

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 016**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2014 PCT/EP2014/053787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14131815**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2014 E 14707980 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2968471**

54 Título: **Péptidos para su uso en el tratamiento tópico de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular en estadios tempranos de retinopatía diabética y otras enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial**

30 Prioridad:
01.03.2013 EP 13382063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2017

73 Titular/es:
**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D' HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (100.0%)
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:
**SIMÓ CANONGE, RAFAEL y
HERNÁNDEZ PASCUAL, CRISTINA**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 644 016 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

Péptidos para su uso en el tratamiento tópico de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular en estadios tempranos de retinopatía diabética y otras enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial

La presente invención se refiere al campo de los enfoques médicos para enfermedades oculares que pueden producir ceguera parcial o total. La invención proporciona herramientas útiles que se van a aplicar por vía tópica a los ojos, incluyendo péptidos y análogos de estos péptidos.

Antecedentes técnicos

Enfermedades neurodegenerativas retinianas se refiere a afecciones retinianas caracterizadas por pérdida neuronal progresiva. La retinopatía diabética, degeneración macular senil, glaucoma y retinitis pigmentosa se consideran enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial.

Se puede extraer un análisis en profundidad de estas enfermedades, sus sitios críticos, así como de posibles modos de protección y modos que llevan a la recuperación de Schmidt et al., "Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for the Protection and Recovery", *Current Neuropharmacology* — 2008, Vol. No. 6, pp.: 164-178.

La retinopatía diabética (RD) es la complicación más común de la diabetes y permanece la causa principal de ceguera entre individuos en edad laboral en países desarrollados. Los tratamientos actuales para RD tal como fotocoagulación laser, inyecciones intravítreas de corticosteroides o agentes anti-VEGF están indicadas en estadios demasiado avanzados de la enfermedad y se asocian con efectos secundarios significativos.

La retinopatía diabética (RD) se ha considerado clásicamente que es una enfermedad microcirculatoria de la retina. Sin embargo, hay algunos datos que sugieren que la degeneración retiniana es un suceso temprano en la patogénesis de RD que participa en las anomalías microcirculatorias que se producen en RD como se puede deducir de Simó et al. en representación del European Consortium for Early Treatment of Diabetic Retinopathy (EUROCONDOR). "Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications", *Br. J. Ophthalmol.* — 2012, vol. 96, pp.1285-1290.

En el caso de RD la neurodegeneración (pérdida de neuronas eficaces) se produce en los estadios tempranos de la enfermedad y produce anomalías funcionales tales como pérdida tanto de discriminación cromática como sensibilidad de contraste. Estas alteraciones se pueden detectar por medio de estudios electrofisiológicos en pacientes diabéticos incluso con menos de dos años de duración de diabetes, es decir, antes de que las lesiones microvasculares se puedan detectar en examen oftalmológico. Además, una ERG (electrorretinografía) multifocal retrasada de tiempo implícito (mfERG-IT) predice el desarrollo de anomalías microvasculares tempranas. Además, la degeneración neuroretiniana inicia y/o activa varias rutas metabólicas y de señalización que participarán en el proceso microangiopático, así como en la perturbación de la barrera hemato-retiniana (un elemento crucial en la patogénesis de RD).

Los estadios tempranos de las enfermedades neurodegenerativas retinianas o neurodegeneración asociada con estas patologías no se tratan actualmente, aunque prevendrían lesiones avanzadas, tal como problemas microcirculatorios que producen neovascularización retiniana. Por tanto, en estadios tempranos, en particular de RD, no se aplica tratamiento y se realiza el seguimiento estándar de los pacientes.

Por otra parte, cuando los estadios tempranos de esta enfermedad neurodegenerativa, en particular RD, son la diana terapéutica, sería inconcebible, recomendar un tratamiento agresivo tal como fotocoagulación laser o inyecciones intravítreas. Hasta la fecha, el uso de colirios no se ha considerado una buena ruta para la administración de fármacos dirigidos a prevenir o detener RD. Esto es porque generalmente se asume que no alcanzan el segmento posterior del ojo (es decir, el vítreo y la retina), como se declara en Urtti A et al., "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006, vol. 58, pp. 1131-1135. Aunque existe alguna evidencia de que compuestos administrados en la córnea pueden alcanzar la retina, representan casos aislados y corresponden a compuestos de bajo peso molecular, tal como esos a los que se hace referencia en Aiello et al., "Targeting Intraocular Neovascularization and Edema — One Drop at a Time", *N. Eng. J. Med.* — 2008, vol. 359, pp. 967-969. Aiello y col. muestran que en dos ensayos diferentes, un compuesto derivado de pirrolidina (llamado TG100572, 4-cloro-3-(5-metil-3-[[4-(2-pirrolidin-1-iletoksi)fenil]amino]-1,2,4-benzotriacín-7-il)fenol)) con la capacidad de actuar como un inhibidor de quinasas implicadas en la generación neovascular y edema retiniano, fue capaz de alcanzar la diana en la retina una vez administrado en forma de colirio. No obstante, este compuesto pequeño no se puede comparar con compuestos de otra naturaleza, tal como péptidos o proteínas con pesos moleculares altos.

La diabetes es un grupo de enfermedades crónicas caracterizada por hiperglucemia. Para prevenir las complicaciones diabéticas es esencial reducir la hiperglucemia usando agentes que reducen la glucosa en sangre. Por tanto, cualquier fármaco reductor de glucosa podría ser, en teoría, beneficioso para prevenir o detener las

complicaciones diabéticas, incluida RD. Sin embargo, hay una falta de información respecto a un efecto directo de agentes antidiabéticos en RD independientemente de su acción en reducir los niveles de glucosa en sangre. A modo de ejemplo, los agonistas del péptido-1 similar a glucagón, conocidos como exenatida (Byeta, Amylin Pharmaceuticals) y liraglutida (Victoza, Novo Nordisk) se usan para tratar diabetes de tipo 2 fomentando la disminución de niveles de glucosa en sangre. Además, se sabe que estos agonistas dan lugar a una mejora en las enfermedades asociadas de síndrome metabólico tal como obesidad y alta presión sanguínea. También el documento de solicitud de patente WO2007062434 divulga una composición farmacéutica que se va a administrar por vía intranasal, en la que el mismo péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) se administra para tratar síndrome metabólico y complicaciones diabéticas, incluyendo RD.

Por tanto, de lo anterior se sabe que la administración de tales agonistas del péptido-1 similar a glucagón también mejoran o atenúan síntomas de RD, ya que la causa principal o el origen de la enfermedad, en particular los altos niveles de glucosa en sangre, se mejora en último caso. No obstante, estos tratamientos no están privados de efectos secundarios adversos. Si, además, estas sustancias tienen que alcanzar la retina a concentraciones terapéuticas, se requieren altas dosis, aumentando de esta manera los efectos secundarios.

Un estudio que muestra neuroprotección mediada por activación de GLP-1R en un modelo in vivo se divulga en Zhang et al., "Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats", *Invest Ophthalmol Vis Sci.*-2011, vol.52(1), pp.278-85. Los autores describieron que la administración intravítrea de exendina-4 (exenatida) previno anomalías en electroretinografía (ERG) y características morfológicas relacionadas con neurodegeneración en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). Sin embargo, los resultados en el estudio de Zhang y col. no se pueden extrapolar fácilmente a RD humana (o a otras enfermedades con neurodegeneración retiniana). En primer lugar, porque en el modelo de STZ-DM la interpretación de los resultados podría estar dificultada por el efecto neurotóxico de STZ. En segundo lugar, aunque se ha encontrado expresión de GLP-1R en retinas de ratas no se ha descrito previamente en retinas humanas. Por último, y como se ha mencionado anteriormente, las inyecciones intravítreas son inapropiadamente invasivas en pacientes con muy pocas, si alguna, anomalías microvasculares en examen fundoscópico.

Actualmente, no hay tratamientos específicos para enfermedades neurodegenerativas retinianas. En el caso particular de RD, esto significa que no hay tratamientos específicos para la retinopatía de fondo o RD no proliferativa, así como para proteger la neurorretina de daño (que produce pérdida de neuronas). Por tanto, se necesitan nuevos tratamientos farmacológicos para los estadios tempranos de la enfermedad, cuando la neurodegeneración parece estar empezando. El tratamiento temprano de RD será eficaz en reducir la evolución a estadios avanzados que necesitan terapias agresivas tal como intervención quirúrgica.

Compendio de la invención

Los inventores han encontrado que algunos péptidos, todos ellos tienen en común una secuencia específica en la región N-terminal, así como composiciones que comprenden dichos péptidos, cuando se aplican por vía tópica en el ojo (es decir, en la córnea o fondo conjuntivo) fueron capaces de alcanzar la retina, a pesar de su alto peso molecular y también fueron capaces de proteger y prevenir la retina de degeneración. Estos compuestos actuaron como neuroprotectores tópicos de la retina (en particular, la neurorretina, que es la parte de la retina que incluye las neuronas, pero no el epitelio de pigmento retiniano).

Se debe enfatizar que la administración tópica de péptidos para su uso según la invención, no solo alcanza la retina, sino también logra concentraciones eficaces para anular la evolución de retinopatía diabética.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a péptidos con una longitud de secuencia de 13 a 50 aminoácidos, la región N-terminal de dichos péptidos consiste en la secuencia:

$\text{HXaa}^1\text{EGTFTSDXaa}^2\text{SXaa}^3\text{Xaa}^4$ (SEQ ID NO: 1) en donde:

Xaa¹ es un aminoácido seleccionado de alanina y glicina;

Xaa² es un aminoácido seleccionado de valina y leucina;

Xaa³ es un aminoácido seleccionado de serina y lisina;

Xaa⁴ es un aminoácido seleccionado de tirosina y glutamina; e histidina es el residuo N-terminal;

para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas.

El tratamiento tópico y/o prevención es un tratamiento tópico del ojo y/o prevención, por tanto, en la superficie del ojo (es decir, en la córnea o fondo conjuntivo), debido al hecho de que los péptido pueden alcanzar la retina cuando se aplican por vía tópica a los ojos. Esto aplica a cualquiera de las formas de realización y combinación de formas de realización divulgadas en la presente invención.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que el receptor del péptido-1 similar a glucagón (GLP-1 Rc) estaba presente en retina humana, y al contrario a todas las asunciones previas, fueron capaces de demostrar que sustancias de naturaleza peptídica con un peso molecular que variaba de 3,35 kDa a 4,18 kDa pudieron alcanzar la retina cuando se aplicaron por vía tópica a los ojos (es decir, la córnea). Por tanto, los inventores proponen el uso tópico (uso ocular tópico) de péptidos que comprende de 30 a 40 aminoácidos e incluyen SEQ ID NO: 1, secuencia que se considera responsable de la activación del GLP-1 Rc, y también está presente en el GLP-1 de mamífero.

Considerando el estado de la técnica, fue inesperado que moléculas de un peso molecular mayor de 1 kDa fueran capaces de alcanzar la retina una vez administradas por vía tópica en la superficie de la córnea.

GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón) es un péptido insulínico endógeno que se secreta de las células L del aparato digestivo en respuesta a alimentos ("respuesta de incretina"). GLP-1 al actuar a través de su receptor (GLP-1Rc), tiene potentes efectos en la secreción de insulina dependiente de glucosa, expresión génica de insulina, neogénesis de células de los islotes beta, motilidad gastrointestinal, homeostasis de energía e ingesta de alimentos. El receptor de GLP-1 (GLP-1Rc) es un miembro de la familia de clase B1 de unión a hormonas peptídicas (receptores de tipo secretina) de receptores que atraviesan siete veces la membrana, acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR). Los GLP-1R tienen una amplia distribución y se encuentran en el páncreas, tejido adiposo, músculo, corazón, el aparato digestivo y el hígado. Además, los GLP-1R se encuentran a lo largo del todo el sistema nervioso central (es decir, hipotálamo, cuerpo estriado, tronco cerebral, sustancia negra y zona subventricular), y hay alguna evidencia de que la estimulación de GLP-1R por GLP-1 ejerce efectos neuroprotectores en los sistemas nerviosos tanto central como periférico.

El GLP-1 humano es un péptido de 37 residuos de aminoácidos que se origina de preproglucagón que se sintetiza entre otros en las células L en el íleon distal, en el páncreas y en el cerebro. El preproglucagón humano se identifica con el número de acceso de la base de datos UniProt P01275, 6 de febrero, 2007, versión 3. El procesamiento de preproglucagón para dar GLP-1 (7-36)amida, GLP-1 (7-37) y GLP-2 se produce principalmente en las células L. Se usa un sistema sencillo para describir fragmentos y análogos de este péptido. Por tanto, por ejemplo, Gly⁸-GLP-1(7-37) designa un fragmento (análogo) de GLP-1 formalmente derivado de GLP-1 delecionando los residuos de aminoácidos no. 1 a 6 y sustituyendo el residuo de aminoácido natural en la posición 8 (Ala) por Gly. De forma similar, Lys³⁴(N^ε-tetradecanoil)-GLP-1 (7-37) designa GLP-1 (7-37) en donde el grupo ε-amino del residuo de lisina en la posición 34 se ha tetradecanoilado.

Por tanto, contrario a todos los prejuicios, los inventores han resuelto una necesidad gran tiempo sentida en el campo de la oftalmología al proporcionar péptidos que, por medio de administración tópica o como ingredientes de composiciones tópicos (por tanto, composiciones oculares tópicos) pueden alcanzar la retina y ejercer en la misma un efecto de neuroprotección. Además, la administración tópica de estos péptidos limita su acción al ojo y minimiza los efectos secundarios sistémicos asociados.

Este aspecto de la invención también se puede formular como el uso de un péptido con una longitud de secuencia de 13 a 50 aminoácidos y que comprende en la región N-terminal de dicho péptido la secuencia de aminoácidos que consiste en HXaa¹EGTFTSDXaa²SXaa³Xaa⁴ (SEQ ID NO: 1) como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas (lo que significa tratamiento ocular tópico y/o prevención), en particular para el tratamiento y/o prevención de la retina en estadios tempranos de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular en estadios tempranos de RD, debido al efecto neuroprotector de los péptidos. La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular estadios tempranos de RD, que comprende administrar (lo que significa administrar por vía tópica en el ojo) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido con una longitud de secuencia de 13 a 50 aminoácidos y que comprende en la región N-terminal de dicho péptido la secuencia de aminoácidos que consiste en HXaa¹EGTFTSDXaa²SXaa³Xaa⁴ (SEQ ID NO: 1) como se ha definido anteriormente, junto con excipientes y/o soportes farmacéuticamente aceptables, en un sujeto en necesidad de ello, incluyendo un ser humano.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una vista esquemática de la evolución de la enfermedad neurodegenerativa retiniana particular, retinopatía diabética (RD) (estadios tempranos y estadios tardíos) y de los enfoques terapéuticos empleados en cada uno de los estadios según el estado de la técnica. La flecha horizontal representa tiempo (en unidades arbitrarias), a lo largo del cual los niveles aumentados de glucosa en sangre son detectables (diabetes o altos niveles de glucosa en sangre). "Sin RD" significa inspección ocular normal (sin microaneurismas, microhemorragias o exudados); "RDNP" significa retinopatía diabética no proliferativa; "EMD" significa edema macular diabético; "OcCap" significa oclusión capilar; "RDP" significa retinopatía diabética proliferativa; "PHC" significa fotocoagulación; "IVTR" significa inyección intravítrea; y "VTR" significa vitrectomía. El término neovasos se refiere a los vasos vasculares formados nuevos.

La figura 2 muestra la expresión del receptor de GLP-1 en muestras de tejido humano. El panel A es un diagrama de barras en el que la cantidad relativa del ARNm del receptor de GLP-1 se ha analizado por PCR cuantitativa en

tiempo real. En el panel B una imagen de microscopía óptica (20x) de una sección de una neurorretina humana claramente expone (referenciada con la flecha gruesa) la presencia del receptor en los segmentos de fotorreceptores (PR). "ONL" significa capa nuclear externa; "INL" significa capa nuclear interna; y "GCL" significa capa de células ganglionares, todas ellas son partes constitutivas de la neurorretina.

La figura 3 referida a retinopatía diabética (RD), es una imagen microscópica (microscopio Olympus) de secciones de retina (cortes), en las que la presencia de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se evalúa como un indicador de activación glial. Muestra una comparación de inmunorreactividad de GFAP (flecha) en la retina entre muestras representativas de un ratón diabético tratado con un análogo de GLP-1(7-37), que es un agonista de GLP-1R (panel izquierdo, prueba, T) y un ratón diabético tratado con vehículo (panel derecho, control, C). Los núcleos se marcaron con DAPI. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares.

La figura 4 también relacionada con retinopatía diabética (RD), es un diagrama de barras que muestra los resultados de un ensayo TUNEL. El panel A muestra el porcentaje de células positivas para TUNEL (%) en la capa de células ganglionares (GCL) en ratones diabéticos tratados con un análogo de GLP-1(7-37), que es un agonista de GLP-1R (prueba, T, n=10) y ratones diabético tratados con vehículo (control, C, n=10). El panel B muestra la inmunofluorescencia positiva para TUNEL en la neurorretina entera de ratones diabéticos tratados con agonista de GLP-1R (T) y ratones diabéticos tratados con vehículo (control, C). U.A.: unidades arbitrarias. Los resultados son media \pm DE. * $p < 0,05$.

La figura 5 también relacionada con retinopatía diabética (RD), es un diagrama de barras que muestra los resultados de inmunofluorescencia de glutamato (panel A) e inmunofluorescencia de GLAST (panel B) en la neurorretina entera de ratones diabéticos tratados con agonista de GLP-1R (T) y ratones diabéticos tratados con vehículo (control, C). U.A.: unidades arbitrarias. Los resultados son media \pm DE. * $p < 0,05$.

Descripción detallada de la invención

En aras de la comprensión, se incluyen las siguientes definiciones.

En el sentido de la invención, el término "neuroprotección" significa cualquier tipo de tratamiento o método profiláctico que se puede usar para que las neuronas que constituyen la neurorretina se mantengan conservadas y en un estado fisiológico correspondiente a un animal objeto sano (incluyendo seres humanos). La "neurorretina" es la parte de la retina que incluye las neuronas y sin el epitelio de pigmento retiniano. La neurorretina es responsable del ciclo visual.

La expresión "neuroprotección en los estadios tempranos de retinopatía diabética" se refiere a cualquier tratamiento o método profiláctico llevado a cabo antes de que se establezcan estadios avanzados de RD (RD preproliferativa o proliferativa).

Por "estadios tempranos de retinopatía diabética" se debe entender como el momento en el que, debido a la presencia de diabetes, se pueden detectar anomalías funcionales en el ojo (es decir, discriminación cromática, sensibilidad de contraste y anomalías en electroretinografía), pero el patrón de cambios microvasculares de RD no se ha establecido todavía por completo, es decir, no se pueden observar las lesiones típicas de RD preproliferativa o proliferativa.

"Péptido-1 similar a glucagón humano (7-36) amida (GLP-1 (7-36) amida)" y "péptido-1 similar a glucagón humano (7-37) (GLP-1 (7-37))" se refiere a los fragmentos derivados de proglucagón humano y que comprenden desde el aminoácido 7 al 36 o desde el aminoácido 7 al 37, respectivamente, de la secuencia de aminoácidos de dicho proglucagón humano.

Como "análogo de GLP-1 (7-37) humano" se debe entender un péptido en donde uno o más residuos de aminoácidos del GLP-1 (7-37) se han sustituido por otro residuo de aminoácido y/o en donde uno o más de los residuos de aminoácidos del GLP-1 (7-37) se han delecionado y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han añadido al GLP-1 (7-37).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar a algún grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad que se aborda. La dosis particular del compuesto administrado según esta invención se determinará, por supuesto, por las circunstancias particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular que se trata, y consideraciones similares.

El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento está relacionado con compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del ámbito del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin significativa toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a un cociente riesgo/beneficio razonable. Cada soporte, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros

ingredientes de la composición farmacéutica. También debe ser adecuado para su uso en contacto con el tejido u órgano de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones proporcionales a un cociente riesgo/beneficio razonable. Los soportes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos estándar, e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.

La región "N-terminal" o "el extremo N" (también conocido como el extremo amino, extremo NH₂, extremo N-terminal o amino-terminal, todos ellos usados en el presente documento como expresiones intercambiables) se refiere al inicio de una proteína o polipéptido terminado por un aminoácido con un grupo amino libre (-NH₂). La convención para escribir secuencias peptídicas es poner el extremo N a la izquierda y escribir la secuencia del extremo N al C. Cuando la proteína se traduce de un ARN mensajero, se crea del extremo N al extremo C.

Por "residuo N-terminal" se debe entender el residuo en un péptido que tiene un grupo amino que está libre, o al menos no acilado por otro residuo de aminoácido (puede, por ejemplo, estar acilado o formilado), se llama N-terminal; está en el extremo N. El residuo que tiene un grupo carboxilo libre, o al menos no acila otro residuo de aminoácido (puede, por ejemplo, acilar amoniaco para dar -NH-CHR-CO-NH₂), se llama C-terminal.

Como se ha expuesto anteriormente, los inventores proponen por primera vez un enfoque terapéutico para enfermedades neurodegenerativas retinianas (enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel importante) que, aparte de ser no agresivo, es útil en el tratamiento de los estadios tempranos de estas enfermedades, y en particular en el tratamiento de los estadios tempranos de RD.

En una forma de realización particular, el péptido para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención según la invención tiene una longitud de secuencia de 30 a 50 aminoácidos.

Otra forma de realización particular es un péptido con una longitud de secuencia de 30 a 40 aminoácidos, consistiendo la región N-terminal de dicho péptido en la secuencia:

HXaa¹EGTFTSDXaa²SXaa³Xaa⁴ (SEQ ID NO: 1) en donde:

Xaa¹ es un aminoácido seleccionado de alanina y glicina;

Xaa² es un aminoácido seleccionado de valina y leucina;

Xaa³ es un aminoácido seleccionado de serina y lisina;

Xaa⁴ es un aminoácido seleccionado de tirosina y glutamina; e histidina es el residuo N-terminal;

para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana.

Aun en otra forma de realización particular, el péptido tiene una secuencia con una longitud de 13 a 40 aminoácidos.

Esto significa que cualquiera de los péptidos con cualquiera de la longitud de secuencia especificada se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas (lo que significa tratamiento tópico del ojo y/o prevención), en particular para el tratamiento y/o prevención de la retina en estadios tempranos de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular estadios tempranos de RD. Por tanto, la invención también se refiere en formas de realización particulares a métodos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular para neuroprotección en estadios tempranos de RD, que comprende administrar (que significa administrar por vía tópica en el ojo) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido con cualquiera de las longitudes de secuencia especificadas anteriormente.

En particular, el péptido para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención según la invención, que significa para su uso en el tratamiento tópico del ojo y/o prevención, es para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana seleccionada del grupo que consiste en RD, degeneración macular senil, glaucoma y retinitis pigmentosa.

En una forma de realización preferida, el péptido para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención según la invención, es para el tratamiento y/o prevención de RD.

Además, en otra forma de realización preferida, el péptido para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención según la invención, es para el tratamiento y/o prevención de los estadios tempranos de RD.

En particular, en estos estadios tempranos cuando RD no se ha establecido todavía, los péptidos de la invención aplicados por vía tópica actúan como agentes neuroprotectores de la neurorretina, ejerciendo de esta manera un efecto de neuroprotección. Esto significa que las neuronas se conservan del daño y pérdida de función, y se mantienen en un estadio fisiológico sano. El mismo razonamiento aplica con las otras enfermedades neurodegenerativas retinianas. En efecto, los péptidos se pueden usar debido a sus propiedades neuroprotectoras.

Se puede ver una representación esquemática del desarrollo de la retinopatía diabética en la figura 1. Brevemente, las rutas metabólicas desencadenadas por hiperglucemia, y la hiperglucemia misma, producen RD, pero se requiere un periodo de al menos cinco años antes de que se pueda diagnosticar RD en examen oftalmológico. El primer estadio que se puede ver es retinopatía de fondo o retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) (que está constituida por microaneurismas, microhemorragias y exudados duros). En este estadio no hay tratamiento específico, sino el seguimiento estándar del sujeto diabético. A partir de este estadio la historia natural de la enfermedad puede seguir dos direcciones que no excluyen la otra. Una de ellas es el desarrollo de edema macular diabético (EMD) clínicamente significativo en el que el elemento patogénico más importante es la rotura de barrera hemato-retiniana (BHR). Esta vía es más frecuente en pacientes diabéticos de tipo 2. La otra dirección es hacia retinopatía diabética proliferativa (RDP), que es más frecuente en diabetes de tipo 1. En este último marco la oclusión capilar desempeña un papel esencial generando un desequilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos, que por último estimula la neovascularización (el sello de la RDP). Sin embargo, incluso antes de que se pudiera detectar RDNP en el examen oftalmológico, la neurodegeneración retiniana existe. Como se indica en la figura 1, se realizan tratamientos agresivos cuando se establecen EMD y RDP. Dichos tratamientos incluyen fotocoagulación (PGC), inyecciones intravítreas de corticosteroides y/o factores de crecimiento endoteliales antivascuales (IVTR), y vitrectomía (VTR).

Con los péptidos para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención de RD según la invención, se pueden evitar algunos de estos tratamientos agresivos si se está en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando se pueden detectar anomalías funcionales (es decir, discriminación cromática, sensibilidad de contraste y anomalías en electrorretinografía), el sujeto recibe compuestos que ayudan a la neuroprotección de la retina. De modo que, si la retina se protege de las consecuencias de niveles de glucosa en sangre crónicos, se pueden minimizar las complicaciones principales, o incluso que no aparezcan nunca con la mejora real de la calidad de vida de los pacientes diabéticos. La administración tópica al ojo de los péptidos representa una ventaja real, que evita tratamientos agresivos adicionales.

En una forma de realización, el péptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular de RD, tiene una longitud de secuencia seleccionada del grupo que consiste en 31, 32, 33, 34, 37, 36, 37, 38 y 39 aminoácidos. En otra forma de realización, la longitud de secuencia se selecciona de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 42, 44, 45, 46, 47, 48 y 49 aminoácidos.

En una forma de realización de la invención, los péptidos para su uso en el tratamiento tópico (ocular) y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, son los que comprenden en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 en la que Xaa¹ es alanina, Xaa² es valina, Xaa³ es serina y Xaa⁴ es tirosina. Es decir, comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 (HAEGTFTSDVSSY). Estos péptidos son, en particular, para el tratamiento tópico y/o prevención de RD, que es para el tratamiento tópico del ojo y/o prevención de RD.

En otra forma de realización, el péptido para su uso según la invención es un péptido-1 similar a glucagón de mamíferos. Este péptido incluye en su extremo N-terminal (región N-terminal) la secuencia identificada como SEQ ID NO: 5, que se mantiene en la mayoría de los mamíferos, tal como seres humanos, cerdos y monos. Además, esta es la secuencia que es principalmente reconocida por GLP-1Rc.

Por tanto, en una forma de realización preferida, el péptido para su uso en el tratamiento tópico (ocular) y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas (es decir, RD) consiste en el péptido-1 similar a glucagón humano, de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, correspondiente a HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG, y variaciones de este péptido humano. Las variaciones se refieren a mutaciones entre individuos, mientras que estas mutaciones no afectan la interacción con el GLP-1Rc, y no priven al péptido de actuar a través de este receptor (en particular como agonista o activador de la posterior ruta de señalización que produce neuroprotección o disminución de los niveles de glucosa en sangre). Mediante "mutaciones" se debe entender cualquier delección de uno o dos aminoácidos, y una sustitución o adición de un aminoácido conservador.

En otra forma de realización, el péptido para su uso según la invención es uno con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG), en donde la lisina (K) comprende el sustituyente lipofílico N^ε-(γ-glutamil(N^α-hexadecanoilo)) unido por un enlace amida al grupo amino de la cadena lateral de la lisina. Es decir, el péptido consiste en SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3 corresponde al principio activo conocido como liraglutida (también nombrado Arg³⁴Lys²⁶(N^ε-(γ-glutamil(N^α-hexadecanoilo)))-GLP-1 (7-37)), que se considera un análogo de GLP-1 (7-37) de los que comprenden un sustituyente lipofílico en al menos un aminoácido, dicho sustituyente lipofílico es un grupo acilo de un ácido alcano α,ω-dicarboxílico de cadena lineal o ramificado. Los grupos acilos preferidos en estos análogos de GLP-1 (7-37) se seleccionan del grupo que comprende HOOC(CH₂)_mCO-, en donde m es de 4 a 38, preferiblemente de 4 a 24, el

más preferido se selecciona del grupo que comprende $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

Por tanto, la presente invención también abarca péptido-1 similar a glucagón (7-37) de mamífero o análogos del mismo para su uso en el tratamiento (ocular) tópico de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular RD, en donde el análogo del péptido-1 similar a glucagón (7-37) es un péptido que comprende al menos una de las siguientes modificaciones:

- a) una deleción de al menos un residuo de aminoácido del péptido-1 similar a glucagón (7-37);
- b) al menos una sustitución de un residuo de aminoácido del péptido-1 similar a glucagón (7-37) por otro residuo de aminoácido; y
- c) la adición de al menos un residuo de aminoácido al extremo C-terminal del péptido-1 similar a glucagón (7-37), mientras que incluyen en la región N-terminal la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Dichos análogos son, además agonistas peptídicos del receptor del péptido-1 similar a glucagón humano, que son capaces de estimular la formación de AMPc cuando se ensayan en frente del receptor.

En particular, el péptido-1 similar a glucagón (7-37) de mamífero o análogos del mismo son utilizables en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular RD, en un estadio temprano de la enfermedad. Los péptidos, cuando se aplican por vía tópica en el ojo, actúan como agentes neuroprotectores en los estadios tempranos (evitando la neurodegeneración en el caso de tratamiento preventivo).

Los ejemplos de análogos de GLP-1 (7-37) también para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular de RD, incluyen una parte de liraglutida, $\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{34}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)Arg}^{34}\text{-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Gly}^3\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{35}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^\epsilon\text{-(tetradecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxinonadecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxinonadecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiheptadecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiheptadecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{26,34}\text{Lys}^{36}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiundecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiundecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiundecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiheptanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxiheptanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxipentadecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(lithcolil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\omega\text{-carboxitridecanoil)-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-glutamil(N}^\alpha\text{-tetradecanoil)))-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Lys}^{26,34}\text{bis}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-glutamil(N}^\alpha\text{-hexadecanoil)))-GLP-1 (7-37)}$; $\text{Arg}^{34}\text{Lys}^{26}(\text{N}^\epsilon\text{-(}\gamma\text{-glutamil(N}^\alpha\text{-tetradecanoil)))-GLP-1 (7-37)}$

Todos estos análogos se divulgan ampliamente en el documento de patente EP0944648 (Novo Nordisk), en donde también se incluyen ejemplos de sus síntesis. La mayoría de ellos se obtienen por tecnología recombinante realizada en microorganismos, así como por síntesis química.

En otra forma de realización, los péptidos para su uso en el tratamiento (ocular) tópico y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, son los que comprenden en la región N-terminal la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1 en la que Xaa^1 es glicina, Xaa^2 es leucina, Xaa^3 es lisina y Xaa^4 es glutamina. Los péptidos son, en particular, para el tratamiento tópico y/o prevención de RD.

En otra forma de realización, el péptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana, en particular RD, consiste en, o es el que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 (HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPXaa⁵), en donde Xaa^5 es un residuo de serina en el que el -COOH terminal se ha sustituido por un grupo -NH₂. Esta SEQ ID NO: 4 corresponde al principio activo conocido como exanatida (Amylin Pharmaceuticals). El compuesto se puede obtener por síntesis química sólida o usando la tecnología de ADN recombinante en microorganismos como se expone en el documento de patentes US5424286.

En otra forma de realización, el péptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana, en particular RD, consiste en, o es el que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 (HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPSKKKKXaa⁶), en donde Xaa^6 es un residuo de lisina en el que el -COOH terminal se ha sustituido por un grupo -NH₂. Esta SEQ ID NO: 8 corresponde al principio activo conocido como lixisenatida (Sanofi-Aventis). El compuesto se puede obtener por síntesis química sólida (metodología de fase sólida de Merifield). El producto se divulga ampliamente en el documento de patente US6528486.

Todos estos péptidos de la invención con una longitud de 13 a 50 aminoácidos, particularmente de 30 a 50, o de 30 a 40 y que comprenden en el extremo N-terminal (región N-terminal) la secuencia de aminoácidos que consiste en SEQ ID NO: 1, así como cualquier péptido definido como análogo del GLP-1 (7-37), son agonistas del GLP-1Rc. En efecto se considera que esta SEQ ID NO: 1 es al menos parte de la secuencia de aminoácidos que interacciona con el GLP-1Rc. Como se ejemplifica posteriormente, todos ellos se pueden usar por vía tópica en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana, en particular de RD.

Por tanto, en una forma de realización particular, los péptidos para su uso según la invención son agonistas del GLP-1Rc.

5 La determinación de la actividad agonista para un péptido particular se puede probar por medio de un ensayo en el que la estimulación de la formación de AMPc en una línea celular que expresa el GLP-1Rc humano clonado. Un ejemplo de tal ensayo es derivable del documento de patente EP0944648 (Novo Nordisk).

10 Brevemente, la CE50 de un péptido particular se calcula de una curva de dosis-respuesta determinada usando células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresan el GLP-1Rc pancreático humano. Las membranas plasmáticas de las células se preparan por homogenización en tampón (Tris-HCl 10 mmol/l y NaCl 30 mmol/l, pH 7,4, que contiene, además, ditiotritol 1 mmol/l, leupeptina 5 mg/l (Sigma, St. Louis, MO, EE UU), pepstatina 5 mg/l (Sigma, St. Louis, MO, EE UU), bacitracina 100 mg/l (Sigma, St. Louis, MO, EE UU), y aprotinina 16 mg/l (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)). El homogenizado se centrifuga después encima de una capa de sacarosa al 41% p/v. La banda blanca entre las dos capas se diluye en tampón y se centrifuga. El ensayo se puede llevar a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 140 µl. El tampón usado puede ser Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7,4 con la adición de EGTA 1 mmol/l, MgSO₄ 1,5 mmol/l, ATP 1,7 mmol/l, GTP 20 mM, 3-isobutil-1-metilxantina 2 mmol/l, Tween 20 al 0,01% y seroalbúmina humana al 0,1% (Reinst, Behringwerke AG, Marburgo, Alemania). Los compuestos que se van a ensayar para actividad agonista se disuelven y diluyen en tampón, se añaden a la preparación de membranas y la mezcla se incuba durante 2 h a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de 25 µl de HCl 0,05 mol/l. Las muestras se diluyen 10 veces antes del análisis para AMPc mediante un ensayo de proximidad de centelleo (RPA 538, Amersham, RU).

20 Un péptido se considera entonces un agonista si en estas condiciones la CE50 (pM) es al menos la de GLP-1 (7-37), es decir, de al menos 55 pM o, preferiblemente, de al menos 60 pM.

25 La protección de la neurodegeneración retiniana detectada por medio de varios exámenes oftalmológicos representa un buen enfoque para tratar RD antes de que se desarrollen anomalías vasculares. En los estadios tempranos de RD existe neurodegeneración (que también se puede detectar por la pérdida tanto de discriminación cromática como sensibilidad de contraste, activación glial y apoptosis de células neurales). Los péptidos para administración tópica (administración tópica al ojo) de la invención son útiles en estos estadios tempranos cuando no está indicado tratamiento y solo se recomienda el seguimiento hasta que se establecen estadios más avanzados de RD (edema macular diabético clínicamente significativo y/o retinopatía diabética proliferativa).

30 El tratamiento en los estadios tempranos de RD tiene la ventaja real de que se evitan complicaciones adicionales, es decir, microaneurismas, microhemorragias, exudados duros, neovascularización, oclusión capilar, y rotura de la barrera hemato retiniana (BHR).

35 En otra forma de realización, el péptido para su uso según la invención, es un ingrediente (componente) de una composición farmacéutica tópica, dicha composición comprende al menos un péptido como se ha divulgado anteriormente y cualquier soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por tanto, la invención se refiere también a una composición tópica farmacéutica para su uso en el tratamiento tópico y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular de retinopatía diabética, que comprende al menos un péptido como se ha definido anteriormente. Particular y/o excipientes se refiere a agua, tampones salinos, y mezclas de agua en aceite o aceite en agua. Los excipientes particulares se seleccionan de conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.

40 Las composiciones tópicas farmacéuticas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en soluciones (por ejemplo, colirios), cremas, lociones, ungüentos, emulsiones, aerosoles y espráis no aerosoles, geles, pomadas y suspensiones. Como se ha expuesto anteriormente, las composiciones tópicas farmacéuticas se deben entender como composiciones oculares tópicas.

45 Además, las composiciones de la presente invención pueden contener otros ingredientes, tal como fragancias, colorantes y otros componentes conocidos en el estado de la técnica para su uso en formulaciones tópicas.

50 Las composiciones tópicas de la presente invención se pueden preparar según métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los excipientes y/o soportes adecuados, y sus cantidades, los pueden determinar fácilmente los expertos en la materia según el tipo de formulación que se prepara.

55 En una forma de realización preferida, la composición tópica de la invención es una solución en forma de colirio, también llamada solución de colirio. La administración de los péptidos en forma de colirio implica la gran ventaja de ser fácil de usar por el sujeto en necesidad de ello, y no incómodo.

60 Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

65

Ejemplos

Ejemplo 1. GLP-1Rc se expresa en retinas humanas

Se sabe que las características principales de la neurodegeneración retiniana (apoptosis y activación glial) ya están presentes en las retinas de donantes diabéticos sin ninguna anomalía microcirculatoria en los exámenes oftalmológicos realizados durante el año anterior a la muerte (Carrasco et al., "Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration", *Diabetes Care*-2007, Vol. No. 30, pp.:2902-2908). Por tanto, un examen oftalmológico normal no excluye la posibilidad de que la neurodegeneración retiniana ya esté presente en el ojo diabético.

En el presente estudio los inventores quisieron detectar si en la retina humana se expresaba receptor de GLP-1 (GLP-1Rc).

Se obtuvieron ocho ojos humanos post mortem de ocho donantes diabéticos y ocho donantes no diabéticos (edad: 66,9±5,4 años). El tiempo pasado desde la muerte hasta la enucleación del ojo fue menor de 4 h. Después de la enucleación, un ojo de cada donante se congeló rápidamente a -80°C y se almacenó hasta que se ensayó para ARNm. El otro globo ocular se fijó en paraformaldehído al 4% y se embebió en parafina para el estudio inmunohistoquímico.

Todos los tejidos oculares se usaron según las leyes aplicables y la Declaración de Helsinki para investigación que implica tejidos humanos. Además, este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona – España).

Se recogieron la neurorretina y el epitelio de pigmento retiniano (EPR) con disección microscópica de los globos oculares aislados de los donantes. La neurorretina y el EPR se molieron a polvo en nitrógeno líquido usando un mortero. El tejido se homogenizó por columnas de centrifugación QIAshredder (Quiagen, Hilden, Alemania) y el ARNm se extrajo del tejido usando el kit RNeasy Micro (Quiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La concentración e integridad del ARNm se determinó por RNA nano Lab Chip Kit Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, EE UU). Un µg de ARNm total se sometió a transcripción inversa usando reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Roche, Nueva Jersey, EE UU) según el protocolo del fabricante para cebado con hexanucleótidos aleatorios. Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa (Q-RT-PCR) usando un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000 (Perkin-Elmer Applied Biosystems; Madrid, España) según el protocolo del fabricante. Los niveles de GLP-1Rc se evaluaron con los ensayos TaqMan.

Para un ensayo de inmunofluorescencia, los ojos parafinizados se cortaron en serie a un espesor de 7 µm. Las secciones se desparafinizaron con xileno y se rehidrataron en etanol. Las secciones después se fijaron y colocaron en solución de recuperación de antígeno (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) durante 20 min a 95°C. Las secciones se incubaron después durante 1 h con BSA al 1% en Triton X-100 al 0,3% en PBS para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos y después se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo primario específico para GLP-1Rc humano (Abcam, Cambridge, RU). Las secciones se lavaron antes de ser incubadas con anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) a temperatura ambiente durante 1 h. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos con una gota de medio de montaje que contenía DAPI para visualizar los núcleos celulares (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Los resultados de los ensayos de PCR en tiempo real cuantitativa (Q-RT-PCR) se representan en la figura 2A, en donde se representa la cantidad relativa del ARNm correspondiente al receptor de GLP-1 en varios tejidos humanos. En particular, los tejidos analizados eran muestras de epitelio de pigmento retiniano de donantes diabéticos (EPR DBT), neurorretina de donantes diabéticos (NR DBT), epitelio de pigmento retiniano de donantes no diabéticos (EPR) y neurorretina de donantes no diabéticos (NR). Como un ensayo comparativo, se analizó la expresión del receptor de GLP-1 en otros tejidos, es decir, en línea celular de páncreas humano (PH), intestino (IN), hígado (HG), y grasa visceral (G). Se usó beta actina humana como control interno de Q-RT-PCR.

Los datos en la figura 2A demostraron que la expresión del ARNm de GLP-1Rc se podía detectar en la retina de donantes tanto diabéticos como no diabéticos (EPR/DBT; NR/DBT; EPR, NR).

Los resultados del ensayo de inmunofluorescencia se representan en la figura 2B, en la que se muestra una imagen de microscopio óptico a 20X de una de las secciones parafinizadas. La flecha gruesa se refiere a la tinción verde, correspondiendo por tanto al receptor de GLP-1. Se muestran los núcleos de la capa nuclear externa (ONL) por medio de una flecha discontinua. Esta figura 2B sirve para demostrar de nuevo que el receptor de GLP-1 también se detectó en la retina por inmunohistoquímica.

Ejemplo 2. La administración tópica de un agonista de GLP-1Rc previene la neurodegeneración retiniana en ratones diabéticos

Animales y tratamientos

Se incluyeron un total de 20 ratones C57BL/KsJ-db/db obtenidos de Harlan Laboratories, Inc. Diez ratones no diabéticos C57BL/KsJ sirvieron como grupo control. Todos los experimentos se realizaron según el protocolo aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR, Barcelona – España) y los principios de CEE (86/609/CEE) y ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología). Los ratones se enjaularon en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y tuvieron acceso libre a comida y agua.

Los ratones C57BL/KsJ-db/db representan un buen modelo para estudiar las características neurodegenerativas observadas en pacientes con RD. Los ratones C57BL/KsJ-db/db portan una mutación en el gen del receptor de leptina y son un modelo para diabetes de tipo 2 inducida por obesidad. Desarrollan hiperglucemia empezando ~ 4-6 semanas de edad como resultado de consumo excesivo de comida.

Antes del análisis de los efectos de un agonista del receptor de GLP-1, los inventores evaluaron la secuencia cronológica de las anomalías retinianas asociadas con diabetes. Se realizaron electroretinografías y varias medidas de neurodegeneración incluyendo morfometría retiniana, activación glial y evaluación de apoptosis. Se concluyó que el espesor total de la retina estaba significativamente disminuido en ratones diabéticos en comparación con ratones no diabéticos en las semanas 16 y 24. Además, se observó un fenotipo diabético “reactivo” caracterizado por hiperplasia y aumento de la proteína ácida fibrilar glial (indicación de activación glial) en ratones diabéticos. También se observó un aumento significativo en el número de células ganglionares apoptóticas en ratones diabéticos en comparación con ratones no diabéticos a las 8, 16 y 24 semanas. Por tanto, este modelo animal era un modelo realmente bueno para probar cualquier compuesto dirigido a tratar o prevenir RD, y era incluso un mejor modelo que el usado para estudiar neurodegeneración retiniana en RD conocido como diabetes inducida por estreptozotocina (STZ-DM), en el que los efectos neurotóxicos de la STZ pueden comprometer los resultados.

Un agonista de GLP-1Rc, liraglutida, que es un análogo de GLP-1 (7-37) se administró en forma de colirio (Liraglutida, concentración; 6 mg/ml en solución de agua destilada con cloruro de sodio al 0,9%) directamente en la superficie corneal superior de cada ojo usando una jeringa en ratones de 8 semanas de edad. Como control, se administraron colirio del vehículo (cloruro de sodio al 0,9% en agua). Se trataron diez ratones con liraglutida y se trataron 10 ratones con el vehículo. El tratamiento (liraglutida o vehículo) se administró una vez al día durante 14 días. El día 15, los ojos de los animales se instilaron con una gota de liraglutida o vehículo aproximadamente una hora antes de la necropsia. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Los ojos se enuclearon inmediatamente y la neurorretina se separó. La neurorretina de uno de los ojos se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para evaluaciones de ARNm y proteína. El otro ojo se congeló rápidamente en medio de congelación de tejido, TFM™ (Electron Microscopy Sciences), por inmersión en nitrógeno líquido, y se crioseccionó a 8 mm a través del plano dorsal/ventral. Las secciones se montaron en portaobjetos y se almacenaron a -80°C. Estas secciones se prepararon para la evaluación de la morfología retiniana, evaluación de la presencia de GLP-1Rc, presencia de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e inmunorreactividad por marcaje de mella terminal por transferencia terminal de dUTP (TUNEL).

La evaluación de la presencia de GLP-1Rc en las neurorretinas de los ratones se realizó determinando la expresión del ARNm por PCR en tiempo real, así como por análisis inmunohistoquímico y de inmunotransferencia.

Expresión de ARNm de GLP-1Rc

La expresión del ARNm se analizó por PCR en tiempo real. Se usaron los siguientes cebadores GGGTCTCTGGCTACATAAGGACAAC (directo, SEQ ID NO: 6) y AAGGATGGCTGAAGCGATGAC (inverso, SEQ ID NO: 7).

Análisis inmunohistoquímico

Se evaluó GLP-1Rc por microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo específico contra GLP-1Rc. Las secciones se fijaron en metanol ácido (-20°C) durante 2 min, seguido por tres lavados en PBS, de 5 min cada uno. Las secciones se permeabilizaron con TBS-Triton X-100 al 0,1% y se incubaron en bloqueante (BSA al 10% y suero de cabra al 10% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron después con GLP-1Rc (Abcam Ltd, Cambridge, R.U.) (dilución 1:500 preparada en solución de bloqueo) durante la noche a 4°C en una atmósfera húmeda. Después de tres lavados en PBS, de 5 min cada uno, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra Alexa 594 (Invitrogen, RU) (dilución 1:200 preparada en solución de bloqueo). Las secciones se lavaron tres veces en PBS, se contrañieron con Hoechst y se montaron con medio de montaje de fluorescencia (Prolong, Invitrogen) y se montaron con un cubreobjetos. Se registraron imágenes con un microscopio Olympus usando ajustes de brillo y contraste idénticos.

Análisis de inmunotransferencia

Se transfirieron neurorretinas a tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,1 mM; Triton al 1%, NaCl 150 mM; NaF, 20 mM; Na₃PO₄, 2 mM) e inhibidores de proteasa 1X de Sigma (Sigma-Aldrich, RU) y después se homogenizaron por jeringa. Los homogenizados se incubaron en hielo durante 30 minutos

y se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La concentración de proteína del sobrenadante se determinó usando el ensayo BCA (Pierce, Thermo Scientific USA). Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x (Tris-HCl, 1 M, pH 6,8; dodecil sulfato de sodio (SDS), al 20%, glicerol al 10%, mercaptoetanol; y 0,01 g de azul de bromofenol) y se hirvieron durante diez minutos. Las muestras de proteína se resolvieron por SDS-PAGE al 10%. Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Bio-Rad Laboratories, RU). Las membranas se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente en leche desnatada en polvo al 5%, Tween al 0,1% en solución salina tamponada con Tris (TBS), y después se incubaron con el anticuerpo primario contra GLP-1R (dilución 1:1000; Abcam Ltd, Cambridge, RU) durante la noche a 4°C. Las membranas se lavaron extensamente con TBS-T (Tween al 0,1%) y se incubaron con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano durante una hora a temperatura ambiente (dilución 1:5000, Dako, Dinamarca). Las bandas se visualizaron usando un sistema de detección de quimioluminiscencia (Millipore, EE UU). La expresión relativa de proteína se cuantificó usando ImageJ.

Medidas de neurodegeneración

Para determinar la neurodegeneración se realizaron análisis inmunohistoquímico para evaluación de la activación glial, así como análisis inmunohistoquímico para evaluación de apoptosis. Además, se evaluó el metabolismo de glutamato.

La activación glial se evaluó por microscopía de fluorescencia usando anticuerpos específicos contra GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Se fijaron secciones en metanol ácido (-20°C) durante 2 min, seguido por tres lavados en PBS, de 5 min cada uno. Las secciones se permeabilizaron con TBS-Triton X-100 al 0,025% y se incubaron en bloqueante (BSA al 1% y suero de cabra al 10% en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron después con anti-GFAP de conejo (Abcam Ltd, Cambridge, R.U.) (dilución 1:500 preparada en solución de bloqueo) durante la noche a 4°C en una atmósfera húmeda. Después de tres lavados en PBS, de 5 min cada uno, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra Alexa 488 (Invitrogen) (dilución 1:200 preparada en solución de bloqueo). Las secciones se lavaron tres veces en PBS, se contratiñeron con Hoechst y se montaron con medio de montaje de fluorescencia (Prolong, Invitrogen) y se montaron con un cubreobjetos. Se registraron imágenes digitales comparativas de muestras diabéticas y control con un microscopio Olympus usando ajustes de brillo y contraste idénticos.

Para evaluar el grado de activación glial se usó un sistema de puntuación basado en el nivel de tinción de GFAP previamente descrito (Anderson et al. "Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat". *Clin Ophthalmol* — 2008, Vol. No.: 2, pp.:801-816). El sistema de puntuación era como sigue: región de terminales de prolongaciones de células de Müller/GCL solo (puntuación 1); región de terminales de prolongaciones de células de Müller/GCL más unas pocas prolongaciones proximales (puntuación 2); terminales de prolongaciones de células de Müller más muchas prolongaciones, aunque no se extienden a ONL (puntuación 3); terminales de prolongaciones de células de Müller más prolongaciones a todo lo largo con algunas en la ONL (puntuación 4); terminales de prolongaciones de células de Müller más muchas prolongaciones oscuras de GCL al margen externo de ONL (puntuación 5).

La apoptosis se evaluó usando el método TUNEL (marcaje de mella final con transferencia terminal de dUTP) acoplado con fluoresceína (kit DeadEnd Fluorometric TUNEL System, PROMEGA, EE UU) con tinción de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Se permeabilizaron criosecciones de retina por incubación durante 2 min en hielo con Triton X-100 al 0,1% en citrato de sodio al 0,1%, recién preparado. El anticuerpo secundario fue anti-conejo de cabra Alexa 594 (Invitrogen) (dilución 1:200 preparada en solución de bloqueo con BSA al 5%). Para evaluación por microscopía de fluorescencia se usó una longitud de onda de excitación en el intervalo de 450-500 nm (por ejemplo, 488 nm) y detección en el intervalo de 515-565 nm (verde).

La acumulación de glutamato en el espacio extracelular y la hiperactivación de los receptores de glutamato ("excitotoxicidad") desempeñan un papel importante en la neurodegeneración retiniana. Los transportadores de glutamato son esenciales para mantener la concentración extracelular de glutamato por debajo de niveles neurotóxicos. El transportador de glutamato/aspartato (GLAST) es el transportador de glutamato más dominante, respondiendo al menos del 50% de la absorción de glutamato en la retina de mamífero. Se evaluaron GLAST y glutamato por microscopía de fluorescencia usando anticuerpos específicos [anti-GLAST de conejo (EAAT1) (1:100, Abcam ab416, Cambridge, RU) o anti-L-glutamato de conejo (1:100, Abcam ab9440, Cambridge, RU)].

Se hizo el análisis estadístico de los datos recuperados. Se evaluó la distribución normal de las variables usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se presentaron como media \pm DE. Se realizaron comparaciones de variables continuas entre ratones diabéticos y no diabéticos usando la prueba de la t de Student para datos independiente. Se realizaron comparaciones entre variables categóricas por la prueba exacta de Fisher. Los niveles de significación estadística se ajustaron a $p < 0,05$.

Resultados:

Expresión de GLP-1Rc en retina de ratones:

Aunque los datos no se muestran, la expresión del ARNm de GLP-1Rc se detectó en la neuroretina de ratones diabéticos (db/db) así como en ratones no diabéticos (db/+) por PCR en tiempo real. La expresión de GLP-1Rc observada en retina estaba en el mismo intervalo que la observada en páncreas, un tejido diana reconocido para GLP-1. La proteína GLP-1Rc también se detectó por inmunohistoquímica y por análisis de inmunotransferencia.

Los datos de la activación glial se representan en la figura 3. Como se puede ver en la figura 3, en la retina de ratones diabéticos tratados con placebo (C), la expresión de GFAP era prominente a lo largo de la membrana limitante interna (INL), en terminaciones de prolongaciones de células de Müller, y en fibras radiales de células de Müller que se extienden a través tanto de la retina interna (INL) como externa (ONL). Los ratones diabéticos tratados con colirio de liraglutida (T) presentaban puntuación de inmunofluorescencia de GFAP significativamente menor que los ratones diabéticos tratados con vehículo ($p < 0,05$), y similar a ratones no diabéticos ($p = n.s$) (Tabla 1).

A continuación, la tabla 1 muestra la cuantificación de la activación glial (en porcentaje, %) basado en el sistema de puntuación (Anderson et al. Clin Ophthalmol 2008, anteriormente).

Tabla 1.

Puntuación de activación glial	ratones db/db tratados con placebo (n=10)	ratones db/db tratados con agonista de GLP-1Rc liraglutida (n=10)
1	4,9%	58,5%
2	17,1%	39,1%
3	46,3%	2,4%
4	26,8%	0%
5	0%	0%

Los datos de apoptosis retiniana evaluados por el ensayo TUNEL aparecen en la figura 4, en donde en el panel A se muestra el porcentaje de células positivas para TUNEL en la capa de células ganglionares (GCL) en ratones diabéticos tratados con el análogo de GLP-1 (7-37) liraglutida, (T, n=10) y en ratones diabéticos tratados con vehículo (Control, C, n=10). Los datos también se describen en el panel B para inmunofluorescencia positiva para TUNEL en neuroretina de ratones diabéticos tratados con el agonista de GLP-1R (T) y para ratones diabéticos tratados con vehículo (Control, C). En este panel B se representa en unidades arbitrarias la cuantificación de la fluorescencia TUNEL en la retina entera (neuroretina). U.A.: unidades arbitrarias. Los resultados son media \pm DE. * $p < 0,05$.

Como se puede ver en la figura 4, el porcentaje entero de células apoptóticas retinianas en la retina entera, así como el porcentaje de células apoptóticas en las capas retinianas (capa nuclear externa, capa nuclear interna y capa de células ganglionares) era significativamente mayor en comparación con el observado en retinas de controles no diabéticos de edad coincidente ($p < 0,01$). En todos los grupos la apoptosis era la más alta en la capa de células ganglionares. Los ratones diabéticos tratados con el agonista de GLP-1Rc (liraglutida) presentaban una proporción significativamente menor de apoptosis en la capa de células ganglionares que los ratones diabéticos tratados con placebo ($p < 0,05$). Además, los ratones diabéticos tratados con colirio del agonista de GLP-1Rc presentaban intensidad de inmunofluorescencia TUNEL + significativamente menor que ratones diabéticos tratados con vehículo, y similar a ratones no diabéticos ($p = n.s$). Por tanto, en ratones tratados había niveles menores de células apoptóticas, que es una medida indirecta de menor daño retiniano.

El aumento en los niveles de glutamato producido por diabetes (C) se anuló en ratones diabéticos tratados con el agonista de GLP-1Rc (T). Este efecto beneficioso se asociaba con un aumento significativo en el contenido en GLAST en ratones diabéticos tratados con el agonista de GLP-1Rc (T) (figura 5).

Todos estos datos juntos proporcionan la primera evidencia de que la administración ocular tópica (colirio) de agonistas de GLP-1Rc tiene un potente efecto en prevenir el proceso neurodegenerativo retiniano que se produce en los estadios tempranos de retinopatía diabética. Los datos también proporcionan evidencia de que otras enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial se pueden tratar y/o prevenir con la administración ocular tópica (colirio) de agonistas de GLP-1Rc, en particular con la administración tópica de los péptidos divulgados anteriormente.

Referencias citadas en la solicitud

- Schmidt et al., "Neurodegenerative Diseases of the Retina and Potential for the Protection and Recovery", Current Neuropharmacology - 2008, Vol. No. 6, pp.: 164-178.
- Simo et al., "Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy: therapeutic implications", Br. J. Ophthalmol. - 2012, vol. 96, pp.1285-1290
- Aiello et al., "Targeting Intraocular Neovascularization and Edema - One Drop at a Time", N. Eng. J Med - 2008, vol. 359, pp. 967-969.

- Urtti A et al., "Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery". Adv. Drug. Deliv. Rev. 2006, vol. 58, pp. 1131-1135.
- WO2007062434
- 5 - Zhang et al., "Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats", Invest Ophthalmol Vis Sci.-2011, vol.52(1), pp.:278-85.
- EP0944648.
- US5424286
- Carrasco et al., "Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is Associated With Retinal Neurodegeneration", Diabetes Care-2007, Vol. No. 30, pp.:2902-2908
- 10 - Anderson et al. "Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat". Clin Ophthalmol - 2008, Vol. No.: 2, pp.:801-816.

Lista de secuencias

- 15 <110> Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron-Institut de Recerca
- <120> Péptidos para su uso en el tratamiento tópico de enfermedades neurodegenerativas retinianas, en particular en
- 20 estadios tempranos de retinopatía diabética y otras enfermedades retinianas en las que la neurodegeneración desempeña un papel esencial.
- <130> P2588PC00
- <150> EP13382063
- 25 <151> 01-03-2013
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <223> región N-terminal de un péptido capaz de interactuar con el receptor del péptido-1 similar a glucagón de mamífero
- 40 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (2)..(2)
- <223> X es un aminoácido seleccionado de alanina y glicina
- 45 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (10)..(10)
- <223> X es un aminoácido seleccionado de valina y leucina
- 50 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (12)..(12)
- <223> X es un aminoácido seleccionado de serina y lisina
- 55 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (13)..(13)
- <223> X es un aminoácido seleccionado de tirosina y glutamina
- 60 <400> 1
- His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa**
- 1 5 10**
- <210> 2
- <211> 31

ES 2 644 016 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Liraglutida; análogo del péptido-1 similar a glucagón (7-37) (GLP-1 (7-37))

<220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (20)..(20)
 <223> El residuo de lisina (K, Lys) comprende el sustituyente lipofílico N épsilon- (gamma-glutamil (N-alfa-hexadecanoilo)) unido por un enlace amida al grupo amino de la cadena lateral de lisina

<400> 3
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

<210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Exenatida; agonista del péptido similar a glucagón; versión sintética de la hormona exendina-4 encontrada en la saliva del monstruo de Gila

<220>
 <221> MOS_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> X es un residuo de serina en el que el -COOH terminal se ha sustituido por un grupo -NH2

<400> 4
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Xaa
 35

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido con una longitud de secuencia de 13 a 50 aminoácidos, consistiendo la región N-terminal de dicho péptido en la secuencia:

HXaa¹EGTFTSDXaa²SXaa³Xaa⁴ (SEQ ID NO: 1) en donde:

Xaa¹ es un aminoácido seleccionado de alanina y glicina;
 Xaa² es un aminoácido seleccionado de valina y leucina;
 Xaa³ es un aminoácido seleccionado de serina y lisina;
 Xaa⁴ es un aminoácido seleccionado de tirosina y glutamina; e
 histidina es el residuo N-terminal;

para su uso en el tratamiento tópico del ojo y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana.

2. El péptido para su uso según la reivindicación 1, en donde la longitud de secuencia es de 30 a 40 aminoácidos.
3. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la enfermedad neurodegenerativa retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética (RD), degeneración macular senil, glaucoma y retinitis pigmentosa.
4. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enfermedad neurodegenerativa retiniana es retinopatía diabética.
5. El péptido para su uso según la reivindicación 4, que se usa en el tratamiento tópico de estadios tempranos de la retinopatía diabética.
6. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que Xaa¹ es alanina, Xaa² es valina, Xaa³ es serina, y Xaa⁴ es tirosina.
7. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un péptido-1 similar a glucagón de mamífero.
8. El péptido para su uso según la reivindicación 7, que es el péptido-1 similar a glucagón (7-37) humano de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.
9. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es uno con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG,

en donde el residuo de lisina (K) comprende el sustituyente lipofílico N^ε-(γ-glutamil(N^α-hexadecanoilo)) unido por un enlace amida al grupo amino de la cadena lateral de la lisina.

10. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que Xaa¹ es glicina, Xaa² es leucina, Xaa³ es lisina, y Xaa⁴ es glutamina.
11. El péptido para su uso según la reivindicación 10, que es uno con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4:

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPXaa⁵,

en donde Xaa⁵ es un residuo de serina en el que el -COOH terminal se ha sustituido por un grupo -NH₂.

12. El péptido para su uso según la reivindicación 10, que es uno con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8:

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKXXXXXaa⁶,

en donde Xaa⁶ es un residuo de lisina en el que el -COOH terminal se ha sustituido por un grupo -NH₂.

13. Una composición tópica farmacéutica para su uso en el tratamiento tópico del ojo y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa retiniana, que comprende el péptido como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

14. La composición tópica farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, que se selecciona del grupo que consiste en soluciones, cremas, lociones, ungüentos, emulsiones, y suspensiones.
- 5 15. La composición tópica farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, que es una solución de colirio.
16. La composición tópica farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde la enfermedad neurodegenerativa retiniana se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular senil, glaucoma y retinitis pigmentosa.
- 10 17. La composición tópica farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde la enfermedad neurodegenerativa retiniana es retinopatía diabética.

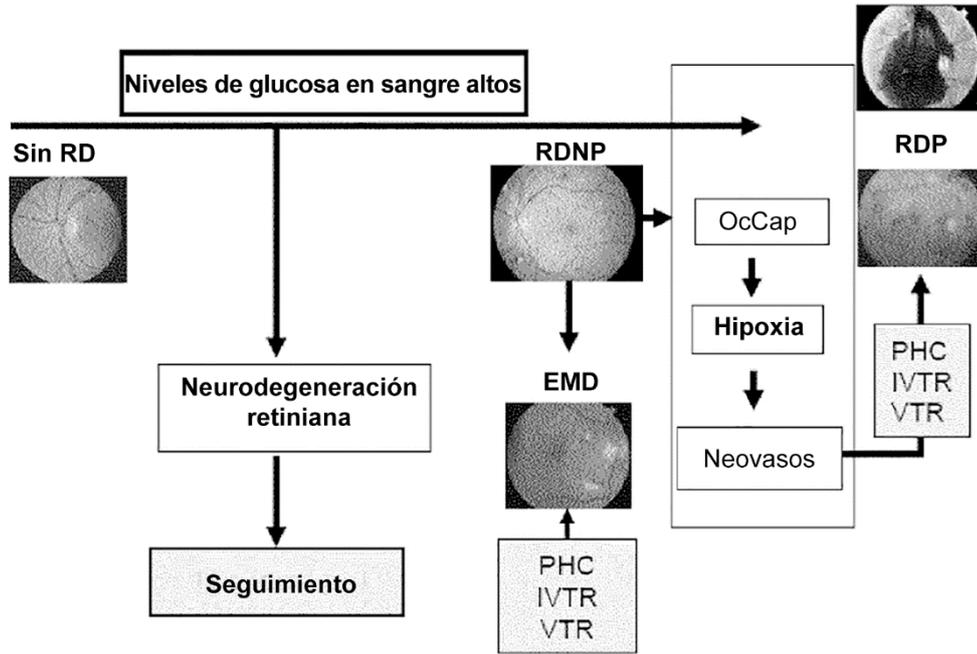


FIG. 1

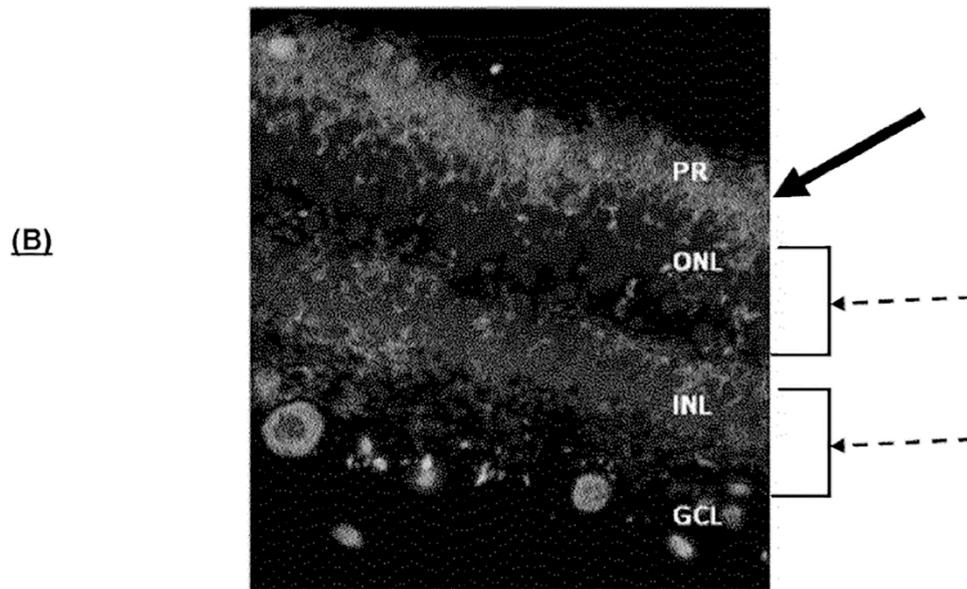
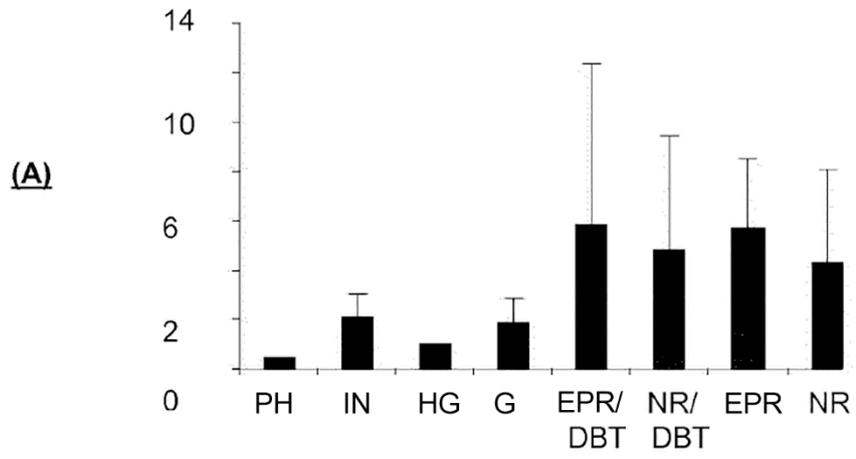


FIG. 2

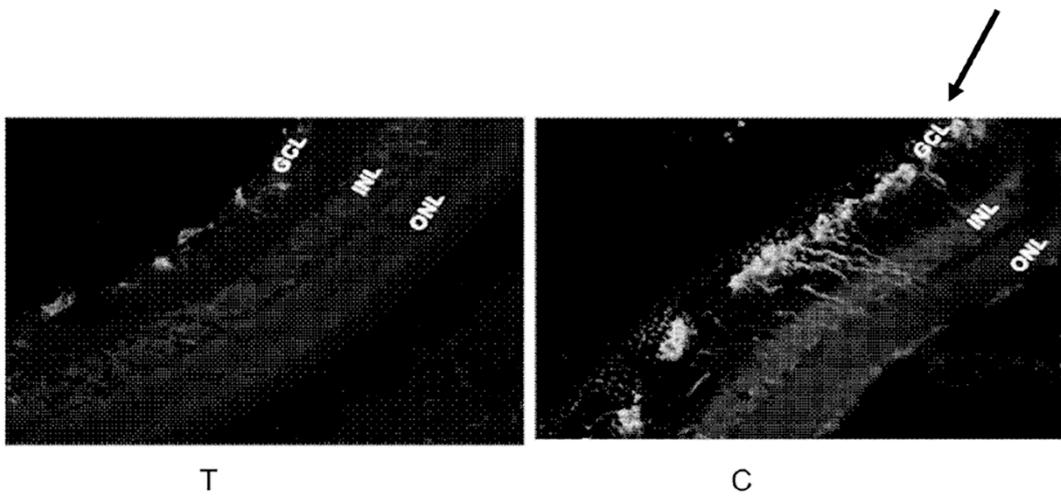


FIG. 3

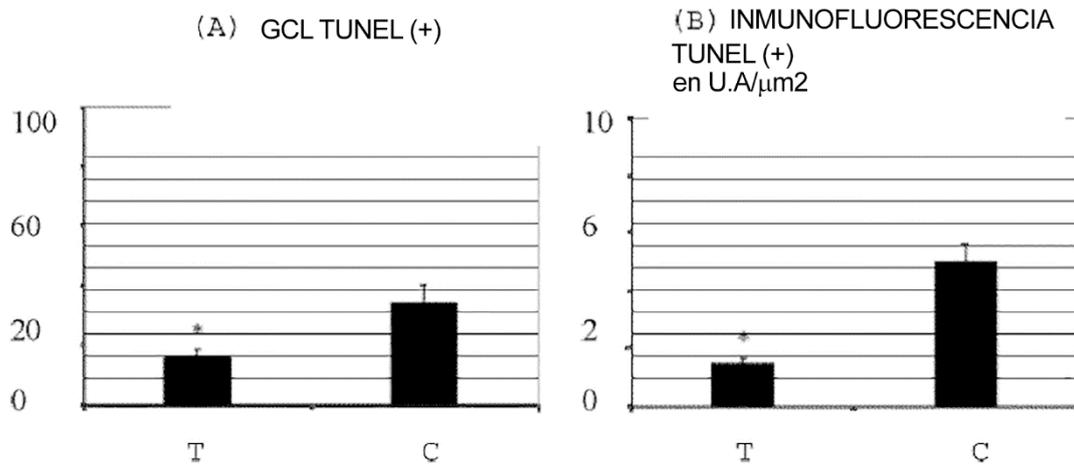


FIG. 4

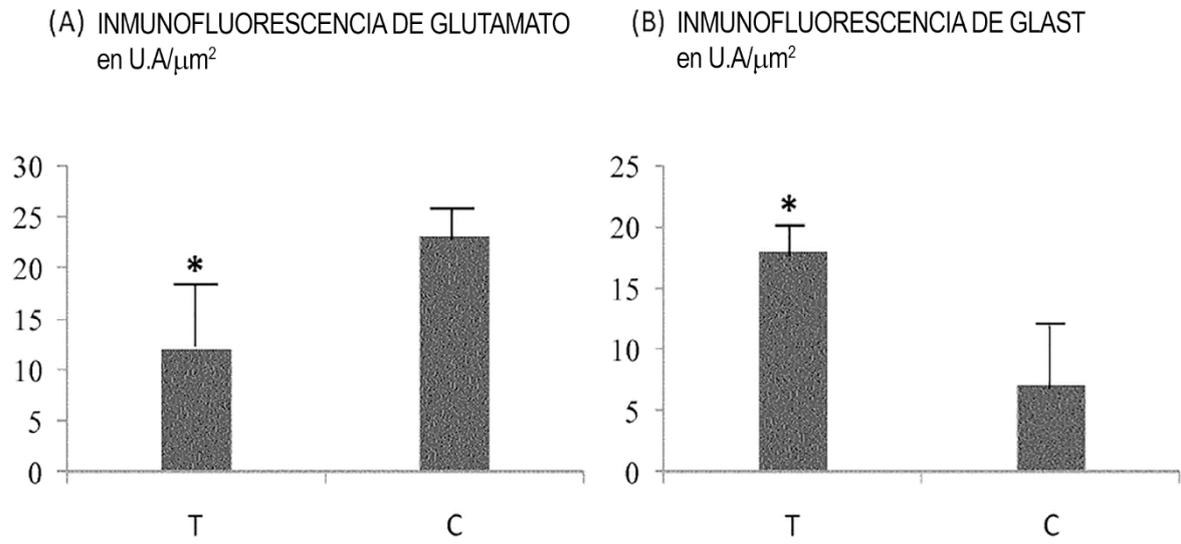


FIG. 5