a los alimentos (K1, Lactamin, Estocolmo, Suecia) y agua del grifo. El ciclo de la luz del día se reguló manteniendo la luz encendida entre 9 AM y 9 PM. Durante un largo período de aclimatación de 3 semanas, los animales fueron entrenados a diario para las condiciones de la prueba de medir la IOP después de haber aplicado anestesia local a la córnea.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos:

Grupo 1, (n = 10). Estos animales recibieron 2 gotas de AF-16 (en total 50 µg, en 50 µL de PBS) en un ojo y el mismo volumen, 2 x 25 µL, del vehículo, PBS, en el ojo opuesto.

Grupo 2, (n = 10). Estos animales recibieron 1 gota (50 µL de Timolol®; 125 µg) en un ojo y el mismo volumen de PBS en el otro ojo. El Timolol® es conocido por reducir la presión intraocular en conejos y por lo tanto se utilizó para validar el modelo, como una referencia. Se midió la IOP mediante un TonoPen XL® (Medtronic) después de aplicar 1 gota de Tetrakain Chauvin® (Novartis Ophthalmics, Täby, Suecia) en cada córnea como un anestésico local. En el protocolo final, se programaron por lo tanto dos series de mediciones. Una serie después de 5 días de tratamiento local con AF-16 y el vehículo, y otra serie después de 5 días de tratamiento local con Timolol® o el vehículo.

En la primera medición se esperaba encontrar el efecto reductor de la IOP del Timolol® en la 5ª y la 6ª de medición puesto que se esperaba que la IOP aumentase debido al ciclo diurno. El último día de mediciones de la IOP se realizaron durante un período prolongado (1, 2, 3,25, 4,25, 5,5, 6,5, 7,75, 9, y 10 h después del comienzo de la oscuridad en el alojamiento de los animales) para asegurarse de que los datos podrían ser obtenidos durante un período prolongado. Los resultados se presentan en la Figura 3 adjunta. La IOP al inicio del período de tratamiento del día 5 se muestra en la Figura 2. No se observaron efectos adversos o complicaciones en el tratamiento con AF-16 local o sistémico.

Es evidente a partir de los datos que AF-16 tenía un efecto reductor sobre la presión intraocular, que difiere significativamente de la IOP medida después del tratamiento sólo con el vehículo, PBS. Los efectos altamente significativos ejercidos por AF-16 fueron comparables a los de Timolol® (Figura 3). Se concluye que estos datos indican que AF-16 puede ser tan eficaz para bajar la IOP en conejos como el medicamento utilizado normalmente (Timolol®), conocido por tener tales efectos. Por lo tanto AF-16 puede ser útil en el tratamiento de la hipertensión intraocular en seres humanos.

#### Ejemplo 8

Se ajustó el ritmo diurno de dos conejos adultos jóvenes normales NZW (2,4-2,9 kg, hembras) mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. La doble aplicación unilateral con un intervalo de 2 min de 50 o 100 µg del hexa-péptido sintético CHSKTR (en total 100-200µg), cada vez en 50 µL de PBS, en el fondo de saco inferior (fórnix conjuntival inferior) de animales anestesiados dio como resultado después de una hora un descenso del IOP de 2-3 mm Hg, en comparación con la IOP del ojo opuesto, al que se había aplicado el vehículo. La reducción de la IOP tras el tratamiento con el hexapéptido persistió durante al menos 2 h, y luego se volvió igual a la del ojo opuesto como se determinó al día siguiente. Se consiguieron estos resultados en 2 conejos. Se concluye que el tratamiento local de un ojo normal con un péptido sintético, aplicado en el saco lagrimal inferior, y que tienen partes de la secuencia activa de la proteína antisecretora de la SEQ ID NO 6, CHSKTR (SEQ ID NO 4), reduce la IOP.

#### Ejemplo 9

Se ajustó el ritmo diurno de dos conejos adultos jóvenes normales NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía

la dinámica diurna de la IOP. Los animales anestesiados recibieron unilateralmente 50 o 100 µg del hexapéptido sintético CHSKTR, disuelto en 100µL de PBS con etanol al 10% inyectados en una posición temporal bajo la cápsula de Tenon, lo cual dio como resultado después de 30 minutos un descenso del IOP de 2-4 mm Hg, en comparación con la IOP del ojo opuesto, al que se había aplicado el vehículo al mismo tiempo. La reducción de la IOP tras el tratamiento con el hexapéptido persistió durante al menos 2 h. La IOP resultó en ambos animales igual a la del ojo opuesto tal y como se determinó al día siguiente. Se consiguieron estos resultados en dos días consecutivos. Se concluye que el tratamiento local de un ojo normal mediante la inyección de la sustancia de ensayo en el exterior del globo ocular, con un péptido sintético, que tiene partes de la secuencia activa de la proteína antisecretora SEQ ID NO 6, CHSKTR (SEQ ID NO 4), reduce la IOP, sin inducir ningún efecto SIED locales o sistémicos.

#### 10 Ejemplo 10

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes normales NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. La inyección intravenosa de AF-16, en cualquiera de los dos niveles de dosis, 50 o 100 o 1000 µg / kg de peso corporal, disuelta en PBS con etanol añadido al 10%, a conejos anestesiados, dio como resultado después de una hora un descenso de la IOP de 2 - 3 mm Hg en cada ojo, si se compara con la IOP medida justo antes de la inyección de la AF-16. La reducción de la IOP después del tratamiento con AF-16 persistió durante al menos 2 h. No hubo una diferencia evidente entre la IOP del ojo izquierdo y derecho de estos animales. La IOP se midió en cada uno de los ojos una vez más al día siguiente y regresaron a valores cercanos a los del día anterior al tratamiento con AF-16. No se observaron efectos secundarios aparentes. Se concluye que una inyección intravenosa de AF-16 bien con 50, 100 o, de manera más eficiente con 1.000 µg / kg de peso corporal dio como resultado una reducción de la IOP, demostrable a la hora y que persiste durante varias horas y que la IOP volvió a la nivel original después de un día. Ambos ojos de los conejos tratados mostraron el mismo patrón dinámico con respecto a los efectos de la AF sobre la IOP. Se concluye que el péptido AF-16 administrado por vía intravenosa, es decir, por vía sistémica, reduce de manera eficaz la IOP, pero en un grado aceptable, sin causar hasta ahora una disminución anormal de la IOP.

#### Ejemplo 11

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes normales NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. Se realizó la aplicación intranasal de AF-16, 50, 100 o 1.000 µg / kg de peso corporal, disuelta en PBS, en 3 conejos anestesiados y dio como resultado después de una hora una disminución en el IOP de al menos 2 mm Hg en cualquiera de los ojos, si se compara con el IOP medido justo antes de la aplicación de AF-16 en una fosa nasal. La reducción de la IOP después del tratamiento con la dosis alta de AF-16 persistió durante 2 y 3 h, que fueron los períodos de tiempo investigados. No hubo diferencias entre la IOP del ojo izquierdo y derecho del mismo animal. La IOP se midió en cada uno de los ojos una vez más al día siguiente y volvió aproximadamente a los valores del día anterior antes del tratamiento de la FA-16. No se observaron efectos secundarios aparentes. Se concluye que una infusión intranasal de hasta 1000 µg / kg de AF-16 dará lugar a una reducción de la IOP, demostrable en 1 h y que persiste durante al menos 3 h y que la IOP volvió al nivel original en un día. Ambos ojos de cada conejo muestran los mismos patrones de tensión. No se observaron efectos secundarios locales o sistémicos.

#### 40 Ejemplo 12

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes normales NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, se conocía la dinámica diurna de la IOP. Se administró a los conejos en el estómago mientras se encontraban bajo anestesia general 10 g de liofilizado yema de huevo enriquecida en la proteína AF (Salovum™, disueltos en zumo de naranja comercial diluido). Esta aplicación intragástrica de proteínas AF dio como resultado en una hora en un descenso de la IOP en cada ojo, si se compara con la IOP medido justo antes de la aplicación de Salovum™. No había diferencias entre la IOP del ojo izquierdo y derecho del animal. La IOP se midió en los dos ojos una vez más al día siguiente y había vuelto aproximadamente a los valores del día anterior antes del tratamiento con AF-16. No se observaron efectos secundarios aparentes. Se concluye que la ingestión oral de yema de huevo enriquecida con proteínas antisecretoras, por ejemplo, Salovum™, daba como resultado una reducción de la IOP, demostrable en aproximadamente una hora y que persiste durante unas pocas horas y que la IOP volvió al nivel original en un día. Ambos ojos mostraron el mismo patrón para la IOP.

#### Ejemplo 13

Un conejo adulto joven NZW con buftalmos leves unilaterales (globo ocular izquierdo abultado) se anestesió y se midió la IOP con ayuda de un tonómetro TonoPen®. La IOP en el ojo buftálmico era de 30-32 mm Hg, mientras que en el otro ojo normal era de 11 - 12 mm Hg, como se comprobó en varias ocasiones. Una inyección unilateral de 50 µg de AF-16 en 100 µL PBS con etanol al 10% en una posición temporal bajo la cápsula de Tenon a los animales anestesiados dio como resultado en una hora a una disminución de la IOP de 14 - 16 mm Hg. La inyección de la misma cantidad de AF-16 en el ojo opuesto dio como resultado una caída de casi 2 mm Hg, tal como se determinó

con un TonoPen®. La IOP en el ojo izquierdo buffálmico había aumentado al día siguiente justo por encima de 30 mm Hg, es decir, volvió a su nivel original. Otra Inyección más de AF-16 dio lugar de nuevo a las 2 horas a una IOP de 15 - 16 mm Hg, mientras que la misma dosis de AF 16 redujo la IOP en el ojo derecho solamente 1-2 mm Hg. No se observaron efectos secundarios aparentes. Por tanto, se concluyó que la aplicación local mediante inyección en el globo ocular disminuye transitoriamente la presión intraocular elevada en un ojo buffálmico a niveles normales.

Ejemplo 14

Se ajustó el ritmo diurno de conejos adultos jóvenes normales NZW mediante la exposición de los animales a la oscuridad de 9 am a 9 pm mientras que la luz se mantenía encendida de 9 pm a 9 am. De esta manera, la dinámica de la IOP se sincroniza con las alteraciones diurnas de la IOP. La exposición de estos conejos a un impulso de aceleración de rotación sagital, como se describe en una reciente publicación en una revista científica médica internacional (Krave U, Höjer S & Hansson H.-A., European J Neuroscience, 21, 2867-2882, 2005, publicada durante la presente investigación, daña el ojo además de causar una lesión cerebral difusa. La exposición de las cabezas de conejos anestesiados a un impulso de aceleración de rotación sagital antero-posterior o a un impulso de aceleración de rotación sagital postero-anterior con una fuerza de hasta 200 Krad/s<sup>2</sup> dando lugar a una distorsión mecánica y a una carga de fuerza en el ojo. La IOP aumentó durante los 30 minutos siguientes a 35 - 40 mm Hg, tal como se determinó con un tonómetro TonoPen® en animales anestesiados y permaneció elevada durante unas pocas horas. La aplicación de 100 µg por kg de peso corporal de AF-16 mediante la inyección de una solución de AF-16 (100 µL de PBS con etanol al 10%) entre la cápsula de Tenon y la esclerótica de la región temporal del ojo 10-30 minutos después del impacto de aceleración de rotación sagital dio como resultado una hora después al retorno de la IOP a niveles casi normales. La IOP en el ojo opuesto, que no recibió ninguna AF-16, se mantuvo elevada.

La exposición de conejos a un impulso de aceleración de rotación sagital dio como resultado grandes alteraciones del citoesqueleto, por ejemplo en las células nerviosas y en las células vasculares (Hamberger et al., 2003). Lo mismo ha sido previamente demostrado tras la exposición de cerebros de cerdo a cargas de alta energía (Suneson et al., 1990). Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que los cambios de la membrana, así como las alteraciones del citoesqueleto en las células de la malla trabecular y en el canal de Schlemm, inducidos por el trauma de aceleración de rotación, dio lugar a la alteración transitoria del flujo de salida del AH desde la cámara anterior, generando una IOP elevada de manera transitoria. El tratamiento local con el péptido AF-16 parece mejorar las IOP elevadas.

Ejemplo 15

Se ocluyará unilateralmente 3 de las 4 venas episclerales de las ratas. De este modo, la sangre venosa del segmento anterior del ojo operado tendrá solamente una única vena para el flujo de salida de la sangre desde el segmento anterior del ojo. Ese tratamiento dará como resultado en pocas semanas una IOP elevada en el ojo tratado. Los ojos con IOP elevada serán tratados de forma tópica y/o sistémica con AF-16 en PBS con el fin de determinar si dicho tratamiento con AF 16 se normalizará la IOP. Estos resultados permitirán el cálculo de la tasa de formación del AH y las características del flujo de salida, haciendo por ello posible localizar el sitio de acción de la AF-16 en la trayectoria del flujo de AH a través del ojo.

Ejemplo 16

Se inyectarán otras ratas con distintas una disolución salina hipertónica en la vena episcleral temporal, mientras que se bloquea transitoriamente el flujo sanguíneo de las otras 3 venas episclerales. Ese tratamiento dará como resultado en unas pocas semanas una IOP elevada en los ojos tratados, de acuerdo con lo que se ha descrito en la literatura por Morrison et al. Los ojos con una IOP elevada serán tratados por vía tópica y/o sistémicamente con AF-16 en PBS con el fin de determinar si dicho tratamiento con AF-16 normalizará la IOP. Estos resultados permitirán el cálculo de la tasa de formación del AH y las características del flujo de salida, haciendo por ello posible localizar el sitio de acción de la AF-16 en la trayectoria del flujo de AH a través del ojo.

Ejemplo 17

Se han criado algunas cepas de roedores, algunas de ellas transgénicas para desarrollar un aumento de la presión intraocular con una frecuencia alta. Se evaluarán en la IOP los efectos de la AF-16, aplicados por vía tópica, local o sistémicamente. Estos resultados permitirán el cálculo de la tasa de formación del AH y las características del flujo de salida, haciendo por ello posible localizar el sitio de acción de la AF-16 en la trayectoria del flujo de AH a través del ojo. Se considera que el uso de tales animales constituye un enfoque estándar para evaluar los fármacos destinados al tratamiento de la hipertensión intraocular.

Resumen y conclusiones

Los experimentos descritos describen de forma desigual que el tratamiento con los factores antisecretores reduce e incluso normaliza las presiones elevadas en el ojo de los mamíferos. Esto demuestra la utilidad de los fármacos que comprenden factores antisecretores, proteínas, péptidos, homólogos y fragmentos, en la práctica clínica para controlar la IOP elevada en pacientes con hipertensión intraocular. Se demostró experimentalmente que el factor

antiselector AF-16 normaliza de manera eficiente la presión en los ojos con IOP elevada. Se considera que el principal efecto que ejerce AF-16 es su capacidad para mejorar el flujo de salida del humor acuoso. Por tanto, se concluye que AF-16 disminuye y normaliza la hipertensión intraocular facilitando la salida del AH a través de las células en la malla trabecular y del canal de Schlemm.

5 Referencias

1. Alvarado JA, Alvarado RG, Yeh RF, Franse-Carman L, Marcellino GR, & Brownstein MJ. A new insight into the cellular regulation of aqueous outflow: how trabecular meshwork endothelial cells drive a mechanism that regulates the permeability of Schlemm's canal endothelial cells. *Bri. J Ophthalmol* 89, 1500-1505, 2005.
- 10 2. Hamberger A, Huang Y-L, Zhu H, Bao F, Ding M, Blennow K, Olsson A, Hansson H.-A., Viano D & Haglid KG. Redistribution of neurofilaments and accumulation of 1 amyloid protein after brain injury by rotational acceleration of a head. *J Neurotrauma* 20, 169-178, 2003.
3. Hogan MJ, Alvarado JA & Weddell JE. *Histology of the human eye*. W B Saunders Co., Philadelphia, PA, USA, 1971
- 15 4. Jermdal T, Hansson H-A & Bill A. *Goniodysgenesis; a new perspective on glaucoma*. Scriptor, Copenhagen, Denmark, 1990
5. Krave U, Höjer S & Hansson H.-A. Transient powerful pressures are generated in the brain by a rotational acceleration impulse to the head. *Europ. J Neuroscience*, 21, 2876-2882, 2005.
6. Krstic R V. *Human microscopic anatomy*. Springer Verlag, Berlin, 1991.
7. Lang GK: *Ophthalmology*. Thieme, Stuttgart, Germany, 2000.
- 20 8. Lange S, & Lönnroth I. The antiselectory factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. *Intern Rev. Cytology* 210, 39-75, 2001
9. Lütjen-Drecoll E. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Progress Retinal Eye Research* 18, 91-119, 1998.
- 25 10. Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, & Jia L. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Progress Retinal Eye Research* 24, 217-240, 2005.
11. Oyster CW. *The human eye; structure and function*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Mass., USA, 1999.
12. Ritch R, Shields MB & Krupin T. *The glaucomas*, 2nd edition, Mosby, St. Louis, Miss. USA, 1996.
13. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Flgel C, Meyer M & Grierson I. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp Eye Res.*, 56, 683-692, 1993.
- 30 14. Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, Capris P, & Izzotti A. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork. *Arch Ophthalmology* 123, 458-463, 2005.
15. Salmon JF & Kanski JJ. *Glaucoma*, 3 rd ed., Butterworth & Heinemann, Edinburgh, 2004
16. Stamer WD, Peppel K, O'Donnell ME, Roberts BC, Wu F, & Epstein DL. Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume. *Invest Ophthalmol.* 42, 1803-1811, 2001.
- 35 17. Suneson A, Hansson H-A & Seeman T. Pressure wave injuries to the nervous system caused by high energy missile extremity impact. Part 11. Distant effects on the central nervous system - a light and electron microscopic study on pigs. *J Trauma* 30, 295-306, 1990.
18. WO 05/030246
19. WO 97/08202
- 40 20. WO 98121978
21. US 6344440
22. WO 96/17602

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Lantrmännen AS Faktor AB
- 5 <120> Nueva estrategia para tratar la hipertensión intraocular  
 <130> PD53685PC00  
 <160> 6
- 10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0  
 <210> 1  
 <211> 16
- 15 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> puede ser reemplazada con A
- 20 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> puede ser reemplazada con R o K
- 25 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> puede ser reemplazada con L
- 30 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> puede ser reemplazada por S
- 35 <400> 1  
 Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn Val Gly Leu  
 1 5 10 15
- <210> 2  
 <211> 8
- 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> puede ser reemplazada por A
- 45 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> puede ser reemplazada por R o K
- 50 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> puede ser reemplazada por L
- 55 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> puede ser reemplazada por S
- 60 <400> 2  
 Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg  
 1 5  
 <210> 3

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> puede ser reemplazada por A

10 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> puede ser reemplazada por R o K

15 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> puede ser reemplazada por L

20 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> puede ser reemplazada por S

<400> 3  
 Val Cys His Ser Lys Thr Arg  
 1 5

25 <210> 4  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 5  
 <223> puede ser reemplazada por A

35 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> puede ser reemplazada por R o K

40 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> puede ser reemplazada por L

45 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> puede ser reemplazada por S

<400> 4  
 Cys His Ser Lys Thr Arg  
 1 5

50 <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> puede ser reemplazada por R o K

60 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> puede ser reemplazada por L

ES 2 561 945 T3

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> puede ser reemplazada por A

5 <400> 5  
His Ser Lys Thr Arg  
1 5

<210> 6

<211> 382

10 <212> PRT

<213> humano

<400> 6

Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr Met  
1 5 10 15  
Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asp Ala  
20 25 30  
Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn  
35 40 45  
Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu Thr Thr Leu  
50 55 60  
Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr Val Gln Pro  
65 70 75 80  
Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala His Leu Ala  
85 90 95  
Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile Ile Ala Phe  
100 105 110  
Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val Lys Leu Ala  
115 120 125  
Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile Asn Phe Gly  
130 135 140

15 Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu  
145 150 155 160  
Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly  
165 170 175  
Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu  
180 185 190  
Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val  
195 200 205  
Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met  
210 215 220  
Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala  
225 230 235 240  
Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp  
245 250 255  
Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Gln Glu Phe Gly Arg Thr  
260 265 270  
Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Glu Glu Glu Gln Ile Ala Tyr  
275 280 285  
Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser  
290 295 300  
Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys  
305 310 315 320  
Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser  
325 330 335  
Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg  
340 345 350  
Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg  
355 360 365  
Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly  
370 375 380

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o fragmento de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO 4, que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión intraocular.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína antisecretora consiste en una secuencia de acuerdo con las siguientes fórmulas:  

X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5

donde X1 es I, los aminoácidos 1-35 de la SEQ ID NO 6, o está ausente, X2 es H, R o K, X3 es S o L, X4 es T o A, X5 es los aminoácidos 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO 6, o está ausente.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha proteína antisecretora comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho fragmento comprende los aminoácidos 38-42 de SEQ ID NO:6.
- 20 5. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde dicha composición farmacéutica comprende dos o más proteínas antisecretoras seleccionadas entre las proteínas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde la presión intraocular es 22 mm Hg o mayor.
7. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde la presión intraocular es 22-30 mm Hg.
8. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, donde la tensión intraocular es normal o baja.
- 25 9. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, donde la proteína antisecretora se proporciona en yema de huevo enriquecida con esta proteína antisecretora, y donde dicha proteína antisecretora se proporciona preferiblemente a una concentración de por lo menos 1000 unidades FIL/ml en dicha yema de huevo.
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la hipertensión intraocular está causada por una resistencia en el flujo de salida del humor acuoso procedente de la cámara anterior del ojo.
- 30 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha composición farmacéutica disminuye la resistencia al flujo de salida del humor acuoso procedente de la cámara anterior a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm.
12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde esta presión intraocular anormal está causada por la formación alterada de humor vítreo en el ojo.
- 35 13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición farmacéutica se formula para la administración tópica, intraocular, intranasal, oral, subcutánea, cutánea, mucosal y/o sistémica.
- 40 15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición farmacéutica se formula para la administración como un spray, aerosol, por medio de un nebulizador o de un inhalador.
16. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-15, donde la composición farmacéutica se administra sistémicamente a la sangre en una dosis de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal al día, preferiblemente 1 - 1000 µg por aplicación y kg de peso corporal.
- 45 17. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-16, donde la composición farmacéutica se formula para la administración tópica en el ojo.
18. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-17, donde la composición farmacéutica se administra en una dosis de 1 µg a 10 mg por aplicación, preferiblemente 50 - 1000 µg, al día.

19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la composición farmacéutica se administra una o más veces al día.
- 5 20. Uso de una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO 4, que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para la preparación de una composición farmacéutica para administración intraocular.
- 10 21. Una proteína antisecretora con una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO:6, o un homólogo y/o fragmento de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO 4, que tiene una actividad antisecretora, y/o una sal farmacéuticamente activa de la misma, para uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión intraocular.

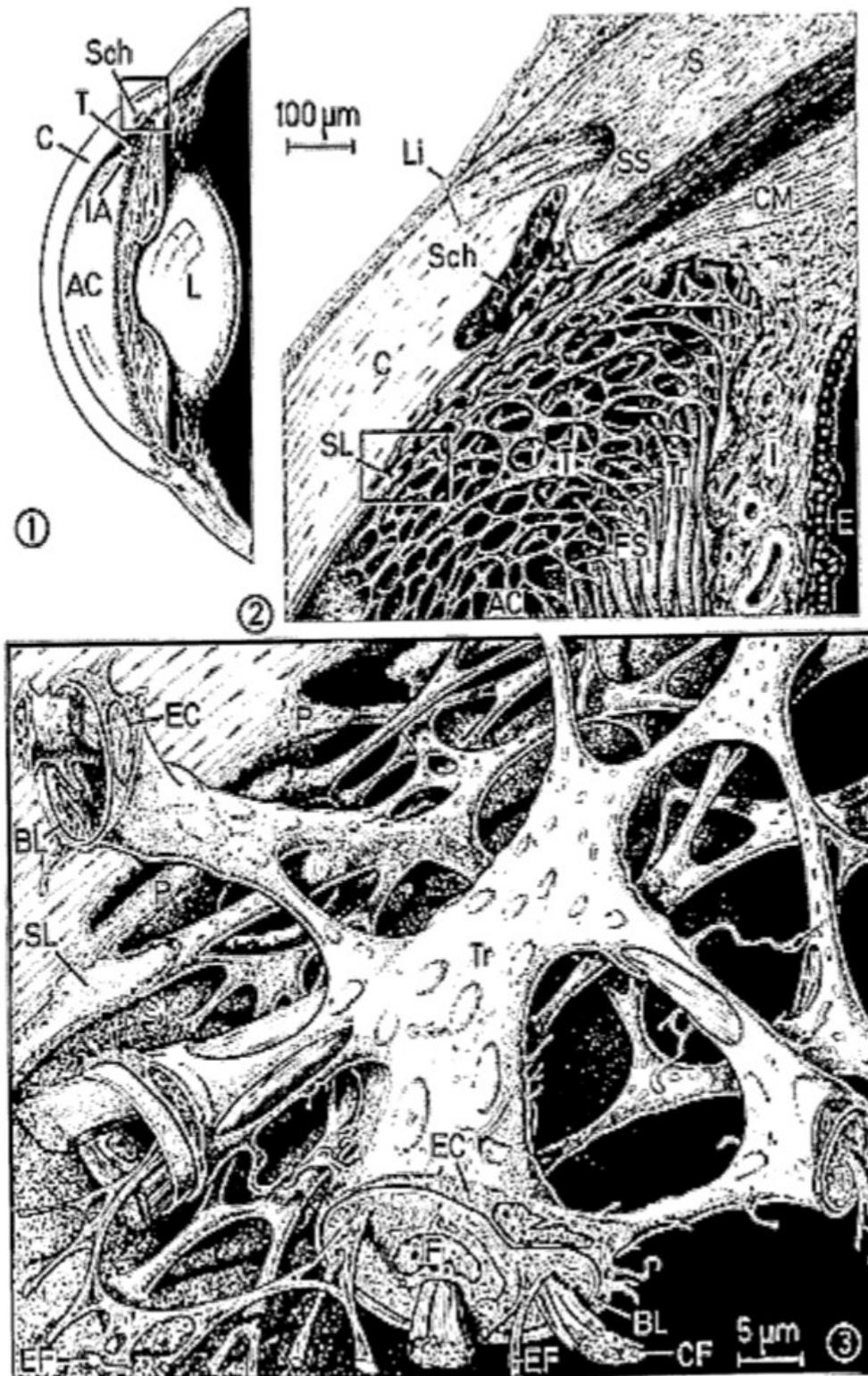


Fig. 1a

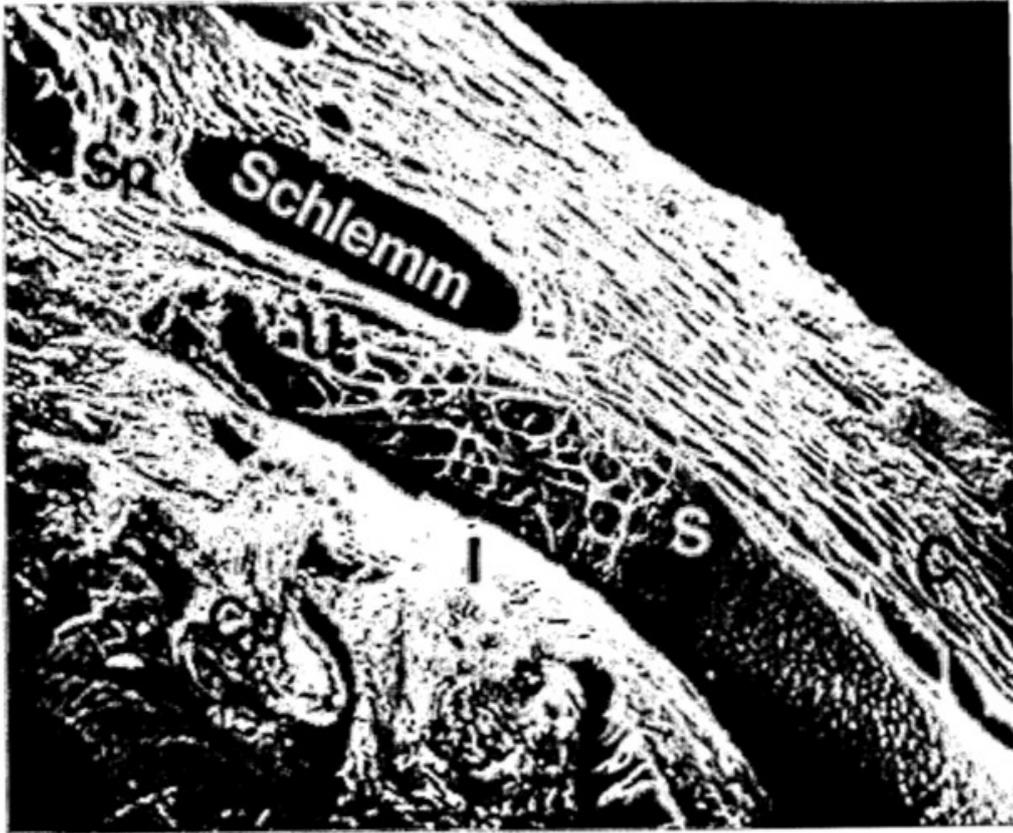


Fig. 1b

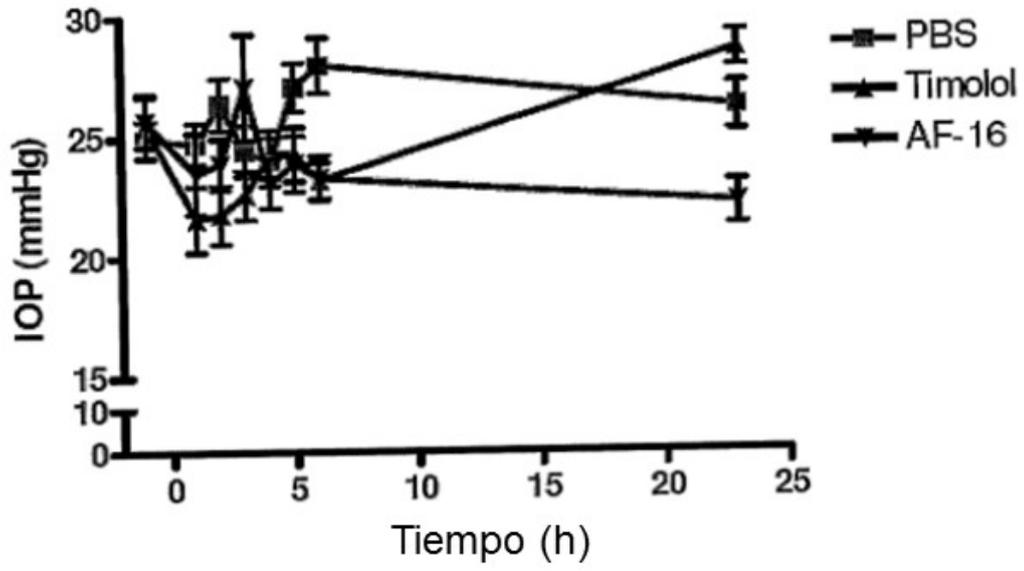


Fig. 2

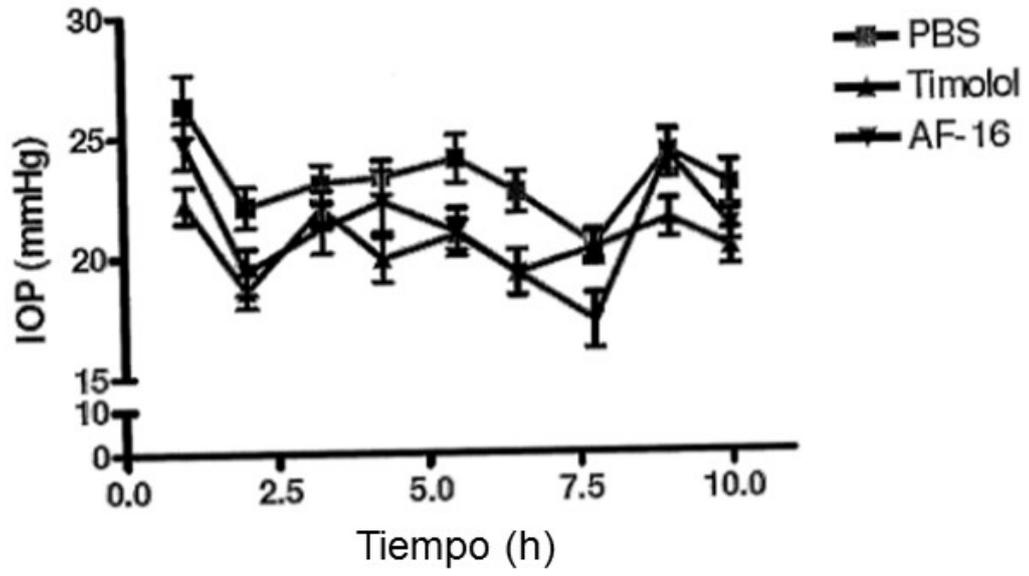


Fig. 3

Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr Met  
 1 5 10 15  
 Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Glu Ala Gln Glu Asp Ala  
 20 25 30  
 Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn  
 35 40 45  
 Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu Thr Thr Leu  
 50 55 60  
 Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr Val Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala His Leu Ala  
 85 90 95  
 Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile Ile Ala Phe  
 100 105 110  
 Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val Lys Leu Ala  
 115 120 125  
 Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile Asn Phe Gly  
 130 135 140  
 Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly  
 165 170 175  
 Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu  
 180 185 190  
 Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val  
 195 200 205  
 Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met  
 210 215 220  
 Glu Glu Glu Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp  
 245 250 255  
 Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Glu Glu Phe Gly Arg Thr  
 260 265 270  
 Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Thr Glu Glu Glu Gln Ile Ala Tyr  
 275 280 285  
 Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser  
 290 295 300  
 Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Glu Ser  
 325 330 335  
 Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg  
 340 345 350  
 Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg  
 355 360 365  
 Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Gln Thr Gly Gly Lys Gly  
 370 375 380

Fig. 4