(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 293**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01)
A61P 27/10 (2006.01)
A61P 27/12 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/027852**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152818**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14722877 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2968239**

(54) Título: **Métodos de inhibición de cataratas y presbicia**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361782860 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2019

(73) Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110, US

(72) Inventor/es:

MUTHUKUMAR, MURUGAPPAN y
MOHR, BENJAMIN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 727 293 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

Métodos de inhibición de cataratas y presbicia

Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a métodos para inhibir o revertir la progresión de cambios relacionados con la edad en la lente cristalina de un ojo.

Antecedentes

La lente cristalina del ojo es una estructura transparente que se suspende inmediatamente detrás del iris, lo que hace que los rayos de luz se centren en la retina. La lente contiene proteínas solubles e insolubles; juntas constituyen el 35 por ciento del peso húmedo de la lente. En una persona joven, de lente sana, las proteínas solubles, comúnmente denominadas como cristalinas, constituyen el 90 por ciento de las proteínas de la lente. Durante el proceso de envejecimiento, las cristalinas de la lente forman agregados insolubles, que, al menos en parte, tienen en cuenta la disminución de la deformabilidad del núcleo de la lente, que caracteriza la presbicia, la pérdida de la capacidad del ojo para cambiar el enfoque para ver objetos cercanos. Se cree que la formación de agregados insolubles de lentes cristalinas en la presbicia es una etapa temprana en la formación de cataratas relacionadas con la edad.

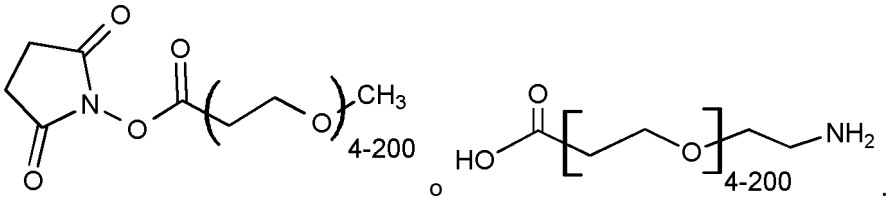
Las cataratas se definen por la nubosidad u opacificación en la lente cristalina del ojo. Como las edades individuales, las cataratas se forman a medida que las cristalinas presentes en la lente se convierten en agregados, dando como resultado un aumento de la opacidad de la lente. Específicamente, hay una disminución progresiva en la concentración de la chaperona soluble, cristalina α, en los núcleos de las lentes humanas con la edad, a medida que se incorpora en agregados de alto peso molecular y proteínas insolubles. La presencia de agregados compromete la salud y la función de la lente y se deja sin tratar, las cataratas pueden conducir a una pérdida sustancial de la visión o incluso a la ceguera. Actualmente, el tratamiento más común para las cataratas es la cirugía.

Las cristalinas son proteínas estructurales expresadas en su mayoría en las células de fibra de la lente del ojo de los vertebrados. Las cristalinas se dividen en dos subfamilias: las cristalinas α (αA y αB) que son miembros de la pequeña superfamilia de proteínas de choque térmico, funcionando también como proteínas estructurales y chaperonas moleculares; y la superfamilia ligada evolutivamente de cristalinas β y γ que funcionan principalmente como proteínas estructurales en la lente, y contribuyen a las propiedades de transparencia y refractivas de la estructura de la lente. Además de su papel en el desarrollo de las cataratas, la cristalina αA y la cristalina αB se han visto implicadas en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alexander, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

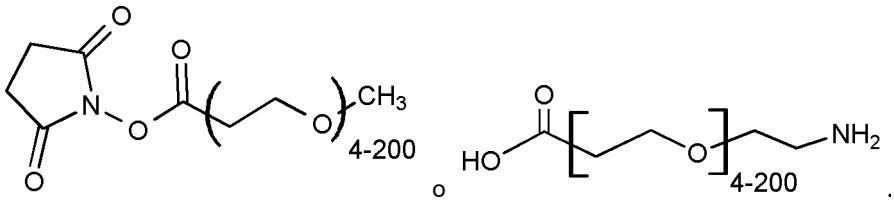
La Solicitud de Patente de los EE.UU. 2008/0227700 describe la desagregación de proteínas usando péptidos que tienen actividades de chaperona como tratamiento terapéutico. Específicamente, se usaron péptidos αB para desagregar agregados inducidos por pH de cristalina β, medidos por la dispersión de la luz. La provisión de un suministro continuo de cristalinas alfa en la lente es un desafío. Lo que se necesita son métodos alternativos adecuados para la desagregación de cristalinas para la inhibición y/o reversión de cataratas y presbicia.

Sumario

En un aspecto, la invención reivindicada proporciona una composición oftálmica para usar en un método para inhibir o revertir la progresión de la formación de cataratas, presbicia o degeneración relacionada con la edad de una lente cristalina en un ojo, comprendiendo dicho método poner en contacto el ojo con una cantidad eficaz de dicha composición, comprendiendo dicha composición



En otro aspecto, la invención reivindicada proporciona una composición oftálmica que comprende una molécula bifuncional, en donde la molécula bifuncional es



También se describe un método para inhibir o revertir la progresión de la formación de cataratas, presbicia o degeneración relacionada con la edad de una lente cristalina en un ojo, comprendiendo dicho método poner en contacto el ojo con una cantidad eficaz inhibidora de la degeneración de una composición oftálmica que comprende al menos un agente de enmascaramiento de carga de la cristalina γ, en donde el agente de enmascaramiento de la carga de la cristalina γ no es un polipéptido, junto con una composición oftálmica que comprende una molécula bifuncional que contiene un grupo saliente unido covalentemente a una cerda molecular.

También se describe un método para tratar una enfermedad relacionada con el plegamiento de proteínas en un paciente que lo necesite, comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula bifuncional que contiene un grupo saliente unido covalentemente a una cerda molecular.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los datos de MALDI-TOF para la modificación de la cristalina γ con PEG24.
La Figura 2 muestra el NICF de cristalina γ modificada con PEG24.
La Figura 3 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con PEG24.
La Figura 4 muestra la gráfica de T versus q^2 para la cristalina γ modificada con PEG24.
La Figura 5 muestra los datos de MALDI-TOF para la modificación de la cristalina γ con PEG4.
La Figura 6 muestra el NICF de cristalina γ modificada con PEG4.
La Figura 7 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con PEG4.
La Figura 8 muestra la gráfica de T versus q^2 para la cristalina γ modificada con PEG4.
La Figura 9 muestra los datos de MALDI-TOF para la modificación de la cristalina γ con CAPEG.
La Figura 10 muestra el NICF de cristalina γ modificada con CAPEG4.
La Figura 11 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con CAPEG4.
La Figura 12 muestra la gráfica de T versus q^2 para la cristalina γ modificada con CAPEG4.
La Figura 13 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con MMPEG.
La Figura 14 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con Biotina.
La Figura 15 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con Biotina-PEG.
La Figura 16 muestra la función de distribución de la cristalina γ modificada con acetato de sulfo-N-hidroxisuccinimida.
La figura 17 muestra varios grupos de enmascaramiento de carga. En cada estructura, R es la cerda molecular.
La figura 18 muestra varias cerdas moleculares.
La figura 19 muestra un esquema de la medición del transporte transepitelial.
La Figura 20 muestra el CAPEG4 que se transportó a la parte inferior de la célula en el experimento de transporte transepitelial.
La Figura 21 muestra el pH de Opisol® versus los mg/ml de CAPEG4 agregado.

Los expertos en la técnica apreciarán y entenderán las características descritas anteriormente y otras características de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

En el presente documento se describen métodos para desagregar/prevenir la formación de un agregado de cristalina γ que comprende poner en contacto el agregado de cristalina γ con una composición que comprende un agente de enmascaramiento de carga cristalina γ en una cantidad suficiente para desagregar y/o prevenir la formación del agregado de cristalina γ. Un experto en la técnica reconocerá que, si bien las moléculas descritas en el presente documento se describen como agentes enmascaradores de la carga de la cristalina γ, también pueden desagregar/prevenir la agregación de proteínas de la cristalina β. Además, se describen métodos para inhibir o revertir la progresión de la formación de cataratas en un ojo que comprende poner en contacto el ojo con una cantidad eficaz inhibidora de cataratas de una composición oftálmica que comprende un agente de enmascaramiento de carga de la cristalina γ. También se describen métodos para inhibir o revertir la progresión de la presbicia en un ojo que comprende poner en contacto el ojo con una cantidad eficaz para inhibir la presbicia de una composición oftálmica que comprende un agente de enmascaramiento de la carga de la cristalina γ. Opcionalmente, en la metodología descrita, el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ no es un polipéptido.

Los inventores de la presente invención han empleado técnicas tales como la dispersión de luz dinámica para estudiar los agregados formados por las cristalinas γ en solución. Tanto la cristalina β como la γ son proteínas estructurales altamente estables que comprenden cuatro motivos de clave griega en dos dominios. Mientras que las cristalinas β

forman dímeros, así como hetero- y homooligómeros, las cristalinas γ son monómeros en el ojo. Además, mientras que las cristalinas β exhiben una fuerza repulsiva en solución, las cristalinas γ exhiben una interacción atractiva atribuida a interacciones no específicas de proteínas o agua. También se ha planteado la hipótesis de que las modificaciones del tiol causan la formación de agregados de cristalina γ en solución.

La familia de cristalina γ humana contiene cinco miembros, las cristalinas γA-D y las cristalinas γ-S. Las cristalinas γA-D se expresan temprano en el desarrollo y se encuentran principalmente en el núcleo de la lente; las cristalinas γC y γD son las más frecuentes. Se ha demostrado que el despliegue y replegamiento de la cristalina γ-D *in vitro* conduce a un aumento de la agregación de proteínas debido a la falta de estabilidad de la proteína replegada. La cristalina γS ha demostrado ser una proteína clave en la supresión de la agregación de otras proteínas cristalinas, llevando a una lente clara.

Sin estar sujeto a la teoría, se cree que la agregación de cristalina γ es tanto un fenómeno electrostático como hidrófobo, con las fuerzas electrostáticas dominantes. La adición de las proteínas de choque térmico cristalinas αA y αB interrumpe la agregación de cristalina γ. Un agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ que puede interrumpir las interacciones electrostáticas puede sustituir la actividad chaperona de la cristalina α y prevenir/reducir el tamaño del agregado de cristalina γ.

El tratamiento con agentes enmascaradores de carga de cristalina γ se puede usar para tratar enfermedades y/o afecciones que resultan de la agregación de cristalinas γ, como cataratas y presbicia. Como se usa en el presente documento, una catarata es una opacidad de la lente cristalina del ojo causada por interacciones de proteínas alteradas en la lente. Las interacciones entre proteínas incluyen el plegamiento incorrecto de proteínas, así como las interacciones proteína-proteína, como la agregación. La presbicia es el deterioro de la visión debido al avance de los años o la vejez. Los síntomas de la presbicia incluyen una capacidad de enfoque reducida para objetos cercanos, fatiga visual, dificultad para leer letra pequeña, fatiga al leer o mirar una pantalla iluminada, dificultad para ver claramente de cerca, menos contraste al leer letras impresas, necesidad de una luz más brillante y más directa para la lectura, la necesidad de mantener el material de lectura más lejos para poder verlo claramente, y dolores de cabeza, especialmente dolores de cabeza cuando se utiliza la visión de cerca. Las personas que sufren de presbicia pueden tener una visión normal, pero la capacidad de enfocar objetos cercanos se pierde, al menos parcialmente, con el tiempo, y esos individuos llegan a necesitar gafas para las tareas que requieren visión de cerca, como la lectura. La presbicia afecta a casi todos los individuos mayores de 40 años en mayor o menor grado.

En el método de inhibición de la progresión de la formación de cataratas en un ojo, es posible que el ojo ya contenga una o más cataratas en desarrollo o completamente desarrolladas antes de que se ponga en contacto con el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ. En consecuencia, el método se puede utilizar para inhibir la formación de cataratas adicionales en el ojo, o para inhibir la formación de cataratas maduras a partir de las cataratas en desarrollo ya presentes en el ojo. Como alternativa, el ojo puede estar libre de cualquier catarata en desarrollo o completamente desarrollada antes de que se ponga en contacto con el agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ.

En el método de reversión de la progresión de la formación de cataratas en un ojo, la reversión al menos parcial a total de las cataratas en el ojo se logra poniendo en contacto el ojo con un agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ como se describe en el presente documento.

Asimismo, en el método de inhibición de la progresión de la presbicia en un ojo, es posible que el individuo ya esté experimentando uno o más síntomas de presbicia antes de que el ojo se ponga en contacto con el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ. En consecuencia, el método puede usarse para reducir la progresión de los síntomas experimentados o para inhibir la formación de síntomas adicionales de presbicia. Como alternativa, el ojo puede estar libre de cualquier síntoma de presbicia antes de ponerse en contacto con el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ.

En el método de reversión de la progresión de la presbicia en un ojo, la reversión al menos parcial o total de los síntomas de la presbicia en el ojo se logra poniendo en contacto el ojo con un agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ es una molécula adecuada para interferir con las interacciones proteína-proteína electrostática de cristalina γ que conducen a la agregación de cristalina γ. Opcionalmente, en la metodología descrita, el agente de enmascaramiento no es un polipéptido, los agentes de enmascaramiento de la carga de cristalina γ impiden la formación de agregados de cristalina γ y/o reducen el tamaño de los agregados preformados.

El agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ puede ser una solución salina de alta concentración, teniendo una concentración de sal superior a 400 mM. El término "sal", como se usa en el presente documento, está destinado a incluir una sal orgánica o inorgánica, incluyendo pero no limitado a uno o más de NaCl, KCl, haluros de amonio, tales como NH_4Cl, haluros de metales alcalinotérreos tales como $CaCl_2$, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio,

acetato de calcio o mezclas de los mismos. Las sales orgánicas adicionales incluyen sales de alquilamonio tales como nitrato de etilamonio, citrato de sodio, formiato de sodio, ascorbato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de sodio, clorhidrato de trimetamina, succinato de sodio y combinaciones de los mismos. Sin estar sujeto a la teoría, se cree que la identidad del ion, por ejemplo, Li+, Na+ y K+, puede afectar a la capacidad del agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ para prevenir la agregación de cristalina γ.

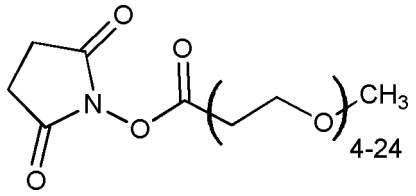
Se mostró inesperadamente en este caso que las concentraciones de sal, por ejemplo, KCl, de menos de 300 nM no proporcionaron una reducción en el tamaño de los agregados de cristalina γ. Sin embargo, a concentraciones de KCl de 400 a 1000 mM, la formación de agregados fue eficazmente inhibida.

El agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ puede ser una molécula bifuncional que contenga un grupo saliente unido covalentemente a una cerda molecular. La molécula bifuncional interactúa con las cargas en las moléculas de cristalina γ, como los restos lisina y arginina cargados positivamente y los restos glutamato y aspartato cargados negativamente. La cerda molecular es una especie hidrófila, soluble en agua que proporciona distancia entre las moléculas de cristalina γ, evitando la agregación. Sin estar sujeto a la teoría, se cree que la molécula bifuncional reacciona y coloca eficazmente la cerda molecular sobre la proteína, y el grupo saliente se expulsa durante la reacción. La cerda molecular unida covalentemente evita la agregación de las moléculas de cristalina γ. Sin estar sujeto a la teoría, se cree que las moléculas bifuncionales descritas en el presente documento también pueden actuar como inhibidores de la interacción de cristalina β.

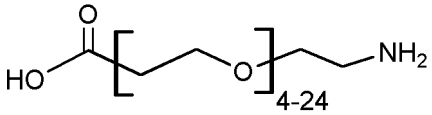
Los grupos salientes ejemplares (también llamados grupos reactivos) incluyen succinimida y grupos funcionales de ácido carboxílico, específicamente N-hidroxisuccinimida y COOH. El grupo saliente puede ser biocompatible. Otros ejemplos de grupos salientes incluyen isocianato, isotiocianato, cloruro de sulfonilo, aldehído, carbodiimida, azida de acilo, anhídrido, fluorobenceno, carbonato, éster de N-hidroxisuccinimida, imido-éster, epóxido y éster fluorofenílico. La Figura 17 muestra varios grupos salientes en los que el grupo R es la cerda molecular. Cuando la molécula bifuncional contiene COOH, el agua se va cuando reacciona con un grupo amina de la proteína. Cuando la molécula bifuncional contiene N-hidroxisuccinimida, no se libera agua. En una reacción de NH_2, el agua se va cuando el NH_2 reacciona con un grupo COOH en la proteína.

En la metodología descrita, las cerdas moleculares ejemplares incluyen polietilenglicoles lineales o ramificados que tienen 4 o más grupos oxietileno, tales como 4 a 200 grupos de oxietileno. También se incluyen polietilenglicoles modificados, tales como alcoxi y ariloxi polietilenglicoles, que tienen de 4 a 200, específicamente 4 a 24 grupos oxietileno, alquiloxietileno o ariloxietileno. Las cerdas moleculares alternativas incluyen poli 2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), poli(2-hidroxietil}metacrilato (HEMA), poli(2-oxacilinas), poli(m-fosfocolina), polilisina y ácido poliglutámico. La figura 18 muestra varias cerdas moleculares. La cerda molecular puede tener un peso molecular promedio en número de 150 a 8000.

El agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ bifuncional puede ser:



O



.

Los agentes de enmascaramiento de carga de cristalina γ bifuncionales descritos en el presente documento también son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el plegamiento de proteínas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. Los agentes de enmascaramiento de la carga de cristalina bifuncional se administran preferiblemente como composiciones orales.

Opcionalmente, en la metodología descrita, el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ no es un polipéptido. "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos de origen no natural.

Una ventaja de los agentes de enmascaramiento de carga de cristalina γ descritos en el presente documento es que

se espera que sean efectivos en presencia de modificaciones postraduccionales de las cristalinas γ, incluyendo, por ejemplo, transamidación, oxidación, conexinas modificadas y disfuncionales, y altas concentraciones de iones inorgánicos y orgánicos tales como Ca^{+2}.

Los agentes enmascaradores de carga de cristalina γ se ponen en contacto con el ojo para inhibir la progresión de las cataratas y/o reducir las cataratas existentes, o para inhibir y/o reducir los síntomas de la presbicia. Como se usa en el presente documento, el término "contacto con el ojo" abarca métodos para aplicar directamente el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ en el ojo. En los métodos anteriormente descritos, los medios adecuados conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para poner en contacto el ojo con el compuesto. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, el compuesto que se inyecta en el ojo, que se deja caer o se pulveriza en el ojo, aplicado en forma de un dispositivo oftálmico, aplicado por iontoforesis, o de lo contrario, aplicado por vía tópica en el ojo.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz de inhibición de cataratas" significa una cantidad que inhibirá la progresión o formación de cataratas en un ojo o inhibirá la progresión o formación de cataratas maduras de desarrollar cataratas ya presentes en el ojo. La cantidad eficaz de inhibición de cataratas del agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ dependerá de varios factores conocidos por los expertos en la técnica. Dichos factores incluyen, pero sin limitación, el tamaño del ojo, el número y la progresión de cualquier catarata completamente desarrollada o en desarrollo ya presente en el ojo y el modo de administración. La cantidad eficaz de inhibición de cataratas también dependerá de si la composición farmacéutica se administrará una sola vez, o si la composición farmacéutica se administrará periódicamente, durante un período de tiempo. El período de tiempo puede ser cualquier número de días, semanas, meses o años. La cantidad eficaz que inhibe las cataratas del agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ, específicamente las moléculas bifuncionales descritas en el presente documento, puede ser de aproximadamente 0,001 g a aproximadamente 0,1 g. Específicamente, la cantidad eficaz de inhibición de cataratas puede ser de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 0,05 g.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz para inhibir la presbicia" significa una cantidad que reducirá un síntoma de presbicia en un ojo o inhibirá la progresión de síntomas adicionales de presbicia en el ojo. La cantidad eficaz de inhibición de la presbicia del agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ dependerá de varios factores conocidos por los expertos en la técnica. Dichos factores incluyen, pero sin limitación, el tamaño del ojo, la cantidad y el tipo de síntomas ya presentes en el individuo y el modo de administración. La cantidad eficaz de inhibición de cataratas también dependerá de si la composición farmacéutica se administrará una sola vez, o si la composición farmacéutica se administrará periódicamente, durante un período de tiempo. El período de tiempo puede ser cualquier número de días, semanas, meses o años. La cantidad eficaz de inhibición de la presbicia del agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ, específicamente las moléculas bifuncionales descritas en el presente documento, puede ser de aproximadamente 0,001 g a aproximadamente 0,1 g. Específicamente, la cantidad eficaz de inhibición de la presbicia puede ser de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 0,05 g.

Como se usa en el presente documento, el término "composición oftálmica" se refiere a una formulación farmacéuticamente aceptable, dispositivo de administración, mecanismo o sistema adecuado para la administración en el ojo. El término "composiciones oftálmicas" incluye, entre otros, soluciones, suspensiones, geles, pomadas, pulverizaciones, dispositivos de depósito o cualquier otro tipo de formulación, dispositivo o mecanismo adecuado para el suministro a corto o largo plazo de los inhibidores de la interacción electrostática de cristalina β_L en el ojo. En contraste con las formulaciones orales, para la tarta de examen, las composiciones oftálmicas exhiben características técnicas específicas asociadas con su aplicación a los ojos, incluyendo el uso de vehículos oftálmicos farmacéuticamente aceptables que evitan la inducción de diversas reacciones tales como, por ejemplo, irritación de la conjuntiva y córnea, cierre de los párpados, secreción de lágrimas y reacciones dolorosas. Las composiciones oftálmicas específicas están ventajosamente en forma de soluciones o suspensiones oftálmicas (es decir, gotas para los ojos), pomadas oftálmicas o geles oftálmicos que contienen inhibidores de la interacción electrostática de la cristalina β_L. Dependiendo de la forma particular seleccionada, las composiciones pueden contener diversos aditivos tales como agentes tamponantes, agentes de isotonicidad, solubilizantes, conservantes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes quelantes, agentes antioxidantes, antibióticos, azúcares y reguladores de pH.

Ejemplos de conservantes incluyen, pero sin limitación, clorobutanol, deshidroacetato de sodio, cloruro de benzalconio, cloruros de piridinio, alcoholes fenetílicos, ésteres del ácido parahidroxibenzoico, cloruro de bencetonio, copolímeros dihalogenados hidrófilos de óxido de etileno y dimetiletilenimina, mezclas de los mismos y similares. Los agentes que aumentan la viscosidad pueden ser seleccionados, por ejemplo, de la metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales. Los solubilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite de ricino polioxietilenado hidrogenado, polietilenglicol, polisorbato 80 y monoestearato de polioxietileno. Agentes quelantes típicos incluyen, pero sin limitación, edetato de sodio, ácido cítrico, sales de ácido dietilentriamina pentaacético, ácido dietilentriamina pentametilenfosfónico y agentes estabilizantes como el edetato de sodio y el hidrógenosulfito de sodio.

Los tampones ejemplares incluyen, pero no se limitan a los tampones borato, tampones fosfato, tampones carbonato, tampones acetato y similares. La concentración de tampón en las composiciones oftálmicas puede variar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM o más, dependiendo del tampón particular elegido.

Como se usa en el presente documento, el término "vehículo" está destinado a incluir un transportador, diluyente o excipiente adecuado para uso oftálmico. "Excipiente" se refiere a un ingrediente que proporciona uno o más de masa, imparte características de procesamiento satisfactorias, ayuda a controlar la velocidad de disolución y, de lo contrario, proporciona características deseables adicionales a las composiciones. En particular, los excipientes se seleccionan de modo que la composición oftálmica no desencadene una secreción de lágrimas que arrastre el principio activo. Dichos elementos se conocen bien por los expertos en la técnica, quienes sabrán cómo seleccionarlos dependiendo de la formulación deseada.

El agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ se puede administrar en forma de un dispositivo oftálmico, tal como una lente de contacto o un tapón lagrimal. Los dispositivos oftalmológicos adecuados incluían dispositivos biocompatibles con calidad correctiva, cosmética o terapéutica.

El agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ puede adherirse, incorporado en o asociado con una lente de contacto, opcionalmente como una composición de liberación controlada. La lente de contacto se puede producir utilizando los materiales conocidos, por ejemplo, hidrogeles, hidrogeles de silicona, elastómeros de silicona y materiales permeables a los gases como el polimetilmetacrilato (PMMA), polímeros de éster de ácido metacrílico, copolímeros de monómeros de oligosiloxanilalquil(met)acrilato/ácido metacrílico y similares. Los ejemplos específicos de los materiales para lentes oftálmicas blandas que contienen agua incluyen los descritos en las Patentes de los EE.UU. n.º 5.817.726, polímeros de metacrilato de 2-hidroxietilo como se describe en la patente de los EE.UU. n.º 5.905.125, los materiales para lentes oftálmicas como se describe en la Solicitud de Patente Europea n.º 781.777, la lente de hidrogel que está recubierta con una capa lipídica previamente como se describe en la Patente de los EE.UU. n.º 5.942.558; todo relacionado con lentes de contacto. Se pueden usar las lentes de contacto de uso general, como lentes de tipo córnea duras o rígidas, y lentes de gel, de hidrogel o de tipo blando que se producen a partir de los materiales conocidos anteriormente.

Es común en la industria de las lentes de contacto caracterizar las lentes de contacto en dos categorías principales; hidrogeles convencionales y de silicona. Los hidrogeles de base convencional comenzaron como poli{metacrilato de hidroxietilo) (poli HEMA) y evolucionaron a copolímeros de poliHEMA con otros restos hidrófilos tales como n-vinil pirrolidona (nVP), acrilamida, dimetil acrilamida y fosforilcolinas metacriladas. También se pueden emplear lentes de alcohol polivinílico.

Los hidrogeles de silicona (SiH) consisten típicamente en copolímeros de monómeros de silicona metacrilados o de met(acrilamida), prepolímeros o macrómeros con monómeros de hidrogel convencionales típicos. Ejemplos de monómeros de silicona incluyen "Tris", polidimetilsiloxano (PDMS) metacrilado, terminado en alquilo, y copolímeros de bloque de silicona y monómeros hidrófilos. Los copolímeros de tribloque ABA son comunes cuando el grupo A es un bloque hidrófilo y el grupo B es el bloque de monómero de silicona. Además de los metacrilatos, otros grupos reactivos incluyen vinilo, acrilamida o cualquier otro grupo reactivo capaz de polimerización por reacción en cadena. La reticulación y la polimerización también se pueden lograr mediante polimerización por crecimiento en etapas utilizando monómeros con bifuncionalidad. Un ejemplo es la reacción de un grupo hidroxilo con un grupo ácido carboxílico en dos aminoácidos o de ácido tereftálico y etilenglicol.

Los métodos de recubrimiento basados en plasma se usan comúnmente en hidrogeles de silicona, incluida la oxidación de plasma y los recubrimientos de plasma.

Puede producirse una composición de agente de enmascaramiento de carga de cristalina γ de liberación sostenida, por ejemplo, incorporando en, asociando o adhiriendo a la lente de contacto la composición del agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ de acuerdo con los métodos conocidos para producir las lentes de contacto con fármacos de liberación sostenida como se describe en las Patentes de los EE.UU. n.º 5.658.592; 6.027.745; W02003/003073; US-2005-0079197, relacionadas con lentes de contacto y de liberación sostenida. Específicamente, la lente de contacto se puede producir al adherir el agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ a una parte de un agente de liberación sostenida en gel o finamente dividido como la polivinilpirrolidona, hialuronato de sodio y similares. Además, la liberación sostenida puede producirse formando un depósito de composición de agente de enmascaramiento de carga cristalina γ tal como produciendo una lente de contacto a partir de un miembro que forma una superficie frontal de la lente y un miembro que forma una superficie trasera de la lente.

El agente de enmascaramiento de carga puede insertarse en el acuoso o vítreo como una inyección con liberación controlada.

El agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ se puede administrar en un tapón lagrimal. Como se usa en el presente documento, el término tapón lagrimal se refiere a un dispositivo de tamaño y forma adecuados para la inserción en el canalículo lagrimal inferior o superior del ojo a través de, respectivamente, el punto lagrimal inferior o superior.

El agente de enmascaramiento de la carga de cristalina γ se puede administrar por iontoforesis. La iontoforesis es una técnica que utiliza una pequeña carga eléctrica para administrar un medicamento u otro producto químico a través de la piel.

La composición oftálmica puede administrarse usando un aumento de ultrasonidos.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos - de la invención reivindicada o de otro modo

Ejemplo 1: Clonación de cristalina γ

Las secuencias de ADN de las cristalinas γD y γS están en los plásmidos pQe1 que fueron proporcionados por King Labs en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (Cambridge, MA). Las secuencias de proteínas cristalinas γ contienen una etiqueta de histidina (etiqueta his) N-terminal 6x para fines de purificación. Los plásmidos se transformaron en una línea celular competente de clonación para crear ADN plasmídico adicional. Los plásmidos se transformaron posteriormente en una línea celular de expresión competente para la síntesis de proteínas (células TAM 1 de *E. coli* (Active Motif. Carlsbad, CA)).

El ADN plasmídico de cristalina γ se transformó químicamente en células M15pRep de *E. coli* para la síntesis de proteínas. Se cultivaron cultivos de 1 l para la purificación de proteínas, La proteína cristalina γ se purificó por cromatografía de afinidad con Ni. La etiqueta His N-terminal contenida en las proteínas cristalinas γ se une preferentemente a la columna de Ni. La proteína unida se puede eluir con un gradiente de imidazol que se une competitivamente al Ni, liberando la proteína purificada. La pureza se confirmó mediante electroforesis en gel SDS PAGE y cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC).

Ejemplo 2: Efecto del pH y la sal sobre las cristalinas γD y γS purificadas

Debido a que el pH y la sal tienen un efecto sobre la agregación de cristalina β, también se estudió el efecto del pH y la sal en la cristalina γ. Los tamaños de partícula se midieron usando dispersión de luz dinámica (DLS).

La dispersión de luz dinámica experimental (DLS) se midió utilizando un instrumento de goniómetro ALV que tenía un correlador ALV-5000/E equipado con 288 canales (ALV, Langen, Alemania) y un láser de argón de 2 W (Coherent Inc., Santa Clara, CA), con una potencia de trabajo de aproximadamente 40 mW. La intensidad de dispersión se midió en ángulos entre 30° y 90° en intervalos de 5°, correspondientes a un intervalo de vector de onda de dispersión (q) entre $8{,}41 \times 10^6$ y $2{,}30 \times 10^7$ m^{-1}. El vector de onda de dispersión se define como $q = 4\pi n \operatorname{sen}(\theta / 2) / \lambda$, donde θ es el ángulo de dispersión, y λ = 514,5, la longitud de onda del láser de argón al vacío, y n es 1,33, el índice de refracción del agua. La temperatura de la muestra se mantuvo a una temperatura constante de 4 a 37 ± 0,1 °C mediante un baño de agua circulante.

La función de correlación se analizó mediante el análisis CONTI N para calcular los tiempos de retardo para las funciones de correlación en los ángulos medidos. Los picos representan el modo difusivo de las proteínas. Los tiempos de retardo (τ) se convirtieron en T y se graficaron versus q^2. La pendiente de la línea ajustada es el coeficiente de difusión (D). Las líneas se ajustan de tal manera que la intersección es cero porque un valor distinto de cero de q = 0 no es físico. Las gráficas de T versus q^2 fueron lineales con valores r^2 de 0,95 o más.

Las mediciones de DLS se realizaron en proteínas cristalinas γD y γS tanto modificadas como no modificadas en NaCl 150 mM, tampón de Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 20 mM pH 6,8 a una concentración de 0,5 mg/ml. Todas las soluciones se filtraron con membranas de PVDF hidrófobas de 0,22 µm (Fisher Scientific) en tubos de vidrio de borosilicato de 10 mm de diámetro y se sellaron. Las soluciones se dejaron equilibrar durante treinta minutos antes de medir la dispersión de la luz.

Se investigaron las soluciones individuales de las proteínas cristalinas α-A, α-B, γD y γ-S para comprender la escala de tamaño y cómo se comportan las proteínas en solución diluida. (Tabla 1) La temperatura tuvo poco efecto sobre el tamaño de la proteína en solución según se midió por DLS.

Tabla 1: Mediciones de DLS realizadas en proteínas cristalinas γD y γ-S modificadas y no modificadas

	αA	αB	γD		γS	
Temp. (°C)	R_h (nm)	R_h (nm)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)	R_{hf} (nm)	R_{hs} (nm)
4°	12	12	3	116	3	100
22°	12	13	2,8	104	2,7	102
37°	13	13	2,7	109	2,6	95

Teniendo en cuenta que el peso molecular de la cristalina αA es de 19,9 kDa y de la cristalina α-B es de 20,16 kDa, el tamaño observado en el experimento DLS es consistente con el ensamblaje conocido de la cristalina α en especies de 300-1200 kDa en solución, así como en el ojo humano.

El R_h de 3 nm para las cristalinas γ representa una especie proteica única que se correlaciona bien con los pesos

moleculares de 20,6 kDa y 20,9 kDa para las cristalinas monoméricas γD y γ-S, respectivamente. Ambas especies muestran también agregados con valores de R_h de 110 y 100 nm para las cristalinas γD y γS, respectivamente. La agregación de cristalina γ se ha atribuido previamente a las interacciones atractivas entre las cristalinas γ. La falta de interacciones proteína-proteína específicas en las cristalinas γ les permite formar grandes agregados en solución.

Las cristalinas γ se sometieron a una variedad de condiciones experimentales, incluyendo un intervalo de pH (5,6,7,8,9,10,11), concentraciones de KCl (100 mM, 150 mM, 300 mM, 500 mM, 1000 mM) y temperatura (4,5 °C, 22 °C, 37 °C). El pH y la concentración de sal se ajustaron mediante diálisis durante la noche a 4 °C y su concentración final se ajustó a 1,0 g/l.

Tabla 2: Efecto del pH y la sal sobre las cristalinas γD y γ-S

	γD		γS	
Variable	Rh_f (nm)	Rh_s (nm)	Rh_f (nm)	Rh_s (nm)
NaCl 100 mM	2,8	108	2,7	104
NaCl 150 mM	2,8	104	2,7	102
NaCl 300 mM	2,6	91	2,9	100
NaCl 400 mM	2,7	-	2,6	-
NaCl 500 mM	2,8	-	2,5	-
NaCl 1000 mM	2,5	-	2,6	-
pH 5	3,9	100	4,8	141
pH 6	2,7	118	2,5	110
pH 8	2,9	102	3,0	96
pH 9	3,5	97	2,9	106
pH 10	3,2	-	3,4	90
pH 11	3,1	-	3,1	-

Como puede verse en la Tabla 2, el pH variable por encima de 10 eliminó los agregados de las soluciones de cristalinas γD y γS. Las concentraciones de sal por encima de 300 mm de KCl redujeron los agregados de cristalina γ a partículas de proteína individuales. Estos resultados indican que los grandes agregados de cristalina γ pueden romperse o prevenirse interfiriendo con las interacciones electrostáticas entre las cristalinas γ.

Se había planteado la hipótesis de que los enlaces disulfuro podrían mediar en los agregados de cristalina γ observados. La DLS de las proteínas cristalinas γ también se midió en DTT 5 mM, y en presencia de 1,0 g/l de cristalina α. Tal como se muestra en la Tabla 3, el DTT no tuvo ningún efecto sobre el tamaño de los agregados de cristalina γ. Por lo tanto, esta hipótesis era incorrecta.

Además, las proteínas cristalinas α sintetizadas se mezclaron con proteínas cristalinas γ para determinar si la capacidad de acompañamiento de la cristalina α interrumpe los agregados de cristalina γ. Las cristalinas α-A y α-B se mezclaron cada una individualmente con cristalina γD o γS en una relación molar de 3:1, respectivamente, imitando la proporción encontrada en la lente del ojo humano. Todas las soluciones se dejaron equilibrar durante una hora a 4 °C. Tras la incubación con cristalina α-A o α-B, el gran agregado de cristalina γ de varios cientos de nanómetros desapareció y se observaron las macromoléculas de cristalina γ y cristalina α individuales. (Tabla 3) Estos datos respaldan el trabajo previo que demuestra que las cristalinas α suprimen la agregación de proteínas no específicas, lo que evita la agregación de las proteínas cristalinas γ.

Tabla 3: Efecto del DTT y las chaperonas sobre las cristalinas γD y γ-S

	γD		γS	
Aditivo	Rh_f (nm)	Rh_s (nm)	Rh_f (nm)	Rh_s (nm)
----	2,8	104	2,7	102
DTT 5 mM	2,6	108	3	102
αA	2,7	16	2,8	18
αB	3,2	17	3	19

Sin estar sujeto a la teoría, se plantea la hipótesis de que el aumento en el tamaño de las cristalinas α (de 63-68 nm a 75 nm) se debe a la interacción de la cristalina α con la cristalina γ desnaturalizada o mal plegada. Es evidente que la adición de cristalina α evita o interrumpe la formación en solución de grandes especies de cristalina γ interrumpiendo las cargas electrostáticas entre las cristalinas γ. Las cristalinas α son capaces de alterar los grandes agregados de cristalina γ que aparecen en altas concentraciones de cristalina γ. Por lo tanto, en ausencia de cristalinaα, la cristalina γ formará grandes agregados solubles a través de fuerzas electrostáticas que pueden interrumpirse a un pH alto y

altas concentraciones de sal.

Materiales y métodos para la caracterización de agregados

La modificación química de las cristalinas γD y γS se realizó para modificar el comportamiento de agregación de estas proteínas. Los métodos utilizados para caracterizar las cristalinas γD y γS modificadas son la ionización mediante desorción por láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo (MALDI-TOF), dicroísmo circular y dispersión de luz dinámica.

Ionización mediante desorción por láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo

Aproximadamente 2 mg de proteína cristalina regular o modificada se dializaron durante la noche en hidrocloruro de tris (hidroximetil) aminometano 5 mM (Tris HCl) pH 7. La solución se liofilizó (se secó por congelación) durante la noche para obtener un polvo de proteína cristalina seco.

Los datos de espectrometría de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Omniflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., Billerica MA) equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. Las muestras (2 mg/ml) se mezclaron (1:1) con una matriz que consistía en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, acetonitrilo al 50 % y ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico. Posteriormente, se depositó 1 µl de solución sobre un objetivo de acero inoxidable. El instrumento se utilizó en modo lineal para la adquisición de datos.

Dicroísmo circular

Las muestras cristalinas se dializaron durante la noche en tampón de Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 10 mM pH 6,8 y se midieron a una concentración de 0,5 mg/ml. Los espectros de CD se midieron en un espectropolarímetro Jasco J715 a 22 °C utilizando una celda de cuarzo de 1 mm de longitud de trayectoria. Después de permitir que la muestra se equilibre durante cinco minutos, los espectros se obtuvieron en el intervalo de 250 a 195 nm.

Dispersión de luz dinámica

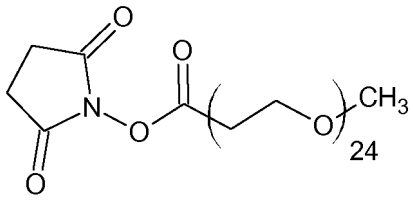
La dispersión de luz dinámica experimental (DLS) se midió utilizando un instrumento de goniómetro ALV que tenía un correlador ALV-5000/E equipado con 288 canales (ALV, Langen, Alemania) y un láser de argón de 2 W (Coherent Inc., Santa Clara, CA), con una potencia de trabajo de aproximadamente 40 mW. La intensidad de dispersión se midió en ángulos entre 30° y 90° en intervalos de 5°, correspondientes a un intervalo de vector de onda de dispersión (q) entre $8{,}41 \times 10^6$ y $2{,}30 \times 10^7$ m^{-1}. El vector de onda de dispersión se define como $q = 4\pi n \operatorname{sen}(\theta / 2) / \lambda$, donde θ es el ángulo de dispersión, y λ = 514,5, la longitud de onda del láser de argón al vacío, y n es 1,33, el índice de refracción del agua. La temperatura de la muestra se mantuvo a una temperatura constante de 4 a 37 ± 0,1 °C mediante un baño de agua circulante.

La función de correlación se analizó mediante el análisis CONTI N para calcular los tiempos de retardo para las funciones de correlación en los ángulos medidos. Los picos representan el modo difusivo de las proteínas. Los tiempos de retardo (τ) se convirtieron en T y se graficaron versus q^2. La pendiente de la línea ajustada es el coeficiente de difusión (D). Las líneas se ajustan de tal manera que la intersección es cero porque un valor distinto de cero de q = 0 no es físico. Las gráficas de T versus q^2 fueron lineales con valores r^2 de 0,95 o más.

Las mediciones de DLS se realizaron en proteínas cristalinas γD y γS tanto modificadas como no modificadas en NaCl 150 mM, tampón de Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 20 mM pH 6,8 a una concentración de 0,5 mg/ml. Todas las soluciones se filtraron con membranas de PVDF hidrófobas de 0,22 µm (Fisher Scientific) en tubos de vidrio de borosilicato de 10 mm de diámetro y se sellaron. Las soluciones se dejaron equilibrar durante treinta minutos antes de medir la dispersión de la luz.

Ejemplo 3 - Modificación química de cristalina γD y γS con PEG24

La primera modificación de la cristalina γ se realizó con NHSPEG24. Los aminoácidos que contienen aminas primarias, lisina y arginina, pueden realizar una sustitución nucleófila en polietilenglicol (PEG) funcionalizado con N-hidroxisuccinimida (NHS). La NHS es un éster activado que acelera el mecanismo de reacción de Sn2 porque es un buen grupo saliente. La sustitución nucleófila produce una proteína modificada con PEG o una proteína cristalina γ PEGilada. Se eligió la PEGilación porque se ha demostrado que la modificación de proteínas con PEG aumenta la solubilidad y no afecta a la estructura o propiedades tridimensionales. En particular, se eligió PEG24 debido a su peso molecular razonable (1100,39) agregado y la longitud del brazo espaciador (8,82 nm).



NHSPEG24

La modificación de la cristalina γ con PEG24 fue exitosa, como lo demuestra el gran aumento en el peso molecular de la cristalina γ observado en MALDI-TOF. La intensidad relativa máxima para la cristalina γD fue de 24,148 m/z o 2 unidades de PEG24, mientras que para la cristalina γS el pico ocurrió a 26,711 m/z que corresponde a 4 unidades de PEG24. (Figura 1) El exceso de reactivo y las condiciones de reacción fueron suficientes, ya que no había una cristalina γ sin modificar presente en la solución. Los datos MALDI-TOF de mayor resolución de cristalina γD muestran dos picos distintos a 23,056 m / z y 25,206 m/z correspondientes a 1 y 3 modificaciones de PEG24.

La espectroscopia de CD demostró que ambas proteínas cristalinas parecen mantener su estado nativo a pesar de la modificación. La cristalina γD mostró mayores picos y profundidades que podrían atribuirse a una ligera diferencia en la concentración de proteínas. Se espera un buen ajuste con los datos experimentales, ya que se ha demostrado previamente que la PEGilación no interfiere con la estructura secundaria de una proteína, (datos no mostrados)

La DLS se realizó en cristalinas γD y γS modificadas con PEG24 a 22 °C y 37 °C. El NICF proporcionó una función de distribución con un conjunto único de picos que tiene una dependencia angular que se puede ver en la gráfica de T versus q^2. (Figuras 2-4) La proteína cristalina γ modificada con PEG24 tenía una pequeña distribución de tamaño sin modo adicional en tiempos de relajación más largos, lo que indicaría la formación de agregados. Para la cristalina γD, la R_h calculada a partir del coeficiente de difusión fue de 3,1 nm a 22 °C y 37 °C, mientras que la cristalina γS tenía un R_h de 3,2 nm a 22 °C y 37 °C. Los valores de R_h se correlacionaron bien con los pesos moleculares de 24,1 kDa y 26,7 kDa de cristalina yD y yS, respectivamente, medidos por MALDI-TOF.

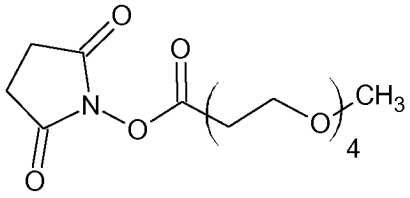
La PEGilación de cristalina γ por NHSPEG24 evitó eficazmente cualquier evento de agregación en soluciones diluidas como es evidente en DLS. El PEG es un polímero hidrófilo y se ha demostrado que aumenta la solubilidad de las proteínas en solución. Sin estar sujeto a la teoría, se cree que si los fenómenos de agregación son el resultado de problemas de solubilidad asociados con interacciones hidrófobas o electrostáticas, entonces, el aumento de la solubilidad asociada con la PEGilación evita que las proteínas cristalinas γ se agreguen.

En la misma línea de pensamiento, sin estar sujeto a la teoría, se cree que la carga superficial total de las proteínas se ha alterado por la reacción con PEG. En el punto isoeléctrico de una proteína, hay una disminución en la solubilidad que resulta de la neutralidad de la carga asociada con el punto isoeléctrico. Los aminoácidos que contienen aminas primarias fueron los sitios objetivo para este tipo de modificación. La amina primaria de la lisina y la arginina puede tener una carga positiva asociada según la composición de la proteína y las condiciones de la solución. Al hacer que el NHSPEG reaccionara en los grupos de lisina y arginina, los sitios potencialmente cargados estaban ocupados por el PEG hidrófilo, cambiando así la carga superficial de la proteína. Si el evento de agregación es el resultado de interacciones electrostáticas o el resultado de la proximidad de las proteínas al punto isoeléctrico, este razonamiento explicaría por qué el agregado está ausente de la solución. La modificación de la proteína cristalina γ con PEG a través de otros mecanismos de reacción se utilizará para examinar esta posibilidad.

Sin estar sujeto a la teoría, una explicación final de la falta de agregados en la solución es un problema de espaciador. En el campo de los coloides esféricos duros, se ha establecido que la adición de moléculas espaciadoras puede reducir la agregación. La adición del resto PEG24 a la cristalina γ proporciona una molécula espaciadora hidrófila en la superficie de la proteína. El espacio entre las proteínas provisto por el PEG podría ser todo lo que se necesita para prevenir la agregación de la proteína cristalina γ.

Ejemplo 4 - Modificación química de cristalinas γD y γS con PEG4

Las proteínas cristalinas γ se modificaron con PEG4 para investigar el efecto de la longitud del brazo espaciador sobre la agregación de proteínas cristalinas γ. La reacción se realizó de nuevo con PEG funcionalizado con NHS (NHSPEG4) para mantener el método de modificación igual. PEG4 tiene un peso molecular agregado de 219,33 g/mol y un brazo espaciador de 1,6 nm, ambos de los cuales son más pequeños que PEG24.



NHSPEG4

Los datos de MALDI-TOF mostraron un aumento en el peso molecular global de cristalina γ que indican una modificación con PEG4. (Figura 5) La intensidad relativa más alta observada para cristalina γD ocurrió a 22,820 m/z, mientras que para la cristalina γS ocurrió a 23,329 m/z que corresponde a 4 y 5 unidades de PEG4, respectivamente, añadiéndose a cualquiera de las proteínas. Cabe señalar que existe una distribución gaussiana alrededor del pico de intensidad relativa, lo que sugiere que hay proteínas que contienen un mayor y menor grado de modificación. Los datos de MALDI-TOF también mostraron que no está presente una proteína cristalina no modificada.

La espectroscopia de CD mostró nuevamente que la PEGilación no afectó significativamente las estructuras secundarias de las proteínas cristalinas γ y α, (datos no mostrados). Se observó una excelente concordancia entre las proteínas cristalinas γ adaptadas con PEG4 y nativas.

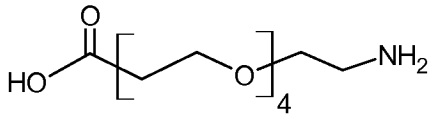
El NICF de la proteína cristalina γ modificada con PEG4 tuvo una desintegración monoexponencial que indica una escala de tamaño único presente en la solución. (Figura 6) Similar a la cristalina γ modificada con PEG24, ningún agregado estaba presente en la solución. La función de distribución (Figura 7) nuevamente mostró un conjunto único de picos que demuestran la dependencia angular lineal en la gráfica de T versus q^2 (Figura 8). El R_h de cristalina γD medido por DLS fue de 2,8 y 2,9 nm a 22 °C y 37 °C, respectivamente. El tamaño de R_h se correlaciona bien con el peso de la proteína modificada de casi 22,8 kDa. También se puede observar un ligero aumento del tamaño de la proteína monomérica en la DLS, ya que el R_h de la proteína cristalina γD modificada es ligeramente mayor que su predecesora no modificada. La proteína cristalina γS modificada con PEG4 tenía un R_h de 2,9 a 22 °C y 37 °C. El tamaño total de la proteína modificada se incrementó en comparación con la cristalina γS no modificada y el R_h es consistente con un peso molecular de aproximadamente 23,3 kDa.

La proteína cristalina γ modificada con NFISPEG4 y NFISPEG24 no mostró agregación a 22 °C y 37 °C. La modificación con PEG4 generalmente dio como resultado cuatro a cinco adiciones de bajo peso molecular, mientras que en el caso de PEG24 se agregaron dos a tres grupos por proteína cristalina γ. El mayor número de modificaciones realizadas por proteína con PEG4 no proporcionó ningún beneficio significativo en la prevención de la agregación. Asimismo, la adición de un mayor peso total con PEG24 a la cristalina γ no proporcionó ninguna ventaja para evitar la agregación.

Las proteínas cristalinas γ modificadas con PEG24 tenían un R_h ligeramente mayor en comparación con la modificación con PEG4. Como ambas modificaciones no dieron como resultado ningún agregado, se concluyó que la longitud del brazo espaciador no contribuye significativamente a la prevención de la agregación. Se predice que las cadenas de PEG más grandes producirían resultados similares.

Ejemplo 5 - Modificación química de cristalinas γD y γS por CAPEG

Se realizó la modificación por CAPEG4 para investigar un mecanismo de reacción alternativo para la PEGilación de la cristalina γ. A pH fisiológico (6,8), la amina primaria de CAPEG4 es ligeramente más positiva y capaz de reaccionar con los aminoácidos cargados negativamente, ácido aspártico y ácido glutámico. Como alternativa, los aminoácidos cargados positivamente todavía son capaces de reaccionar con el ácido carboxílico de CAPEG4 (CA). CAPEG4 se seleccionó por razones similares a NHSPEG4, los que son un pequeño peso molecular agregado por unidad (265,3 g/mol) y un brazo espaciador corto (1,81 nm).



CAPEG4

La MALDI-TOF mostró un aumento considerable en el peso molecular de la cristalina γ que es el resultado de la modificación por CAPEG4. (Figura 9) No hubo cristalina γ sin modificar en ninguna de las soluciones, lo que sugiere que las condiciones de reacción fueron suficientes para la modificación de la proteína. El pico de intensidad relativa a 23,273 m/z para la cristalina γD representa 5 unidades de CAPEG que se han agregado a la proteína. Un espectro MALDI-TOF de mayor resolución para la cristalina γS mostró varios picos de masa distintos para incluir 22,867 m/z o

2 unidades de CAPEG4, una intensidad relativa máxima de 23,089 m/z o 3 unidades de CAPEG4, y 23,591 m/z o 5 unidades de CAPEG4.

La espectroscopia de CD de la modificación de CAPEG4 de la cristalina γ mostró una tendencia similar a las modificaciones realizadas con PEG4 y PEG24. (Datos no mostrados) cristalina γS + CAPEG4 mostraron una excelente correlación con la proteína cristalina γS no modificada. La cristalina γD modificada nuevamente mostró una ligera variación a 220 nm, pero en general la curva es de una forma similar a la cristalina γD nativa.

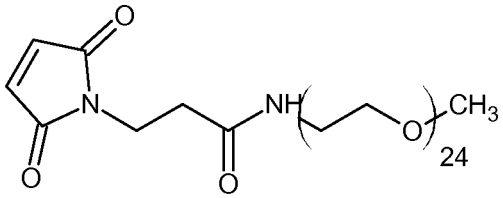
La modificación de la cristalina γ con CAPEG también evitó la agregación de proteínas. El NICF se puede describir mediante una función monoexponencial que produce una función de distribución que tiene una dependencia lineal de T vs q^2. (Figura 10-12) La proteína cristalina γ modificada se observó en su forma monomérica tanto a 22 °C como a 37 °C, donde el R_h era independiente de la temperatura. Para la cristalina γD, el coeficiente de difusión proporcionó un R_h calculado de 2,8 nm, mientras que para la cristalina γS este valor fue de 2,9 m. Los valores de R_h se correlacionan bien con los pesos moleculares modificados de 23 kDa y 23,5 kDa de las cristalinas γD y γS, respectivamente, además de ser de tamaño similar a la cristalina γ modificada con PEG4.

La PEGilación con CAPEG a pH fisiológico (6,8) se dirigió a aminoácidos ácidos. De manera similar a las reacciones hechas con NHSPEG, la modificación de CAPEG debería alterar la carga superficial total de la proteína. Mediante la reacción con aminoácidos cargados negativamente, la cadena de PEG hidrófila ocupa el aminoácido potencialmente cargado. Al tener un tamaño y número de modificaciones similares (cuatro a cinco) como NHSPEG4, la cristalina γ adaptada con CAPEG4 ofrece una modificación muy similar. Una ventaja potencial de usar CAPEG4 sobre NHSPEG es que no hay un grupo saliente de NHS en la reacción.

Sin estar sujeto a la teoría, la modificación de CAPEG nuevamente sugiere que la carga superficial de la proteína es un factor clave para la formación de agregados de cristalina γ. A medida que se agrega un resto de PEG a la proteína, también es posible que se altere la naturaleza hidrófoba de la superficie, evitando la agregación. La información crucial obtenida de este experimento es que la modificación a través de aminoácidos ácidos o básicos puede prevenir la agregación.

Ejemplo 6 - Modificación química de las cristalinas γD y γS con MMPEG

El PEG funcionalizado con maleimida es otro mecanismo de reacción por el cual las proteínas cristalinas γ pueden PEGilarse. Los grupos tiol son capaces de la adición de Michael sobre el doble enlace del grupo funcional maleimida. Ambas proteínas cristalinas γ contienen múltiples restos de aminoácidos de cisteína que contienen un grupo terminal tiol. Por lo tanto, la PEGilación de la cristalina γ con MMPEG24 (MM) ocurre por los aminoácidos de cisteína. La modificación a través de este mecanismo de reacción es exclusiva de los experimentos de PEGilación anteriores, ya que la carga total de proteínas no debería verse afectada. En particular, se eligió MMPEG24 porque el alto peso molecular agregado por unidad (1239,44 g/mol) y el brazo espaciador largo (9,53 nm) serán comparables con PEG24.



MMPEG24

Los espectros de MALDI-TOF de la cristalina γ modificada con MMPEG24 mostraron tres picos distintos que pueden observarse con una cristalina γ mínima a no modificada. (datos no mostrados). Se observaron cuatro picos de cristalina γ en 23187, 24426, 25666 m/z correspondientes a 1, 2 y 3 modificaciones. En el caso de la cristalina γS, se observaron picos a 23565,24426, y 25666 m/z correspondientes a 1, 2 y 3 modificaciones. La intensidad relativa más alta para ambas proteínas cristalinas se produjo en 2 modificaciones.

Nuevamente se observa una excelente concordancia entre las proteínas cristalinas γ PEGiladas y nativas. Se sabe que en algunos casos, los grupos tiol de la cisteína están implicados en el enlace disulfuro intramolecular que proporciona integridad estructural que proporciona la estructura secundaria. Dado que ambos espectros de cristalinas γD y γS modificadas con MM muestran una estructura secundaria similar al estado de la cristalina γ nativa, se concluyó que la modificación no alteraba la estructura de las proteínas, (datos no mostrados)

La PEGilación de la cristalina γ a través de sus restos de cisteína no impidió la agregación. Las curvas NICF (datos no mostrados) tienen una dependencia angular que dio lugar a que la función de distribución tenga dos conjuntos distintos de picos (Figura 13). La gráfica T versus q^2 mostró dos pendientes con una dependencia angular lineal que indica la presencia de un coeficiente de difusión lento y rápido, (datos no mostrados) a 37 °C, el modo lento dio como resultado un R_h de 80 nm para cristalina γD y 85 nm para cristalina γS. El gran tamaño indicó que la proteína se estaba

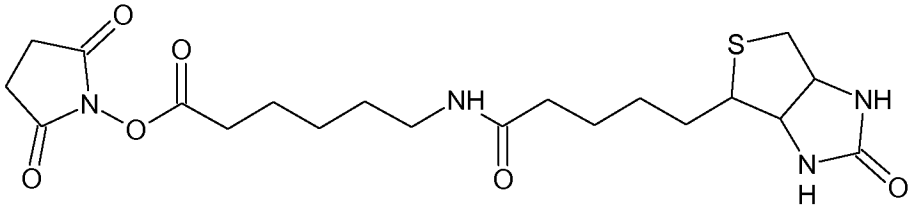
agregando en solución. El modo rápido correspondió a la proteína cristalina γ monomérica, con un R_h de 2,8 nm y 3,0 nm para cristalina γD y γS a 37 °C.

El hecho de que la PEGilación a través de la funcionalidad maleimida no impida la agregación proporciona información crítica con respecto a la formación de agregados de cristalina γ. Debido a que MMPPEG24 y NFISPEG24 dan como resultado un número similar de modificaciones, la cobertura de la superficie y los grupos espaciadores alrededor de las proteínas cristalinas γ también deben ser similares. El agregado observado con la modificación de MMPEG24 demuestra que la prevención de la agregación no puede depender completamente de las moléculas espaciadoras hidrófilas.

Se obtiene una idea clave del mecanismo de agregación al darse cuenta de que PEGilar la proteína a través de aminoácidos no cargados no evita la agregación. La diferencia clave entre MMPEG y NFISPEG o CAPEG es que la PEGilación a través de la reacción de maleimida no se dirige a los aminoácidos cargados de la proteína. Sin estar sujeto a la teoría, esto sugiere que la carga superficial y la electrostática desempeñan un papel importante en la formación de agregados y deben ser objetivos cuando se interrumpe la agregación.

Ejemplo 7- Modificación química de cristalinas γD y γS con BIOTINA

La biotina es una molécula comúnmente utilizada para la modificación de proteínas debido a su alta afinidad de unión a la avidina. Las proteínas se pueden etiquetar con biotina, sufrir reacciones *in vivo o in vitro,* después, se separan o purifican del volumen con una columna de avidina. La molécula NHSBiotin fue elegida porque reacciona a través del mismo mecanismo que PEG4 y PEG24, sin embargo, la molécula añadida ya no será hidrófila, sino que contendrá un grupo final altamente cargado. El peso molecular agregado por unidad es de 226,38 g/mol con un brazo espaciador de 1,38 nm.



NHSBiotin

Las proteínas cristalinas γ se modificaron con éxito con biotina como se muestra en la MALDI-TOF. (datos no mostrados). La modificación del pico de cristalina γD fue de ocho unidades (23758 m/z), mientras que la aparición del pico de cristalina γS fue de cuatro unidades (23325 m/z). Ambos sistemas no muestran una cristalina no modificada, lo que indica que las condiciones de reacción fueron suficientes para una modificación completa.

Los espectros de CD mostraron un cambio considerable ascendente en comparación con la estructura nativa de la proteína, (datos no mostrados). Se observó un pozo poco profundo alrededor de 220 nm que va en contra de la tendencia de buena correlación entre la modificación y la estructura secundaria. El cambio en los espectros podría ser una indicación de que la estructura secundaria de las proteínas ha sido perturbada por la modificación. A pesar del cambio en los espectros, la forma general de la curva es similar y no hubo indicios de una hélice desordenada o aleatoria.

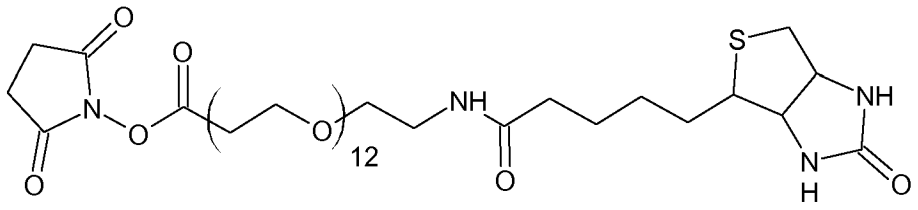
La agregación de la proteína cristalina γ se observó para la cristalina γ modificada con biotina. El NICF mostró un modo lento y uno rápido que dio como resultado que la función de distribución tuviera dos conjuntos de picos (Figura 14). La dependencia angular de la función de distribución se puede ver en la gráfica T versus q^2, donde se observó una diferencia cualitativa entre los modos lento y rápido. A 22 °C, el R_h de los modos rápido y lento fue 2,8 nm y 150 nm para cristalina γD, mientras que para la cristalina γS estos valores fueron 2,6 nm y 180 nm. A modo lento y rápido también se observó a 37 °C con los valores R_h siendo similares a los de 22 °C.

La agregación de cristalina γ modificada con NHSBiotin muestra que la funcionalidad de la molécula modificadora (es decir, la cerda molecular) es importante. Mecánicamente, la biotina modificó la cristalina γ en la misma forma que NFISPEG. Por lo tanto, solo la modificación de los aminoácidos cargados de cristalina γ no es suficiente para prevenir la agregación. Un grado comparable de modificación ocurrió con biotina y PEG4, lo que significa un cambio similar del punto isoeléctrico de la proteína. Debido a la agregación que ocurre en el caso de la cristalina γ modificada con biotina, no es suficiente cambiar puramente el punto isoeléctrico de la proteína cristalina γ para prevenir la agregación. Las mediciones de DLS del sistema biotinilado también respaldan la idea de que la agregación no se puede prevenir simplemente agregando moléculas espaciadoras a la superficie de la cristalina γ.

El fuerte contraste en las propiedades químicas entre el PEG y la biotina es la razón por la cual uno evita la agregación y la otra no. PEG es una molécula hidrófila flexible, mientras que la funcionalidad de la biotina es capaz de formar enlaces de hidrógeno y estabilizar una carga negativa. Por lo tanto, las propiedades del PEG ayudan a la solubilidad de las proteínas, mientras que la biotina contribuiría a la naturaleza hidrófoba y electrostática de los agregados.

Ejemplo 8 - Modificación química de las cristalinas γD y γS con BIOTINA-PEG

La modificación de las proteínas cristalinas γ con biotina dio como resultado la agregación, por lo que se propuso utilizar NFISBiotinPEG, que incorpora un espaciador hidrófilo entre la funcionalidad de la proteína y la biotina. Se propuso que la naturaleza hidrófila del PEG sería el factor clave en la prevención de la agregación de cristalina γ. La funcionalización de NFIS se utiliza para mantener constante el mecanismo de reacción. El peso molecular agregado por unidad fue de 825,64 g/mol y el brazo espaciador fue de 5,6 nm.



NHSBiotinPEG12

Se observó un cambio apreciable en el peso molecular en MALDI-TOF que indica la modificación de las proteínas cristalinas γ con BiotinPEG12. (datos no mostrados). La cristalina γD tenía tres picos distintos observables a 22760, 23582 y 24404 m/z correspondientes a una, dos y tres modificaciones. La resolución de cristalina γS proporcionó picos de MALDI-TOF a 23001, 23816, 24669, 25470 y 26122 m/z correspondientes a las modificaciones una a cinco. Los espectros MALDI-TOF tampoco mostraron una cristalina γ modificada que demostrara condiciones de reacción suficientes.

La estructura secundaria de la proteína cristalina γ modificada estaba en buena concordancia con la de la cristalina γ nativa como se ve en los espectros de CD, (datos no mostrados). El pozo observado con espectros de CD para la cristalina γ modificada solo con biotina ya no era evidente. La parte de PEG de la modificación probablemente permitió una mayor solubilidad además de proporcionar un espaciador entre la funcionalidad de la proteína y la biotina.

A pesar de la incorporación de PEG en la funcionalidad de la biotina, aún había agregado presente en la solución, como se puede ver en el modo lento y rápido del NICF. (datos no mostrados). La función de distribución (Figura 15) contenía dos conjuntos de picos que demuestran una dependencia angular. La gráfica T versus q^2 mostró claramente dos ajustes lineales distintos, cuya pendiente proporciona un modo difusivo lento y rápido, (datos no mostrados). El coeficiente de difusión rápido corresponde a la cristalina γ monomérica donde la cristalina γD tenía un R_h de 2,7 nm a 22 °C, mientras que la cristalina γS tenía un valor de 2,6 nm. El coeficiente de difusión lenta representaba el gran agregado presente en solución con un R_h de 105 nm para la cristalina γD y 115 nm para la cristalina γS a 22 °C. También se observó un agregado de un R_h similar a 37 ºC.

El uso de PEG como espaciador entre la funcionalidad de la proteína y la biotina no ayudó a prevenir la agregación. Sin estar sujeto a la teoría y con referencia a la discusión anterior sobre el cambio de biotina en el punto isoeléctrico de la cristalina γ, estos resultados experimentales también sugieren que los hidrófobos dominan sobre la electrostática en la formación de agregados. El brazo espaciador largo de BiotinPEG tampoco impidió la agregación, lo que dio un apoyo adicional a la tendencia de que la longitud de la molécula espaciadora no sea un factor crucial en la interrupción de la agregación. Cabe señalar que la cristalina γ adaptada con BiotinPEG tiene un modo lento o un R_h agregado que fue más pequeño que la modificación con biotina, lo que sugiere que el PEG ayuda a frenar la agregación.

Ejemplo 9 - Modificación química de cristalinas γD y γS con acetato de sulfo-N-hidroxisuccinimida (SA)

Debido a modificaciones previas con grandes pesos moleculares y brazos espaciadores que todavía conducen a la agregación, se estudió una modificación mínimamente invasiva. La modificación final se realizó con acetato de sulfo-N-hidroxisuccinimida, que incorporó un peso molecular mínimo (43 g/mol) y un brazo espaciador (molécula de acetato) por unidad agregada. El mecanismo de reacción es similar al de PEG4, por lo que al reaccionar a través de los grupos de aminoácidos cargados, el punto isoeléctrico de la cristalina γ debería verse afectado.

Se observó un cambio sutil en el peso de las proteínas cristalinas γ en MALDI-TOF. (datos no mostrados). La intensidad relativa máxima para la cristalina γD ocurrió a 22209 m/z y para la cristalina γS a 22562 m/z correspondiente a seis y siete grupos acetato, respectivamente. Los picos no mostraron proteína sin modificar, indicando condiciones de reacción suficientes. Una distribución gaussiana alrededor del pico de intensidad relativo indicó que algunas proteínas cristalinas tienen un grado de modificación mayor y menor.

Un espectro de CD para ambas proteínas cristalinas γ modificadas demostró un pozo más pequeño, alrededor de 220 nm, en comparación con la cristalina γ nativa. (datos no mostrados). El cambio en los espectros de CD también se observó con la modificación con biotina. Hay razones para creer que la estructura secundaria podría verse ligeramente afectada por la modificación, aunque no hay indicaciones de un estado aleatorio o desordenado.

Al observar el NICF es evidente que la modificación de la cristalina γ con grupos acetato no impidió la agregación, (datos no mostrados). La función de distribución se muestra en la Figura 16. La dependencia angular de los modos de difusión lenta y rápida se puede ver en la gráfica T versus q^2, (datos no mostrados) para la cristalina γD a 37 °C, los coeficientes de difusión rápida y lenta corresponden a un R_h de 2,6 nm y 85 nm. Los valores de R_h para la cristalina γS a 37 ºC fueron de 2,5 nm y 90 nm. El R_h de modo rápido es un tamaño apropiado para las proteínas cristalinas γ modificadas cuyo peso molecular es de aproximadamente 22 kDa. Los valores de R_H obtenidos a partir de mediciones realizadas a temperatura ambiente mostraron resultados similares.

La modificación de SA se realizó en un intento de cambiar el punto isoeléctrico de la proteína con un brazo espaciador mínimo. A pesar de que un agregado está presente en la solución, el tamaño del agregado fue menor en comparación con la cristalina γ no modificada. A través de un gran número de modificaciones por proteína, es posible que un cambio sustancial en el punto isoeléctrico redujera el tamaño del agregado. Sin estar sujeto a la teoría, como la agregación aún está presente en la solución, se concluyó que la proximidad de la proteína cristalina γ al punto isoeléctrico no es la única responsable de los fenómenos de agregación.

Los resultados de los Ejemplos 3-9 se resumen en la siguiente tabla:

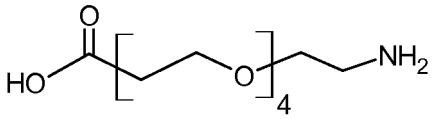
Tabla 4: Resumen de resultados con agentes de enmascaramiento de carga bifuncional

	γS		γD	
	R_h (nm)	R_h (nm)	R_h (nm)	R_h (nm)
PEG4 22 °C	2,9		2,8	
PEG4 37 °C	2,9		2,9	
PEG24 22 °C	3,2		3,1	
PEG24 37 °C	3,2		3,1	
CAPEG4 22 °C	2,8		2,9	
CAPEG4 37 °C	3		2,8	
MMPEG24 22 °C	3,1	100	2,9	85
MMPEG24 37 °C	3	85	2,8	80
Biotina 22 °C	2,6	180	2,8	150
Biotina 37 °C	2,8	210	2,7	170
BiotinPEG 22 ªC	2,6	115	2,7	105
BiotinPEG 37 °C	2,8	110	2,6	100
SA 22 °C	2,5	92,5	2,5	82,5
SA 37 °C	2,5	90	2,6	85

Los resultados mostrados en este caso muestran que la electrostática es un componente importante de la agregación de cristalina γ. La agregación electrostática se puede interrumpir de manera eficaz utilizando altas concentraciones de sal o agentes de enmascaramiento de carga bifuncionales. Una mayor comprensión del mecanismo de agregación de cristalina γ ha proporcionado una nueva clase de agentes que son particularmente útiles en el tratamiento de cataratas y presbicia.

Métodos: Recogida y caracterización de lentes de cadáveres humanos

Dentro de unas 24 horas desde la muerte, el globo ocular se recoge, se rebana y se retira el vítreo. La lente se corta y se coloca en un medio de incubación llamado Optisol®. Optisol® es un medio de almacenamiento corneal que contiene sulfato de condroitina, dextrano 40, polvo de base de optisol, bicarbonato de sodio, gentamicina, aminoácidos, piruvato de sodio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol y agua purificada. OD es el ojo derecho y OS es el ojo izquierdo.



CAPEG4

Las opacidades de las lentes se clasifican de acuerdo con el sistema LOCS III. Las mediciones de LOCS III se toman con un microscopio con lámpara de hendidura. El LOCS III contiene un conjunto ampliado de estándares seleccionados del Estudio longitudinal de la biblioteca de diapositivas de cataratas en el Centro de Investigación Clínica sobre las Cataratas, Boston, Mass. Incluye seis imágenes de lámpara de hendidura para clasificar el color nuclear (NC) y la opalescencia nuclear (NO), Cinco imágenes de retroiluminación para clasificar la catarata cortical (C) y cinco imágenes de retroiluminación para clasificar la catarata subcapsular (P) posterior. La gravedad de la catarata se clasifica en una escala decimal, con los estándares que tienen intervalos regularmente espaciados en la escala.

Ejemplo 10: Ensayo de CAPEG4 en lentes de cadáveres humanos - transporte a través del epitelio

Se estudió el transporte de CAPEG4 a través de una construcción de epitelio. El epitelio es la capa externa de la córnea y el transporte a través del epitelio ha demostrado ser un desafío. El objetivo era demostrar que la construcción CAPEG4 podría usarse en una formulación de gotas para el ojo para el transporte a través de la parte frontal del ojo.

Específicamente, la construcción CAPEG4 en solución se agregó a la parte superior de un aparato que contiene medio de cultivo y una construcción de epitelio. (Figura 19). La construcción de epitelio consiste en una(s) capa(s) de células epiteliales corneales humanas. Se tomaron partes alícuotas en la parte superior y en la parte inferior del medio de cultivo de 15 a 120 minutos. La Figura 20 muestra el CAPEG4 que se transportó al fondo de la célula.

La Figura 21 muestra el pH de Opisol® versus los mg/ml de CAPEG4 agregado. Los datos también se presentan en las tablas 5 y 6. En general, se demuestra que la reducción de las cataratas subcapsulares corticales y posteriores se debe a la CAPEG4 y no al efecto del pH del medio. Debido a que en este caso no hubo reducción de las cataratas de la partícula simplemente cambiando (disminuyendo) el pH del medio Optisol® con ácido cítrico. El mismo pH de Optisol® que contiene la amina de CaPEG. La reducción de la opacidad requirió la presencia del agente activo.

Tabla 5: 1 mg/ml de CAPEG4

Tiempo	Superior		Inferior		
Min	mcg/pozo	Promedio	mcg/pozo	Promedio	% (reserva)
15	427 472	449	4 22	13	2,4
30	448 445	446	26 37	31	5,8
60	454 388	421	8 11	9	1,7
45	459 428	443	9 8	8	1,5
90	467 459	463	17 45	31	5,7
120	453 510	481	21 30	25	4,7
1000 mcg/ml	543	543			
Tiempo 0 recogida:	446 453	450	4 3	3	0,6

Tabla 5: 16 mg/ml

CAPEG4					
Tiempo	Superior		Inferior		
Min	mcg/pozo	Promedio	mcg/pozo	Promedio	% (reserva)
15	5842 6908	6375	58 62	60	0,7
30	6099 6526	6312	93 105	99	1,2
60	6450 7494	6972	160 139	149	1,8
45	6313 6356	6335	677 418	548	6,7

(continuación)

CAPEG4					
Tiempo	Superior		Inferior		
Min	mcg/pozo	Promedio	mcg/pozo	Promedio	% (reserva)
90	6122 6792	6457	525 na	525	6,4
16000 mcg/ml	8186	8186			
Espacio en blanco a los 15 min.	7857	7857	1837	1837	23

Ejemplo 11: Ensayo de CAPEG4 con lentes de cadáveres humanos: reducción de cataratas en lentes de cadáveres humanos

En todos los casos, el control es medio Optisol®. Los puntos de datos restantes son para lentes de cadáveres humanos aislados tratados con soluciones de CAPEG4 con Optisol®.

La Tabla 6 muestra los resultados para lentes incubadas con medio de control o 10 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo. En la tabla 6, bajo el encabezado cortical, hay un grado de LOCS III de 1,0, 1,0 y 0,9 para una lente incubada con 10 mg/ml de CAPEG4. Los grados LOCS para el control son 1,0, 1,2 y 0,9. A 10 mg/ml no hubo cambios significativos en las muestras experimentales versus las de control.

Tabla 6- Clasificación de LOCS III de cataratas incubadas con Optisol® o 10 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
10 (OD)	0	1,0	5,0	5,0	0,9
Control (OS) Solo Optisol	0	1,2	5,0	5,0	0,9
10	24	1,0	5,0	5,0	0,9
Control Solo Optisol	24	1,2	5,0	5,0	0,9
10	72	0,9	5,0	5,0	0,9
Control	72	0,9	5,0	5,0	1,0

La Tabla 7 muestra los resultados para lentes incubadas con medio de control o 50 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo. En la tabla 7, bajo el encabezado cortical, hay un grado de LOCS III de 1,0 para todas las muestras y un grado de opalescencia nuclear (NO) de 2,0 para todas las muestras. No hubo diferencias significativas entre los controles y 50 mg/ml de incubación hasta 72 horas para las cataratas corticales o para el NO. El color nuclear (NO) aumentó ligeramente con el tiempo tanto para el control como para la incubación en la solución de 50 mg/ml de CAPEG4. Hubo una ligera mejoría en la catarata subcapsular posterior de 1,1 a 0,9 a las 0 y 24 horas, respectivamente.

Tabla 7- Clasificación de LOCS III de cataratas incubadas con Optisol® o 50 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
50 (OD)	0	1,0	2,0	1,7	1,1
Control (OS) Solo Optisol	0	1,0	2,0	1,8	0,9
50	24	1,0	2,0	1,7	0,9
Control Solo Optisol	24	1,0	2,0	1,8	0,9
50	72	1,0	2,0	1,9	0,9
Control	72	1,0	2,0	2,0	0,9

La Tabla 8 muestra los resultados para lentes incubadas con medio de control o 100 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo. Hay una disminución en la opalescencia (NO de 1,8 a 1,2) a las 0 y 24 horas, respectivamente, para la incubación de CAPEG4 y mejoras menores en el color cortical y nuclear hasta 72 horas.

Tabla 8- Clasificación de LOCS III de cataratas incubadas con Optisol® o 100 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
100 (OD)	0	3,0	1,8	1,3	0,9

(continuación)

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
Control (OS) Solo Optisol	0	0,9	1,9	1,5	0,9
100	24	2,9	1,2	1,1	0,9
Control Solo Optisol	24	0,9	1,8	2,0	0,9
100	72	2,7	1,2	1,1	0,9
Control	72	0,9	1,9	2,0	0,9

La Tabla 9 es una repetición del experimento en la Tabla 8 con diferentes ojos. Bajo PS (cataratas subcapsulares posteriores) la muestra incubada a 100 mg/ml de CAPEG4 tenía valores de 1,8, 1,5 y 1,0 a las 0, 24 y 72 horas, respectivamente. También hubo una reducción en las cataratas corticales de 3,0 a 2,6 a 2,0 a las 0, 24 y 72 horas, respectivamente.

Tabla 9- Clasificación de LOCS III de cataratas incubadas con Optisol® o 100 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
100 (OD)	0	3,0	3,0	3,0	1,8
Control (OS) Solo Optisol	0	1,0	3,0	3,0	1,5
100	24	2,6	3,0	3,0	1,5
Control Solo Optisol	24	1,0	3,0	3,0	1,5
100	72	2,0	3,0	3,2	1,0
Control	72	1,0	3,0	3,1	1,5

La Tabla 10 muestra los resultados para lentes incubadas con medio de control o 200 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo. Las cataratas corticales se redujeron de 2,5 a 2,2 a 2,0 a las 0, 24 y 72 horas, respectivamente. El control también muestra una ligera reducción en las cataratas corticales de 3,3 a 3,0 a las 24 y 72 horas, respectivamente.

Tabla 10- Clasificación de LOCS III de cataratas incubadas con Optisol® o 200 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
200 (OD)	0	2,5	2,4	2,4	0
Control (OS) Solo Optisol	0	3,3	2,5	2,5	0
200	24	2,2	2,4	2,4	0
Control Solo Optisol	24	3,3	2,5	2,5	0
200	72	2,0	2,4	2,4	0
Control	72	3,0	2,5	2,5	0

La Tabla 11 muestra los resultados para lentes incubadas con medio de control o 200 mg/ml de CAPEG4 versus el tiempo. La única disminución en la catarata se observó en las cataratas corticales para la solución de CAPEG4 que va de 1,3 a 1,0 a 0,9 a las 0, 24 y 72 horas, respectivamente.

Tabla 11 - Clasificación de LOCS III de las cataratas incubadas con Optisol® o 200 mg/ml de CAPEG4 (en Optisol®) versus el tiempo

[CaPEG] (mg/ml)	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
200 (OD)	0	1,3	3,2	2,8	0,9
Control (OS) Solo Optisol	0	1,4	3,2	3,0	0,9
200	24	1,0	3,2	2,8	0,9
Control Solo Optisol	24	1,4	3,2	3,0	0,9
200	72	0,9	3,2	2,8	0,9
Control	72	1,4	3,2	3,0	0,9

La Tabla 12 muestra los resultados de cambiar el pH de Optisol® sin CAPEG4 agregado. El pH se redujo mediante la adición de ácido cítrico. No hubo ningún efecto de cambiar el pH del Optisol® en las cataratas.

Tabla 12: Efecto del pH de Optisol® sobre las cataratas

pH	Tiempo (h)	Cortical	NO	NC	PS
6,470 (OD)	0	2,0	5,0	5,2	0,9
6,085 (OD)	0	2,7	2,3	2,0	0,9
6,470	24	2,0	5,0	5,2	0,9
6,075	24	2,7	2,3	2,0	0,9
6,470	72	2,0	5,0	5,2	0,9
6,075	72	2,7	2,3	2,0	0,9

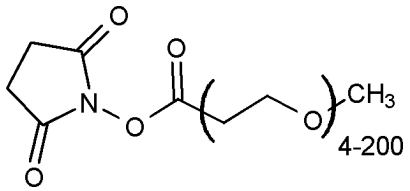
Para estudios de lentes de cadáveres, el punto de partida diferente para el grado de LOCSIII se debe a la condición de inicio variable en los pacientes. A medida que aumentaba la concentración de las soluciones de CAPEG4 en Optisol, se observó una ondulación de la cápsula de la lente y subjetivamente exhibió cierta pérdida de volumen de la lente.

Los términos "un" y "una" no indican una limitación de cantidad, sino que denota la presencia de al menos uno de los elementos referenciados. El término "o" significa "y/o". Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, significan "que incluye, aunque sin limitación"). Todos los intervalos descritos en el presente documento son inclusivos y combinables.

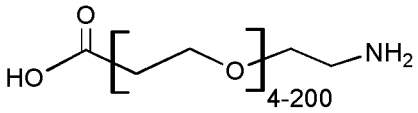
Las realizaciones se describen en el presente documento, incluyendo los mejores modos conocidos por los inventores. Las variaciones de dichas realizaciones se harán evidentes para los expertos en la materia con la lectura de la descripción anterior. Se espera que el experto en la materia emplee dichas variaciones según sea apropiado, y se espera que los métodos descritos se pongan en práctica de manera diferente a la descrita específicamente en el presente documento. En consecuencia, todas las modificaciones y equivalentes de la materia enunciada en las reivindicaciones adjuntas se incluyen en la medida permitida por la ley aplicable. Por otra parte, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos se incluye a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición oftálmica para el uso en un método para inhibir o revertir la progresión de la formación de cataratas, presbicia o degeneración relacionada con la edad de una lente cristalina en un ojo, comprendiendo dicho método poner en contacto el ojo con una cantidad eficaz de dicha composición, comprendiendo dicha composición



o



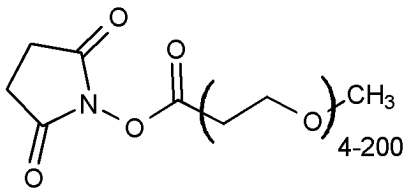
.

2. Una composición oftálmica para su uso según la reivindicación 1, en donde la composición oftálmica es una gota ocular o comprendida dentro de un dispositivo oftálmico.

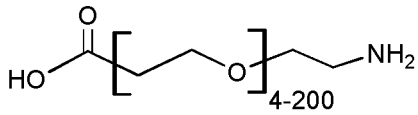
3. Una composición oftálmica para su uso según la reivindicación 2, en la que el dispositivo oftálmico es una lente de contacto o un tapón lagrimal.

4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde en dicho método la composición oftálmica se administra por inyección, iontoforesis o mejora por ultrasonidos.

5. Una composición oftálmica que comprende una molécula bifuncional, en donde la molécula bifuncional es



o



.

6. La composición oftálmica de la reivindicación 5, en donde la composición oftálmica es una gota ocular o comprendida dentro de un dispositivo oftálmico.

7. La composición oftálmica de la reivindicación 6, en la que el dispositivo oftálmico es una lente de contacto o un tapón lagrimal.

Figura 1

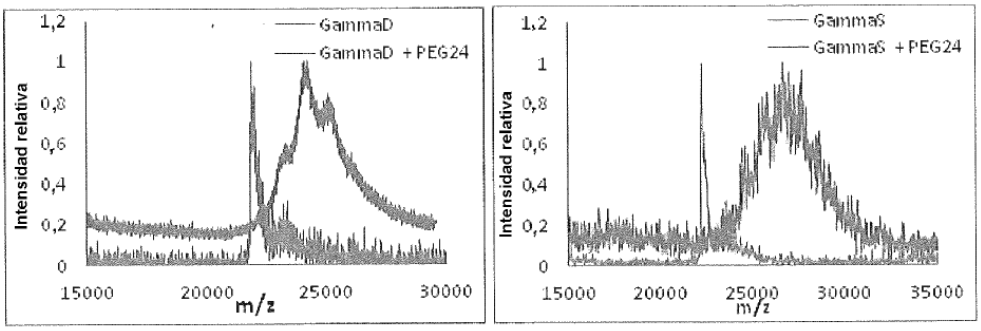


Figura 2

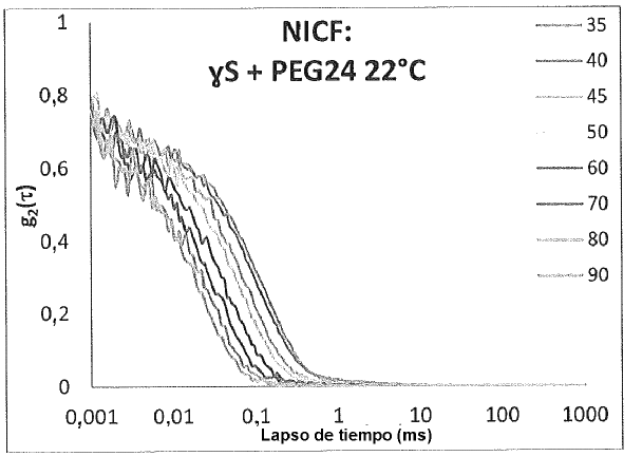


Figura 3

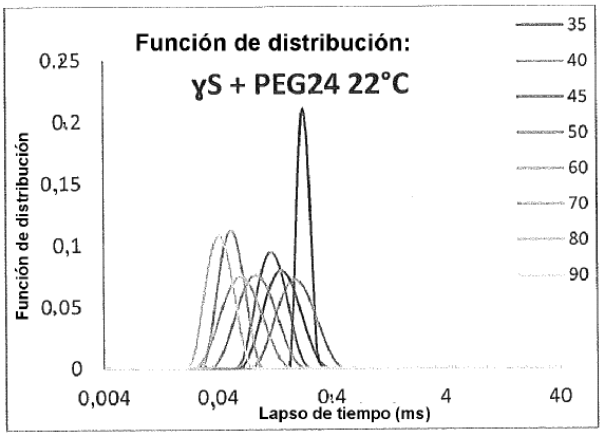


Figura 4

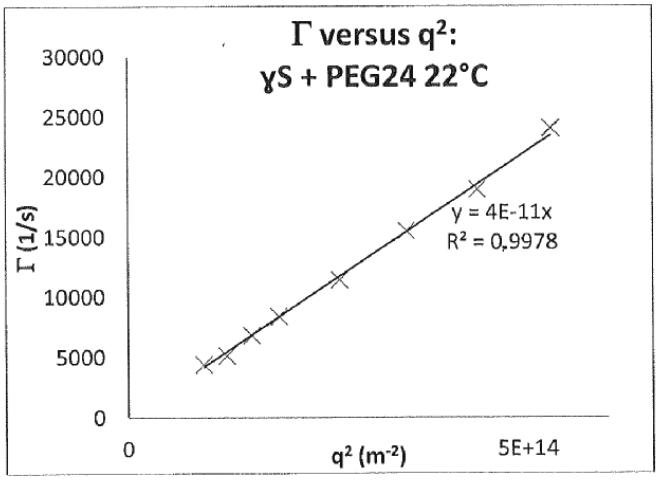


Figura 5

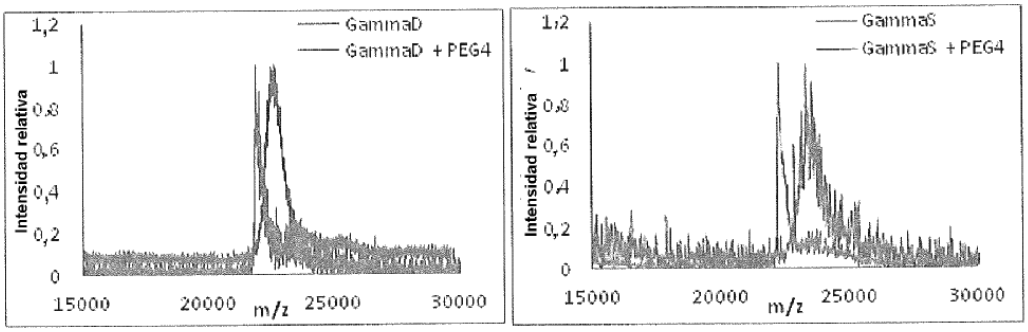


Figura 6

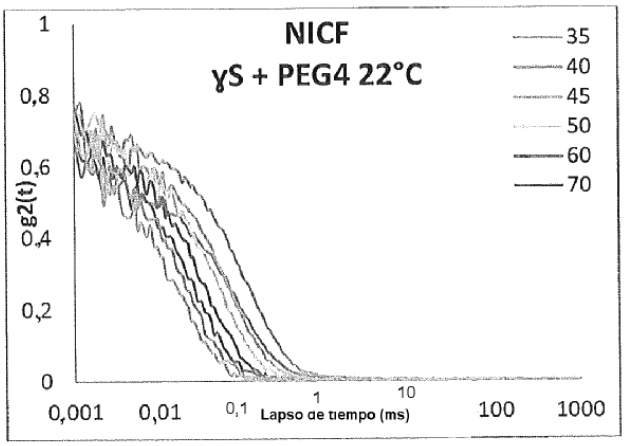


Figura 7

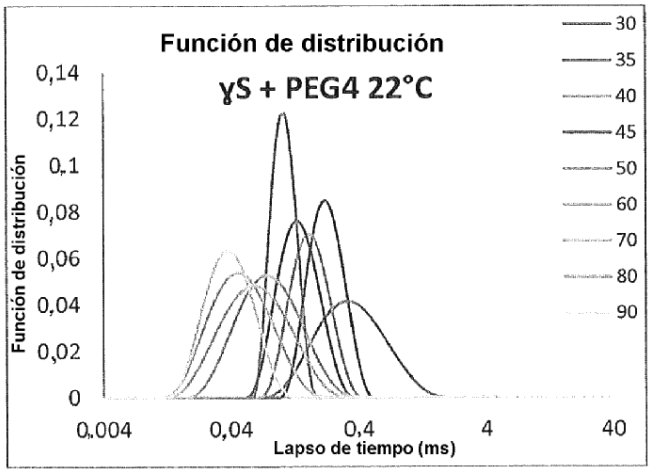


Figura 8

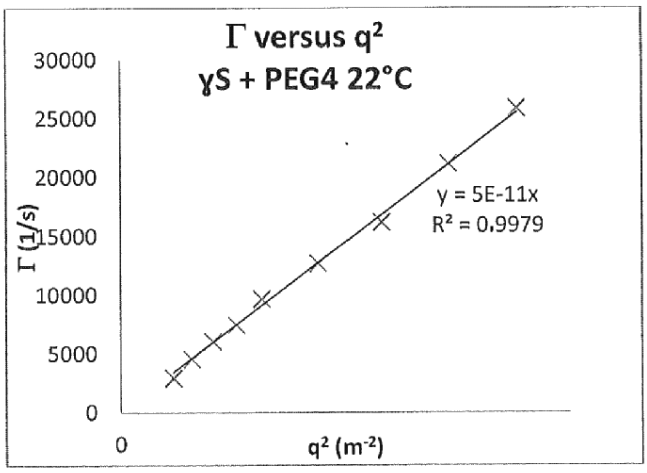


Figura 9

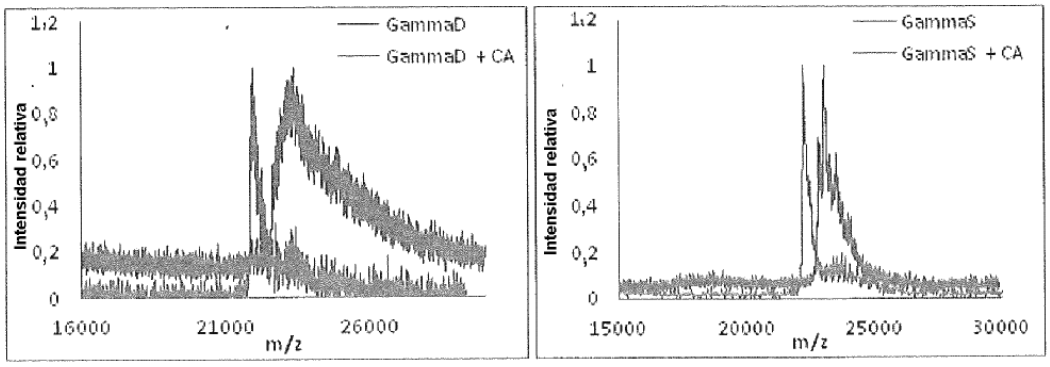


Figura 10

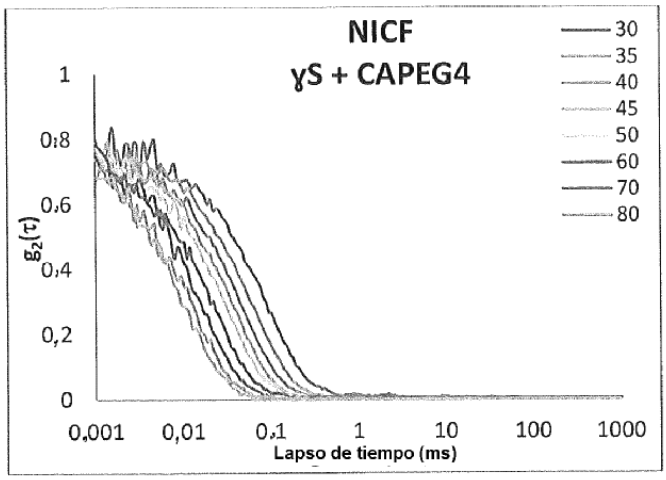


Figura 11

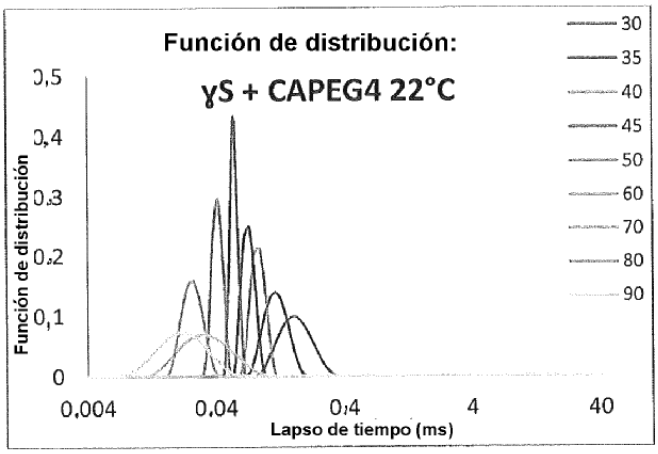


Figura 12

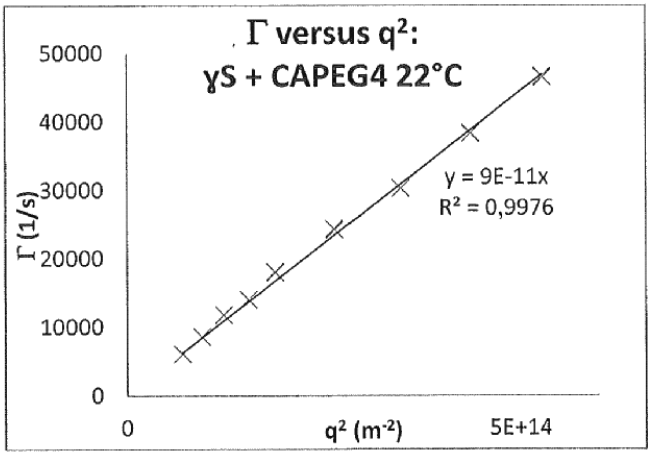


Figura 13

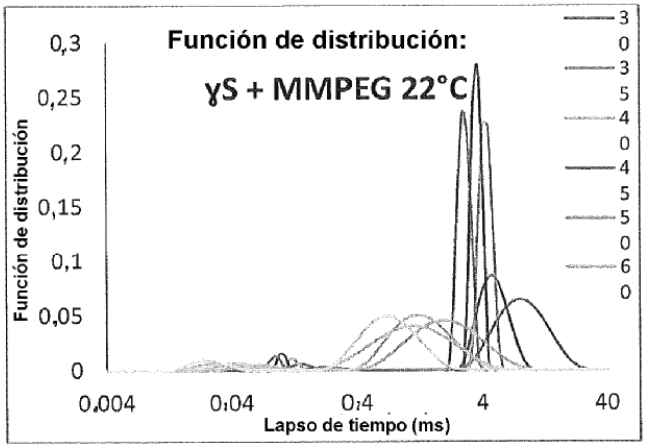


Figura 14

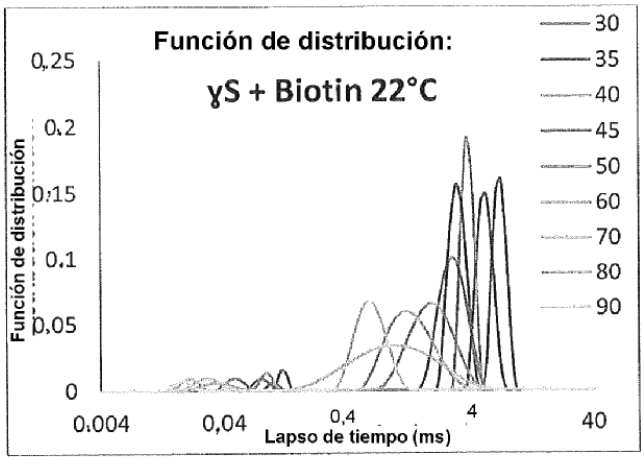


Figura 15

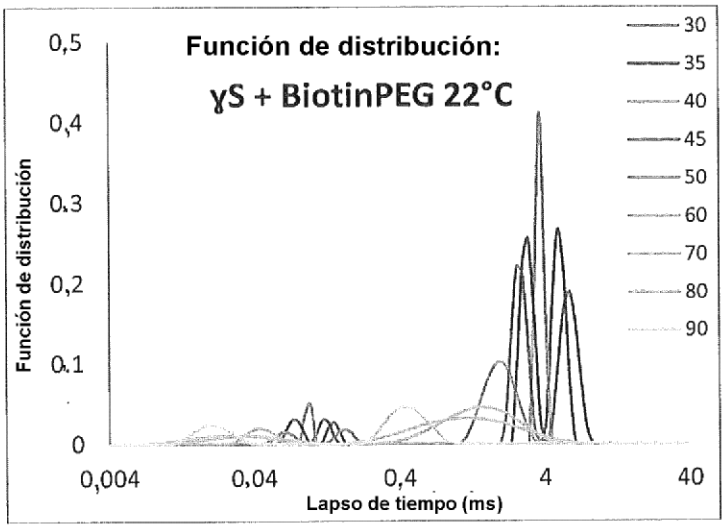


Figura 16

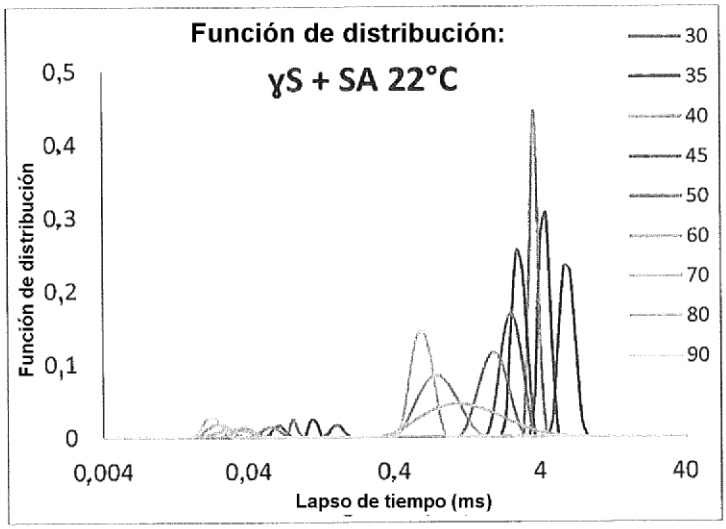


Figura 17

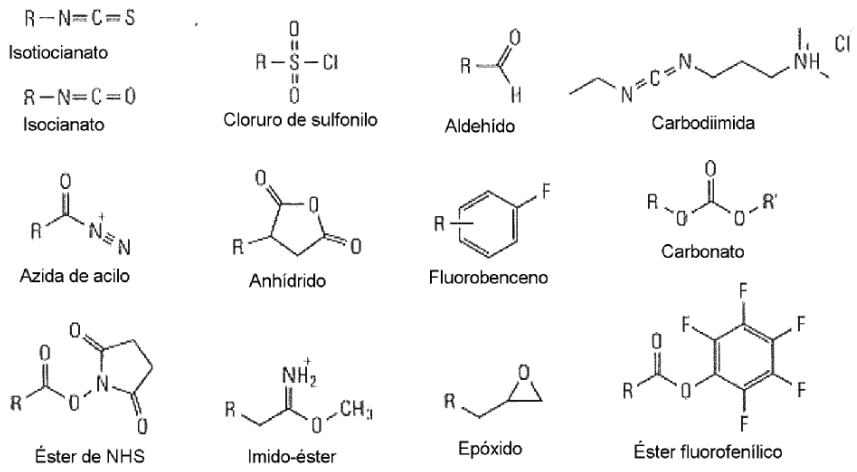


Figura 18

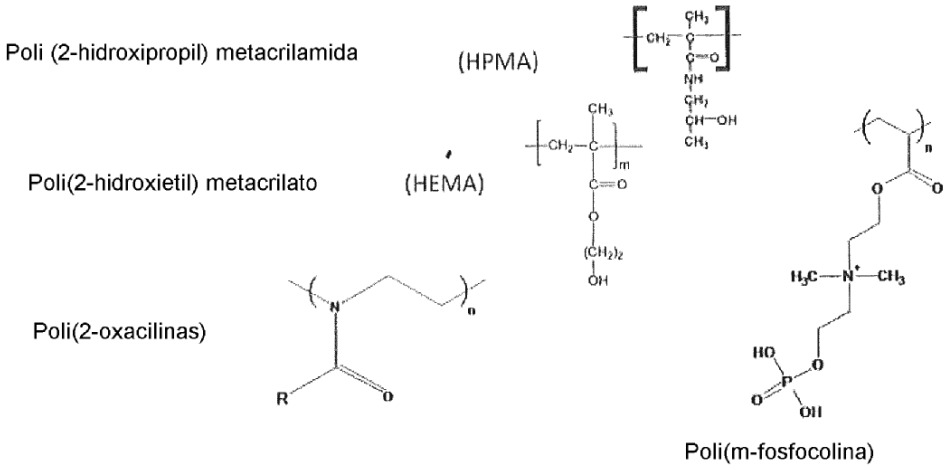


Figura 19

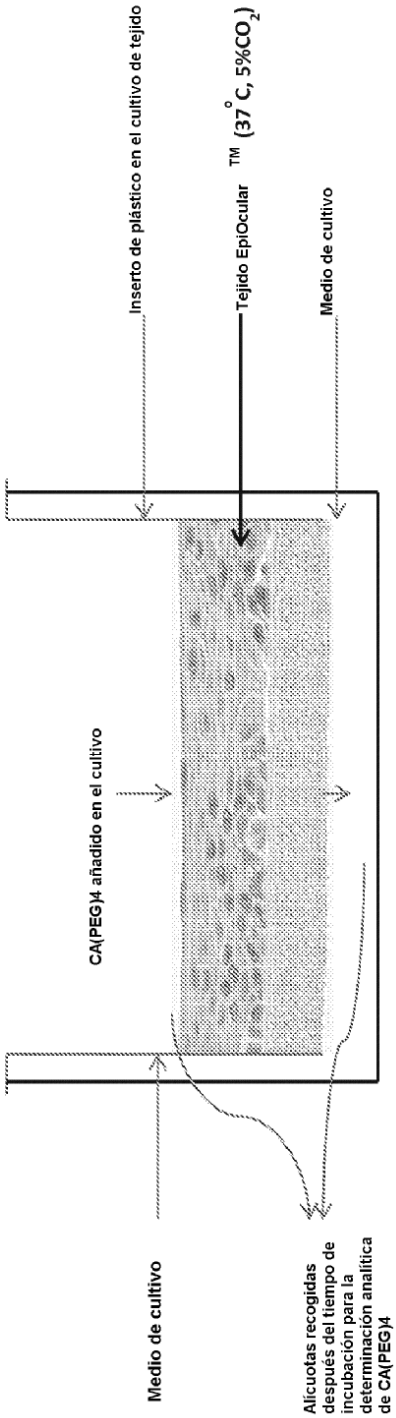

Medio de cultivo
CA(PEG)4 añadido en el cultivo
Inserto de plástico en el cultivo de tejido
Tejido EpiOcular ™ (37 °C, 5%CO2)
Medio de cultivo
Alícuotas recogidas después del tiempo de incubación para la determinación analítica de CA(PEG)4

Figura 20

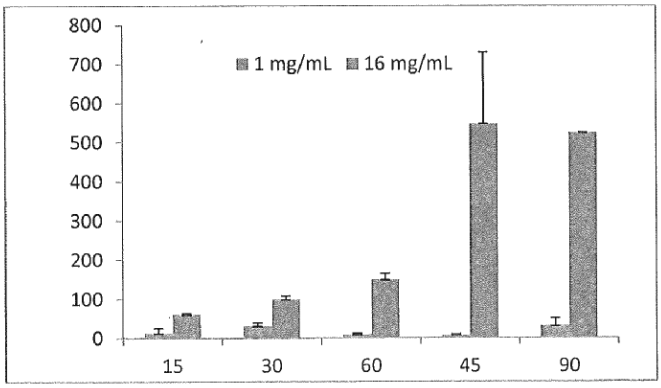
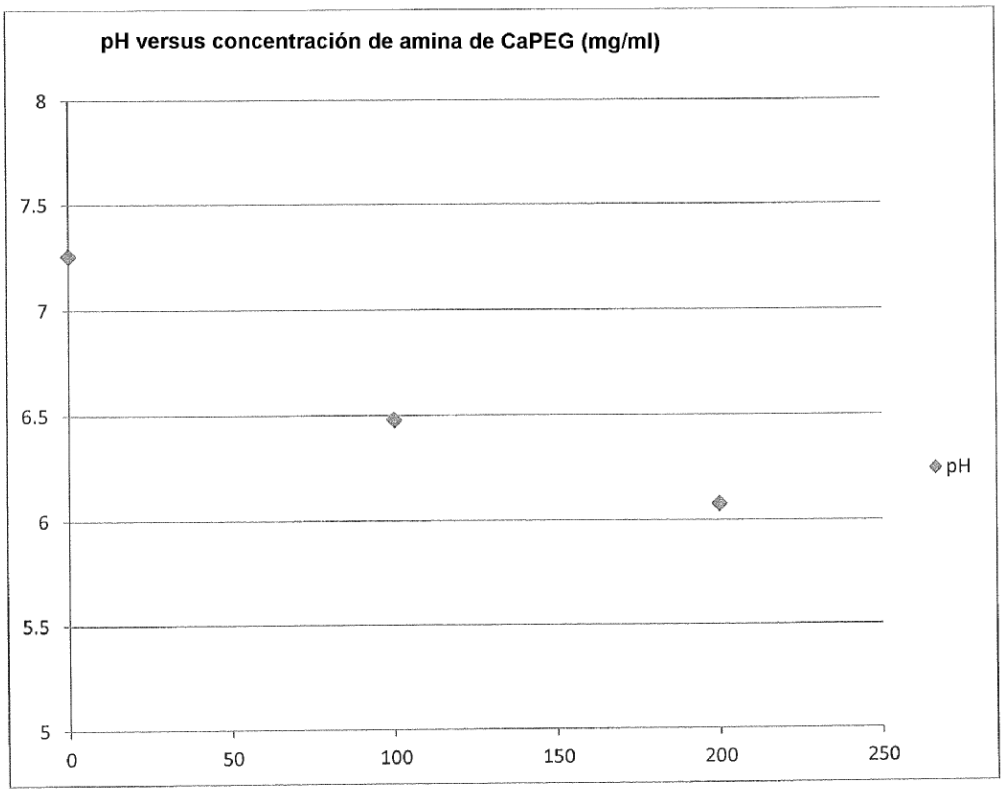



Figura 21