

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 398**

51 Int. Cl.:

A61K 47/42 (2007.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2015 PCT/IB2015/054747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15198245**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2015 E 15736046 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3160512**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de visualización del vítreo**

30 Prioridad:

25.06.2014 US 201462016731 P

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

11.11.2019

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GHOSH, JOY;
DRYJA, THADDEUS PETER;
ROGUSKA, MICHAEL y
CARLSON, ERIC**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 730 398 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

Composiciones y procedimientos de visualización del vítreo

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones que comprenden un péptido de unión a hialuronano (HA) y al uso de las mismas para inyección en el humor vítreo de ojos de mamíferos, al uso de las mismas durante la cirugía oftálmica, por ejemplo, durante una vitrectomía, y al uso de las mismas como biosensores.

10

Antecedentes de la invención

En el ojo, la cavidad entre el cristalino y la retina está llena de una sustancia transparente y gelatinosa denominada cuerpo vítreo, humor vítreo o vítreo. Tiene un volumen fijo y relativamente permanente. El humor vítreo es 99 % de agua, con la mayor parte del 1 % restante compuesto por sales (sodio, cloruro, bicarbonato, etc.), colágeno y hialuronano (ácido hialurónico). El colágeno y el hialuronano dan al vítreo una consistencia gelatinosa y una alta viscosidad. La superficie externa del vítreo normalmente se adhiere débilmente a la retina y al cuerpo ciliar, con una unión algo más estrecha en la mácula, en la periferia más alejada de la retina, cerca de la ora serrata, y en la pars plana del cuerpo ciliar. En condiciones patológicas, tales como el desprendimiento de retina regmatógeno, el agujero macular, el síndrome de tracción vitreomacular y la vitreoretinopatía proliferativa, la unión del vítreo a la retina media o facilita el daño a la retina. Por ejemplo, a medida que el vítreo envejece, su colágeno se contrae (en un proceso denominado sinéresis vítreo) y la contracción puede producir tracción en la retina, induciendo finalmente un desgarro u agujero en la retina y un consiguiente desprendimiento de retina o un agujero macular. Como otro ejemplo, la adherencia puede funcionar como un andamio para la proliferación fibrosa, fibrovascular o fibrogliar que emana de la retina, en un proceso denominado vitreoretinopatía proliferativa. Las membranas fibrosas en la vitreoretinopatía proliferativa pueden contraerse y causar desgarros retinianos, agujeros retinianos y desprendimientos de retina, todo lo cual puede conducir a la ceguera.

15

20

25

30

35

Los pacientes que padezcan estas y otras enfermedades mediadas por vítreo puede beneficiarse de un procedimiento quirúrgico conocido como vitrectomía. La vitrectomía también puede constituir una etapa en el curso de otros tipos de cirugía de la retina. Los ejemplos incluyen la vitrectomía que generalmente acompaña a la eliminación de cuerpos extraños que pueden haber entrado en el cuerpo vítreo de manera traumática o iatrogénica, o la vitrectomía que acompaña a la inyección de un vector de terapia génica debajo de la retina, o la vitrectomía realizada en ojos con endoftalmitis infecciosa a fin de eliminar microorganismos y hacer espacio para la inyección de antibióticos. Sin embargo, el procedimiento quirúrgico de la vitrectomía en sí puede producir complicaciones.

40

45

50

Para ser óptimamente eficaces, muchos procedimientos quirúrgicos de la retina, tales como la extracción de membranas epirretinianas, requieren la disección completa del vítreo lejos de la retina. La transparencia del vítreo hace que resulte difícil para el cirujano visualizar y, por lo tanto, eliminar el vítreo por completo. Un cirujano que realiza una vitrectomía puede no estar totalmente seguro de si la superficie posterior del vítreo (denominada haloide posterior) se encuentra completamente separada de la retina y si se ha logrado una vitrectomía completa. Mientras el cirujano intenta la extracción completa del vítreo cerca de la retina, puede cortar de manera accidental la retina y crear así defectos o agujeros retinianos iatrogénicos o posiblemente extraer elementos neurales insustituibles y esenciales para la visión. Se han descrito muchas técnicas quirúrgicas que intentan ayudar al cirujano en la extracción del haloide posterior durante la vitrectomía. Estas incluyen el uso de diferentes cánulas, fórceps o dispositivos de corte vítreo con succión activa o pasiva aplicados para enganchar y separar el haloide posterior de la retina. Ryan y col. han descrito el uso de sangre autóloga inyectada para mejorar la visualización del vítreo cortical durante la separación del haloide posterior. Ninguna de estas técnicas resulta totalmente satisfactoria. Por ejemplo, la instilación de sangre en el vítreo presenta varios inconvenientes: la sangre se dispersa en la cavidad vítrea y es probable que oculte la visualización de la retina durante la vitrectomía, al tiempo que tiene el potencial de provocar inflamación postoperatoria y vitreoretinopatía proliferativa.

55

El documento WO 2014/011813 A1 describe complejos que comprenden péptidos de unión a hialuronano (HA) (HABP), que se unen a HA (de alto PM). Tales péptidos pueden estar etiquetados, por ejemplo, con un marcador fluorescente. Las formulaciones incluyen inyecciones para la aplicación en el ojo y depósitos para la implantación en el ojo, por ejemplo, por vía intravítrea.

60

El documento WO 2013/063155 A2 describe composiciones de péptidos de unión a hialuronano (HA), que pueden conjugarse con un resto detectable y usarse en la formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo, en fluorescencia o bioluminiscencia. Las HABP etiquetadas se usan para determinar si un sujeto podrá ser tratado con un agente anti-hialuronano.

65

El documento WO 2012/135432 A2 describe colorantes vitales para su uso en, por ejemplo, cromovitrectomía. Los colorantes se proporcionan como una solución, que puede hacerse más viscosa mediante la adición de ácido hialurónico como vehículo. Los colorantes vitales se pueden usar intraoperatoriamente para la tinción selectiva de tejidos oculares, tales como el vítreo durante la cirugía vitreoretiniana

En resumen, el daño iatrogénico a la retina constituye todavía una reconocida potencial complicación de la vitrectomía. Todavía existe la necesidad de un procedimiento de extracción quirúrgica del vítreo con mayor exactitud, precisión e integridad, de modo que se puedan minimizar las complicaciones, así como la incomodidad, las molestias y los gastos para el paciente. Por lo tanto, son deseables procedimientos y agentes que permitan mejorar la visualización del vítreo durante un procedimiento quirúrgico y, por lo tanto, garanticen la precisión del procedimiento, para lograr mejores resultados funcionales y anatómicos.

Sumario de la invención

La invención se dirige a:

(1) Una composición que comprende un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en un ojo en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo resulte visible para la corrección quirúrgica y la extracción del vítreo para la corrección quirúrgica de un trastorno ocular.

(2) Una composición para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en el ojo de un mamífero, que comprende una formulación inyectable de un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable como agente de delineación vítrea en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo resulte visible para un cirujano, en la que el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; o

b) 95 aminoácidos consecutivos de la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

(3) Una composición oftálmica para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en el ojo de un mamífero, que comprende un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo resulte visible cuando se genera una señal por parte del resto detectable, en la que el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; o

b) 95 aminoácidos consecutivos de la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13

(4) La composición del punto (1), (2) o (3), en la que el resto ópticamente detectable es luminiscente, fotoluminiscente, electroluminiscente, bioluminiscente, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente o es un cromóforo.

(5) La composición del punto (4), en la que el resto ópticamente detectable es un material quimiosensor fluorescente.

(6) La composición del punto (1), (2) o (3), en la que dicha composición comprende además un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

(7) La composición del punto (6), en la que dicho agente terapéutico es un agente antiinfeccioso, un agente inmunosupresor, un agente antiproliferativo, un agente antiangiogénico, un agente de curación de heridas, un agente cicatrizante, o combinaciones de los mismos.

(8) La composición del punto (2) o (3), en la que dicha composición es inerte.

(9) La composición del punto (1), en la que dicha composición se formula como una vesícula seleccionada del grupo que consiste en un liposoma y una microesfera.

(10) La composición del punto (1), en la que dicha composición tiene una formulación seleccionada del grupo que consiste en una solución, una emulsión y una suspensión.

(11) La composición para el uso del punto (1) destinada a ser inyectada antes de una vitrectomía o durante la misma.

(12) Un procedimiento de coloración del vítreo del ojo de un mamífero en el que se ha inyectado la composición

del punto (3), que comprende la aplicación de una fuente de energía al ojo para la generación de una señal por parte del resto detectable.

(13) El procedimiento del punto (12), en el que la fuente de energía es una luz o un láser.

(14) Un procedimiento de monitorización de un analito en el vítreo del ojo de un mamífero en el que se ha inyectado la composición del punto (3), que comprende la detección de una señal generada por parte del resto detectable.

Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes a partir de las siguientes figuras y la descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

LA FIGURA 1 muestra el cambio de fluorescencia relativa en relación con el tiempo, especialmente en el cuerpo vítreo de ojos de conejo después de la administración IVT de 2,5 µg de una composición de la invención de (valor medio, n = 6 ojos).

LA FIGURA 2 demuestra el cambio de fluorescencia relativa en relación con el tiempo, especialmente en el cuerpo vítreo de ojos de conejo después de la administración IVT de 5 µg de una composición de la invención (valor medio, n = 6 ojos).

LA FIGURA 3A es una foto del ojo de un conejo antes de la inyección en el mismo de una composición de la invención.

LA FIGURA 3B es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia antes de la inyección en el mismo de una composición de la invención.

LA FIGURA 4A es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 16 horas después de la inyección en el mismo de 2,5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 4B es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 16 horas después de la inyección en el mismo de 5 µg de una composición de la invención

LA FIGURA 5A es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 24 horas después de la inyección en el mismo de 2,5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 5B es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 24 horas después de la inyección en el mismo de 5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 6A es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 48 horas después de la inyección en el mismo de 2,5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 6B es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 48 horas después de la inyección en el mismo de 5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 7A es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 72 horas después de la inyección en el mismo de 2,5 µg de una composición de la invención.

LA FIGURA 7B es una foto del ojo de un conejo utilizando imágenes de autofluorescencia de gran angular y un 80 % de ganancia 72 horas después de la inyección en el mismo de 5 µg de una composición de la invención.

Descripción detallada

Las composiciones que comprenden un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable se proporcionan como una composición de delineación vítrea (para facilitar la cirugía ocular), como una composición de sensor (para monitorizar y evaluar la presencia de un analito deseado en el vítreo) y como una composición de evaluación del pH intravítreo.

Se divulga el uso de una o más composiciones de delineación vítrea que comprenden un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable para mejorar la visualización del vítreo durante la cirugía de tratamiento de un trastorno ocular estructural. La delineación del vítreo ayuda al cirujano en la separación del haloide posterior y la extracción completa del vítreo durante un procedimiento, tal como una vitrectomía pars plana. La composición se introduce en el vítreo y se une al hialuronano en el ojo a través del humor vítreo, aumentando la visualización del vítreo en todo momento. El agente visible de delineación vítrea proporcionado, por ejemplo, como una solución, suspensión o emulsión, se difunde a través del vítreo en el transcurso de unas pocas horas. Al hacerlo, el vítreo pasa a estar en marcado contraste con el fondo del ojo y permite al cirujano distinguir claramente el vítreo de la retina. La localización de la composición al vítreo y no a la retina se debe a la afinidad de la composición por el

hialuronano y a la concentración mucho mayor de hialuronano en el vítreo en comparación con la retina o cualquier otra estructura ocular. De hecho, la concentración de ácido hialurónico en el vítreo (de 0,1 a 0,4 mg/ml) es mayor que en casi cualquier otro tejido del cuerpo humano. La composición de delineación es preferiblemente un agente inerte que carece de actividad farmacológica, lo que lo convierte en seguro, y no está asociado con toxicidad o reacciones adversas antes o durante una cirugía. La composición se administra en el ojo mediante inyección. Se difunde a través del vítreo y forma complejos reversibles con hialuronano en el vítreo. Debido a que la composición puede estar coloreada o de otro modo ser ópticamente reconocible (por ejemplo, de forma innata o detectable al entrar en contacto con una fuente de energía), delinea o demarca el vítreo y, en efecto, "ilumina" el humor vítreo mediante una señal visible generada por el resto ópticamente detectable en las condiciones apropiadas. Esto mejora la visualización del vítreo y su haloide posterior por parte del cirujano. En ciertas realizaciones, la composición de delineación vítrea de la invención puede visualizarse de forma episódica o transitoria en cualquier momento durante la cirugía y a voluntad del cirujano mediante la aplicación por parte del cirujano o del ayudante quirúrgico de una fuente de energía tal que la composición muestre propiedades fluorescentes. En ciertas realizaciones, la composición de delineación vítrea de la invención se puede visualizar continuamente, durante el curso de una cirugía.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede hacerse visible para el cirujano durante la cirugía. Por ejemplo, la composición se inyecta antes de la cirugía o durante la misma, y se puede usar una fuente de energía (tal como una luz) para excitar un resto ópticamente detectable de la composición de la invención haciendo así que el resto muestre propiedades fluorescentes. La visualización puede realizarse a simple vista o con la ayuda de instrumentos, tales como un microscopio quirúrgico, dependiendo del resto utilizado en la composición de la invención.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente una sustancia detectable adecuada como resto ópticamente detectable basándose en el uso previsto de la composición de la invención. Por ejemplo, en un procedimiento quirúrgico de la invención, se puede preferir una composición que comprenda un resto fluorescente, permitiendo así que un cirujano visualice el vítreo a voluntad al encender una fuente de energía luminosa con una longitud de onda y una intensidad determinadas a fin de excitar la sustancia para visualizar el vítreo en cualquier momento durante una cirugía, y apagar la fuente de energía luminosa para que la composición no sea visible cuando así se requiera durante el procedimiento quirúrgico. Si el cirujano extrajera el vítreo como parte del procedimiento (es decir, durante una vitrectomía), el agente desaparecería junto con el vítreo. Las regiones de la cavidad vítrea con vítreo residual podrían reconocerse con facilidad y el cirujano podría prestar atención a esas áreas. La ausencia completa de color o la fluorescencia del vítreo indicarían que la vitrectomía fue completa.

Las concentraciones vítreas de los fármacos se correlacionan con sus concentraciones en sangre, siendo las correlaciones dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos (por ejemplo, su solubilidad y lipofilicidad). Los especialistas forenses a veces miden los niveles de fármacos o toxinas en el vítreo como sustituto de las mediciones en sangre (véase, por ejemplo, Knittel et al., 2009, J. Anal. Toxicol. 33:434-438). Por consiguiente, la composición de sensor de la invención tal como se describe en el presente documento puede utilizarse para medir los cambios metabólicos y farmacológicos en el ojo y en el cuerpo una vez que residen en el vítreo. La composición de la invención puede utilizarse para evaluar y monitorizar *in vivo* fármacos y/o metabolitos en el vítreo, proporcionando, de este modo, "biosensores" de larga duración en el vítreo que proporcionan una señal visual correlacionada con un compuesto químico de interés. Las composiciones de la invención se pueden usar, por ejemplo, para permitir repetidas mediciones *in vivo* en animales, con lo que se reduce el número de animales utilizados normalmente para tales estudios y se mejora la precisión de las mediciones, ya que se puede realizar un seguimiento longitudinal de cada ojo a lo largo del tiempo.

Composiciones

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable para su uso tal como se define en la reivindicación 1.

Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender un agente terapéutico y/o una sustancia inerte además de un péptido de unión a HA con un resto ópticamente detectable.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente terapéutico" se refiere a un compuesto, tal como una proteína, un ácido nucleico o una pequeña molécula, de utilidad en el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad, afección o trastorno. Ejemplos no limitantes de un agente terapéutico útil en la composición de la invención incluyen un agente antiinfeccioso, un agente inmunosupresor, un agente antiproliferativo, un agente antiangiogénico, un agente de curación de heridas y un agente cicatrizante. También pueden incluirse en la composición de la invención combinaciones de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancia inerte" se refiere a una sustancia que es química y farmacológicamente inactiva en el ojo, incluyendo, pero sin limitarse a, una microesfera vacía o un liposoma vacío. Una sustancia inerte útil en una composición de la invención es una sustancia que es visible o puede hacerse visible durante el procedimiento quirúrgico. Se puede usar una combinación de agentes terapéuticos y sustancias inertes (por ejemplo, una microesfera o un liposoma que contenga cualquiera de los agentes terapéuticos anteriores).

La composición de la invención puede comprender además un agente de diagnóstico. El agente de diagnóstico se puede utilizar para detectar, evaluar y/o monitorizar la progresión de un trastorno o enfermedad ocular.

Restos ópticamente detectables

Tal como usa en el presente documento, un "resto ópticamente detectable" es cualquier sustancia que puede detectarse cuando se expone a ciertas condiciones, y puede ser un agente de contraste. En ciertas realizaciones, el resto ópticamente detectable es luminiscente, fotoluminiscente, electroluminiscente, bioluminiscente, quimioluminiscente, fluorescente o fosforescente, o es un cromóforo. Por ejemplo, un resto fluorescente puede excitarse mediante la exposición a una fuente de energía (por ejemplo, una luz) que tenga una longitud de onda e intensidad específicas, permitiendo así que se visualice la composición de la invención, por ejemplo, mediante el uso de un microscopio quirúrgico con filtros determinados, tales como los que se conocen en la técnica. Un agente de contraste es una sustancia que es opaca, por ejemplo, a la luz visible, o que de otra manera es visiblemente diferenciable del vítreo bajo ciertas condiciones (por ejemplo, a la luz visible).

Las sustancias detectables adecuadas para su uso en la composición de la invención incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, tales como, entre otras, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos protésicos, tales como, entre otros, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, entre otros, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, entre otros, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, entre otros, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radioactivos, tales como, entre otros, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I y ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In y ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Pd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Tm; materiales fosforescentes, tales como, entre otros, pigmentos como el sulfuro de zinc o el aluminato de estroncio; moléculas halocrómicas que cambian de color según el pH, tales como, entre otras, la fenolftaleína; y metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Además, en la composición de la invención puede usarse una sustancia coloreada como resto ópticamente detectable. Tal como se usa en el presente documento, una "sustancia coloreada" preferiblemente no tiene bioactividad, y está presente en una dosis suficientemente baja para mantener la visualización del fondo de ojo cuando se inyecta en el ojo. Los ejemplos de sustancias coloreadas que se pueden usar en la composición de la invención incluyen partículas de ácido poliláctico y ácido poliláctico.

En ciertas realizaciones, un péptido de unión a HA está enlazado a una molécula halocrómica, y es útil para determinar el pH en el ojo de un mamífero de forma no invasiva e *in vivo*. Las moléculas halocrómicas cambian de color de acuerdo con el pH de su entorno. En una realización preferida, la molécula halocrómica puede cambiar de color, y por lo tanto es detectable, en el intervalo de pH fisiológico de aproximadamente 7,0 a 7,6. Una única inyección intravítrea de la composición de la invención se puede usar para realizar repetidas mediciones del pH intraocular en el transcurso de horas, días y semanas mediante la verificación del color del vítreo en los puntos temporales deseados.

En ciertas otras realizaciones, un péptido de unión a HA está enlazado a un material quimiosensor fluorescente. Tales composiciones de sensor son útiles para monitorizar la presencia de una especie química deseada tal como se describe, por ejemplo, en Basabe-Desmots y col., 2007, *Chemical Society Reviews* 36:993-1017.

Los materiales quimiosensores adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros fluorescentes, materiales sol-gel, materiales mesoporosos, agregados de tensioactivos, sílice y nanopartículas basadas en polímeros y puntos cuánticos.

La composición de sensor de la invención puede estar diseñada para medir cualquier compuesto deseado, tal como un fármaco terapéutico y metabolitos fisiológicos. Dichos sensores pueden ser útiles para monitorizar y evaluar la presencia de ciertas moléculas durante días, semanas y meses después de la inyección en el ojo o después de la entrada en el ojo desde la sangre o desde tejidos periculares como la conjuntiva o los tejidos orbitales, siempre que el sensor está enlazado a un péptido como HA10 que media un largo tiempo de residencia en el vítreo, tal como se describe en el presente documento. Para monitorizar la fluorescencia de la composición de sensor de la invención, se pueden usar técnicas ópticas estándar, tales como, entre otras, un instrumento fluorofotómetro. La detección de los niveles vítreos de los materiales detectados deseados se puede usar para monitorizar y evaluar los procesos oculares, así como procesos en otras partes del cuerpo, tales como el estado metabólico de un paciente o la exposición a fármacos sistémicos o fármacos administrados localmente. La composición de sensor de la invención también puede ser útil en medicina personalizada para el control terapéutico de medicamentos tal como se describe, por ejemplo, en Griss y col., 2014, *Nature Chemical Biology*, publicado en línea el 8 de junio de 2014, DOI: 10.1038/NCHEMBO.1554, cuyos contenidos se incorporan por referencia en su totalidad. Las composiciones también son útiles en investigación para monitorizar el estado fisiológico de un animal durante las manipulaciones experimentales.

Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento de monitorización de los analitos en el ojo. Dichos

procedimientos son útiles, por ejemplo, para facilitar los estudios farmacocinéticos de fármacos terapéuticos inyectados en el ojo, aplicados tópicamente al ojo, o que llegan al ojo a través de la administración sistémica.

Etiquetas peptídicas de unión a hialuronano (HA)

El término "hialuronano", "ácido hialurónico" o "HA" se refiere a una glicosamina polimérica grande que contiene unidades de disacáridos de N-acetil glucosamina y ácido glucurónico que se encuentra en la matriz extracelular y en las superficies celulares. El hialuronano se describe con más detalle en J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (8): 397-411.

El término "hialdherina" y las expresiones "proteínas de unión a hialuronano" o "proteínas de unión a HA" se refieren a una proteína o una familia de proteínas que se unen a hialuronano. En la técnica se conocen ejemplos de proteínas putativas de unión a HA (Day, y col. 2002 J Bio.Chem 277: 7, 4585 y Yang, y col. 1994, EMBO J 13: 2, 286-296) (por ejemplo: Link, CD44, RHAMM, Aggrecan, Versican, HA sintasa bacteriana, colágeno VI y TSG-6). Muchas proteínas putativas de unión a HA, y fragmentos peptídicos, contienen un dominio estructural común de ~100 aminoácidos de longitud implicados en la unión a HA; el dominio estructural se conoce como "dominio LINK" (Yang, y col. 1994, EMBO J 13: 2, 286-296 y Mahoney, y col. 2001, J Bio.Chem 276: 25, 22764-22771). Por ejemplo, el dominio LINK de TSG-6, una proteína de unión a HA, incluye los residuos de aminoácidos 36-128 de la secuencia TSG-6 humana.

En ciertas realizaciones, una composición de la invención para su uso tal como se define en la reivindicación 1 comprende al menos un péptido de unión a hialuronano (HA) que se une específicamente a hialuronano en el ojo. El hialuronano está presente en el cuerpo en varios tamaños en muchos órganos de los tejidos. Por ejemplo, el ojo humano y el líquido sinovial contienen las concentraciones más altas de hialuronano con 0,14-0,338 mg/ml en el vítreo y 1,42-3,6 mg/ml en las articulaciones, respectivamente, mientras que otros tejidos y fluidos contienen concentraciones mucho más bajas de hialuronano, como el suero, en el que las concentraciones de hialuronano son de 0,00001-0,0001 mg/ml (Laurent y Fraser, 1986 Ciba Found Symp. 1986; 124: 9-29). El hialuronano no ocular consiste principalmente en polímeros de bajo peso molecular que se degradan y se renuevan rápidamente. En humanos, el hialuronano tiene una vida media de 2,5 a 5 minutos en sangre (Fraser JR, Laurent H, Pertoft H, Baxter E. *Biochem J.* 1981, 15 de noviembre; 200(2):415-24). En contraste, el hialuronano ocular consiste principalmente en polímeros de alto peso molecular (> 0,5 X 10⁵ Dalton) y tiene una velocidad de renovación más lenta de días o semanas (Laurent y Fraser, *Exp. Eye Res.* 1983; 36, 493-504). Debido a estas diferencias en el tamaño y la renovación del hialuronano en el ojo, el hialuronano en el ojo serviría como un andamio de liberación sostenida para proteínas intravítreas y ácidos nucleicos enlazados a un péptido de unión a HA.

Las proteínas putativas de unión a hialuronano se han descrito en la técnica (J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar. *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (8): 397-411); algunos ejemplos son la proteína del gen 6 inducible por factor de necrosis tumoral (TSG6), el receptor de la motilidad mediada por hialuronano (RHAMM), el antígeno CD44, la proteína 4 del enlace de hialuronano y proteoglicano, la proteína del núcleo de neurocan, la atabilina-2 y la proteína glial de unión a hialuronato humana. Sin embargo, los dominios de unión a HA de diferentes proteínas putativas de unión a hialuronano que se sometieron a prueba no se unieron a HA, y no lograron aumentar la vida media ocular de proteínas o ácidos nucleicos unidos a los péptidos putativos de unión a HA. La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que los péptidos que se unen eficazmente a HA en el ojo. Este descubrimiento provocó el descubrimiento secundario de que su uso delinearía el vítreo cuando se enlazada a un resto ópticamente detectable apropiado y, por lo tanto, sería adecuado para facilitar la cirugía ocular en la que es ventajoso visualizar el vítreo, tal como durante una vitrectomía, o para su uso como biosensores de larga duración en el vítreo del ojo.

En ciertos aspectos de la invención, la etiqueta peptídica se une a HA en el ojo con una KD menor o igual a 100 µM, 90 µM, 80 µM, 70 µM, 60 µM, 50 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, o 10 µM. En particular, una composición de la invención puede unirse a HA en el ojo con una KD menor o igual a 9,0 µM, menor o igual a 8,5 µM, menor o igual a 8,0 µM, menor o igual a 7,5 µM, menor o igual a 7,0 µM, menor o igual a 6,5 µM, menor o igual a 6,0 µM, menor o igual a 5,5 µM, menor o igual a 5,0 µM, menor o igual a 4,5 µM, menor que o igual a 4,0 µM, menor o igual a 3,5 µM, menor o igual a 3,0 µM, menor o igual a 2,5 µM, menor o igual a 2,0 µM, menor o igual a 1,5 µM, menor o igual a 1,0 µM, menor o igual a 0,5 µM, o menor o igual a 100 nM. En aspectos más específicos, por ejemplo, el péptido se une a HA en el ojo con una KD menor o igual a 8,0 µM, menor o igual a 7,2 µM, menor o igual a 6,0 µM, o menor o igual a 5,5 µM. En algunos aspectos de la invención, el péptido que se une a HA tiene un dominio LINK. En ciertos otros aspectos de la invención, el dominio LINK es un dominio LINK TSG-6. Se pueden utilizar versiones modificadas del péptido que también resisten la escisión proteolítica y/o la glicosilación, o que facilitan la fabricación de los péptidos. Más específicamente, la invención puede incluir un péptido que se une, o es capaz de unirse, a HA que comprende una secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13. Se contempla que el péptido que comprende una secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 se une, o es capaz de unirse, a HA en el ojo de un sujeto. Se contempla que el péptido puede ser cualquiera de los péptidos enumerados en la Tabla 1. Más específicamente, el péptido puede ser HA10, HA10.1, HA10.2, HA11, HA11.1, HA 10.1.1, NVS-A, NVS-X, NVS-Y, NVS-AX, NVS-AY, HA 11.APP (MBG100) o HA 11.HIS (MBG103). Los péptidos de unión a HA útiles en la composición de la invención también se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 14/109426, cuyo contenido completo se incorporan por referencia.

En ciertas realizaciones, el péptido de unión a HA es o comprende la porción subrayada de las secuencias SEQ ID NO: 6, 12 o 13.

TABLA 1

Secuencias		
SEQ ID NO: 1	Proteína 1 (HA10)	GVYHREARSGKYKLT YAEAKAVCE FEGGHLA TYKQLEAARKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPIV KPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCY NPHAK
SEQ ID NO: 2	Proteína 2 (HA10.1)	GVYHREAQSGKYKLT YAEAKAVCE FEGGHL ATYKQLEAARKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPI VKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYC YNPHA
SEQ ID NO: 3	Proteína 3 (HA 10.2)	GVYHREAASGKYKLT YAEAKAVCE FEGGHLA TYKQLEAARKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPIV KPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCY NPHA
SEQ ID NO: 4	Proteína 4 (HA 11)	ACGVYHREAQSGKYKLT YAEAKAVCE FEGG HLATYKQLECAR KIGFHVCAAGWMAKGRV G YPIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDA YCYNPHA
SEQ ID NO: 5	Proteína 5 (HA 11.1)	GVYHREAQSGKYKLT YAEAKAVCE FEGGHL CTYKQLEAARKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPI VKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYC CNPHA
SEQ ID NO: 6	Proteína 6 (HA 10.1.1)	<u>GGGGGGSGGGGVYHREAQSGKYLLTYAEA</u> <u>KAVCE</u> <u>FEGGHLATYKQLEAARKIGFHVCAAG</u> <u>WMAKGRVGYPIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRL</u> <u>NRSERWDAYCYNPHAGGSHHHHHH</u>
SEQ ID NO: 7	Proteína 7 NVS-A	ACGVYHREAQSGKYKLT YAEAKAVCE FEGG HLATYKQLECAR KIGFHVCAAGWMAKGRV G YPIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDA YCYNPHA
SEQ ID NO: 8	Proteína 8 NVS-X	GVYHREAI SGKYLLTYAEAKAVCE FEGGHLA TYKQLLAAQKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPIV KPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCY NPHA
SEQ ID NO: 9	Proteína 9 NVS-Y	GVYHREAI SGKYLLTYAEAKAVCE FEGGHLA TYKQLQAAQKIGFHVCAAGWMAKGRVGYPIV KPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAYCY NPHA

(continuación)

Secuencias		
SEQ ID NO: 10	Proteína 10 NVS-AX	ACGVYHREAISGKYLYTYAEAKAVCEFEGGH LATYKQLLAAQKIGFHVCAAGWMAKGRVGY PIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAY CYNPHA
SEQ ID NO: 11	Proteína 11 NVS-AY	ACGVYHREAISGKYLYTYAEAKAVCEFEGGH LATYKQLQAAQKIGFHVCAAGWMAKGRVGY PIVKPGPNCGFGKTGIIDYGIRLNRSERWDAY CYNPHA
SEQ ID NO: 12	Proteína 12 (HA 11.APP) MBG10 0	<u>GGGGGGSGGGACGVYHREAQSGKYLYTYA</u> <u>EAKAVCEFEGGHLATYKQLECAR</u> <u>KIGFHVCA</u> <u>AGWMAKGRVGYPIVKPGPNCGFGKTGIIDYG</u> <u>IRLNRSERWDAYCYNPHAGGSEFRHDS</u>
SEQ ID NO: 13	Proteína 13 (HA 11.HIS) MBG10 3	<u>GGGGGGSGGGACGVYHREAQSGKYLYTYA</u> <u>EAKAVCEFEGGHLATYKQLECAR</u> <u>KIGFHVCA</u> <u>AGWMAKGRVGYPIVKPGPNCGFGKTGIIDYG</u> <u>IRLNRSERWDAYCYNPHAGGSHHHHHH</u>
SEQ ID NO: 14	ADN de SEQ ID NO: 1 (HA10)	GGCTGGATGGCTAAGGGTAGAGTGGGCTA CCCTATCGTGAAGCCTGGCCCTAACTGCG GCTTCGGTAAAACCGGAATTATCGACTACG GGATTAGGCTGAATAGATCAGAGCGCTGG GACGCCTACTGCTATAACCCTCACGCTAAG GGAGTCTATCACAGAGAGGCTAGATCAGG CAAGTATAAGCTGACCTACGCCGAGGCTAA GGCCGTGTGCGAGTTCGAGGGCGGTCACC TGGCTACCTATAAGCAGCTGGAAGCCGCTA GAAAGATCGGCTTTTACGTGTGCGCCGCT
SEQ ID NO: 15	ADN de SEQ ID NO: 2 (HA10.1)	GGAGTCTATCACAGAGAGGCTCAGTCAGG CAAGTATAAGCTGACCTACGCCGAGGCTAA GGCCGTGTGCGAGTTCGAGGGCGGTCACC TGGCTACCTATAAGCAGCTGGAAGCCGCTA GAAAGATCGGCTTTTACGTGTGCGCCGCT GGCTGGATGGCTAAGGGTAGAGTGGGCTA CCCTATCGTGAAGCCTGGCCCTAACTGCG GCTTCGGTAAAACCGGAATTATCGACTACG GGATTAGGCTGAATAGATCAGAGCGCTGG GACGCCTACTGCTATAACCCTCACGCC
SEQ ID NO: 16	ADN de SEQ ID NO: 3 (HA 10.2)	GGAGTCTATCACAGAGAGGCTGCTAGCGG TAAATACAAGCTGACCTACGCCGAGGCTAA GGCCGTGTGCGAGTTCGAGGGCGGTCACC TGGCTACCTATAAGCAGCTGGAAGCCGCTA GAAAGATCGGCTTTTACGTGTGCGCCGCT GGCTGGATGGCTAAGGGTAGAGTGGGCTA CCCTATCGTGAAGCCTGGCCCTAACTGCG GCTTCGGTAAAACCGGAATTATCGACTACG GGATTAGGCTGAATAGATCAGAGCGCTGG GACGCCTACTGCTATAACCCTCACGCC

(continuación)

Secuencias		
SEQ ID NO: 17	ADN de SEQ ID NO: 4 (HA 11)	GGCGCCTGTGGCGTGTATCACAGGGAGGC CCAGAGCGGCAAGTACAAGCTCACCTACG CCGAGGCCAAGGCCGTGTGCGAATTCGAG GGCGGCCACCTGGCCACCTACAAGCAGCT GGAGTGCGCCAGGAAGATCGGCTTCCACG TGTGTGCCGCCGGCTGGATGGCCAAAGGC AGAGTGGGCTACCCCATCGTGAAACCCGG CCCCAACTGCGGCTTCGGCAAGACAGGCA TCATCGACTACGGCATCAGGCTGAACAGGA GCGAGAGGTGGGACGCCTACTGCTACAAC
SEQ ID NO: 18	ADN de SEQ ID NO: 5 (HA 11.1)	GGAGTGTATCACAGAGAGGCCAGAGCGG CAAGTACAAGCTGACCTACGCCGAGGCCA AGGCCGTGTGTGAGTTCGAGGGCGGCCAC CTGTGCACCTACAAGCAGCTGGAGGCCGC CAGGAAGATCGGCTTCCACGTGTGTGCCG CCGGCTGGATGGCTAAAGGCAGGGTGGGC TACCCATTGTGAAGCCCGGCCCAATTGC GGCTTCGGCAAGACCGGCATCATCGACTA CGGCATCAGGCTGAACAGGAGCGAGAGGT GGGACGCCTACTGCTGCAACCCCCACGCC

5 En ciertos aspectos, el péptido puede tener una secuencia que comprende 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 98 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13. En ciertos otros aspectos, se contempla que un péptido es una variante truncada de un péptido que comprende una secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13. Los aminoácidos pueden escindirse del extremo N, del extremo C o de ambos péptidos que comprenden una secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 para producir una variante truncada de los péptidos HA10, HA10.1, HA10.2, HA11, HA11.1, NVS-A, NVS-X, NVS-Y, NVS-AX, NVS-AY, HA 11.APP (MBG100), o HA 11.HIS (MBG103). Se contempla además que la secuencia puede escindirse del extremo N de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 hasta y (pero sin incluir) la primera cisteína N-terminal. Se contempla además que la secuencia puede escindirse del extremo C de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 hasta y (pero sin incluir) la primera cisteína C-terminal. Se contempla además que la secuencia puede escindirse tanto del extremo N como del extremo C de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 hasta (pero sin incluir) la primera cisteína N-terminal y (pero sin incluir) la primera cisteína C-terminal. Por ejemplo, con respecto a SEQ ID NO: 1, un experto en la materia podría eliminar hasta 22 aminoácidos del extremo N-terminal (negrita) y/o hasta seis aminoácidos del extremo C-terminal (subrayado).

GVYHREARSGKYKLT~~YAEAKAV~~CEFE~~GGH~~LATYKQLEAARKIGFHVCAAGWM

AKGRVGYPIVKPGPNCGFGK~~TGIIDY~~GIRL~~NR~~SERWDAYCYN~~PHAK~~ (SEQ ID NO: 1).

20 En ciertos aspectos de la invención, se contempla que un solo péptido está unido a un resto ópticamente detectable. En otros aspectos de la invención, se contempla que dos, tres, cuatro o más etiquetas peptídicas pueden unirse al resto ópticamente detectable. En otros aspectos de la invención, se contempla que dos, tres, cuatro o más restos ópticamente detectables se pueden unir a un péptido de unión a HA.

25 Producción

El péptido de unión a HA se puede unir a un resto ópticamente detectable usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un péptido de unión a HA puede expresarse por transfección transitoria de un vector de expresión de mamífero en células HEK293 y purificarse usando resinas de afinidad estándar y conjugarse con un fluoróforo tal como se describe a continuación.

30 La presente invención proporciona péptidos que pueden fusionarse de forma recombinante (es decir, enlazarse) o conjugarse químicamente (incluyendo las conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a otras moléculas tales como fluoróforos, cromóforos, proteínas biosensoras, otras proteínas o ácidos nucleicos. En ciertos aspectos, el péptido se une a HA. En otros aspectos, el péptido se une a HA y comprende un dominio LINK. En otros aspectos, el

péptido se une a HA y comprende un dominio LINK TSG-6. Más específicamente, se contempla que el péptido puede ser HA10 (SEQ ID NO: 1), HA10.1 (SEQ ID NO: 2), HA10.2 (SEQ ID NO: 3), HA11 (SEQ ID NO: 4) o HA11.1 (SEQ ID NO: 5), HA 10.1.1 (SEQ ID NO: 6), NVS-A (SEQ ID NO: 7), NVS-X (SEQ ID NO: 8), NVS-Y (SEQ ID NO: 9), NVS-AX (SEQ ID NO: 10), NVS-AY (SEQ ID NO: 11), HA 11.APP (MBG100) (SEQ ID NO: 12), o HA 11.HIS (MBG103) (SEQ ID NO: 13). El péptido en el contexto de la reivindicación 1 también puede ser un péptido descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 14/109426.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar y expresar un péptido de unión a HA o secuencias peptídicas para usar en una composición de la invención.

Además, los péptidos de unión a HA pueden fusionarse a pequeñas secuencias peptídicas para facilitar la fabricación y purificación. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido hexa-histidina, tal como el marcador provisto en un vector pQE (QIAGEN®, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en comercio. Como se describe en Gentz y col., 1989, Proc. Natl Acad Sci. USA 86: 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros péptidos pequeños útiles para la purificación incluyen, pero sin limitarse a, la etiqueta de hemaglutinina, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., 1984, Cell 37: 767), y la etiqueta "bandera".

Entrega

La invención proporciona composiciones para su uso tal como se define en la reivindicación 1 que comprenden un péptido de la invención, por ejemplo, un péptido que se une a HA en el ojo con una KD menor o igual a 100 µM, 90 µM, 80 µM, 70 µM, 60 µM, 50 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 9,0 µM, 8,5 µM, 8,0 µM, 7,5 µM, 7,0 µM, 6,5 µM, 6,0 µM, 5,5 µM, 5,0 µM, 4,5 µM, 4,0 µM, 3,5 µM, 3,0 µM, 2,5 µM, 2,0 µM, 1,5 µM, 1,0 µM o 0,5 µM. En ciertos aspectos específicos, el péptido puede comprender la secuencia SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, formuladas juntas o por separado, con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona composiciones tales que comprenden moléculas de restos ópticamente detectables etiquetadas con HA (es decir, un péptido enlazado a un resto ópticamente detectable), formuladas juntas o por separado, con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertos aspectos, las composiciones de la invención comprenden un péptido que se une a HA en el ojo tal como se describe anteriormente. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más agentes terapéuticos que son adecuados para tratar o prevenir, por ejemplo, afecciones o trastornos asociados con la enfermedad vascular de la retina o útiles en cirugía, tales como agentes antiinflamatorios, cicatrizantes y de curación de heridas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables mejoran o estabilizan la composición, o se pueden utilizar para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración en el ojo por inyección, más específicamente, para la administración intravítrea. La invención también proporciona procedimientos para producir una composición para administración ocular en la que el procedimiento incluye la etapa de enlazar un péptido que se une a HA en el ojo con una KD menor o igual a 100 µM, 90 µM, 80 µM, 70 µM, 60 µM, 50 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 9,0 µM, 8,5 µM, 8,0 µM, 7,5 µM, 7,0 µM, 6,5 µM, 6,0 µM, 5,5 µM, 5,0 µM, 4,5 µM, 4,0 µM, 3,5 µM, 3,0 µM, 2,5 µM, 2,0 µM, 1,5 µM, 1,0 µM, o 0,5 µM a un resto ópticamente detectable (por ejemplo, un fluoróforo o cromóforo) y que resulta útil para la visualización del vítreo.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden incorporarse en vesículas que proporcionan un inyectable oftálmico adecuado. Ejemplos de tales vesículas incluyen liposomas o microesferas, por ejemplo, microesferas del ácido poli (glicólico) o poli (láctico). La incorporación de composiciones en liposomas o microesferas se puede llevar a cabo mediante procedimientos de rutina, tal como conoce un experto en la materia.

Una formulación que comprende una composición de la invención debe ser estéril y fluida. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones de la invención para administración en el ojo pueden prepararse de acuerdo con procedimientos bien conocidos y de práctica rutinaria en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Co., 20ª ed., 2000. Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención se inyecta en el ojo de un mamífero en una solución acuosa de aproximadamente 150 ml o menos, y la solución comprende al menos aproximadamente 0,001 µg de la composición. En ciertas realizaciones, la solución se formula para administrar aproximadamente 0,001 µg, 0,01 µg,

0,1 µg, 1,0 µg, 10 µg, 20 µg, 30, µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg , 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 3,0 µg, 4,0 µg, o aproximadamente 5,0 µg de una composición de la invención por inyección En ciertas realizaciones, la solución se formula para suministrar menos de aproximadamente 1,0 µg de una composición de la invención por inyección. En ciertas realizaciones, el volumen de la solución acuosa es de aproximadamente 1,0 µl a aproximadamente 150 µl, preferiblemente de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 100 µl.

La invención se apreciará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

10 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a efectos de ilustración como ilustraciones de aspectos individuales de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la anterior descripción y de los dibujos adjuntos.

15 Ejemplo 1: Visualización del vítreo en cromóforo etiquetado con HA

Se generó una proteína de unión a HA enlazada a FITC de la siguiente manera.

20 Expresión y purificación:

Se expresó transitoriamente un péptido de unión a HA (proteína 6 en la Tabla 1) en células HEK293F usando polietilimina (PEI) como agente de transfección con una relación de 1:3 de ADN plasmídico a PEI y cultivado durante cinco días a 37 °C con 5 % de CO₂. El cultivo se recogió y el sobrenadante se filtró. El medio acondicionado se cargó en una columna de resina de níquel, se lavó con tampón de fosfato de 50 mM que contenía 20 mM de imidazol, 500 mM de cloruro de sodio, pH 8 para eliminar las proteínas no unidas y el gradiente se eluyó con tampón de fosfato de 50 mM que contenía 500 mM de imidazol, 500 mM de cloruro de sodio, pH 8.

La Proteína 6 purificada se etiquetó específicamente en el sitio con isotiocianato de fluoresceína en el extremo N usando una reacción mediada por Sortase-A (véase Mao y col., 2004, J Am Chem Soc., 10 de marzo; 126(9):2670-1). El fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína) - péptido de unión a HA conjugado se purificó hasta lograr una homogeneidad aparente usando resinas estándar de modo mixto y de intercambio iónico. Específicamente, la proteína 6 se intercambió por tampón de etiquetado Sortase (50 mM Tris-HCl, 150 mM cloruro sódico, 10 mM CaCl₂, pH 7,5). La mezcla de reacción en el tampón de etiquetado Sortase contenía 50 µM de Proteína 6, 2 mM de FITC-LPETGGG (sintetizado por GeneScript) y ~150 µM de Sortase A inmovilizado en agarosa en el tampón de etiquetado Sortase. La mezcla de reacción se incubó a 23 °C durante 24 horas con agitación. El sortase A inmovilizado se separó usando un filtro de 0,2 µm. El pH del flujo que contiene la Proteína 6 etiquetada y no etiquetada se incrementó a pH 9 con 1 M Tris-HCl, pH 9,5. La muestra se cargó luego en una columna CaptoAdhere de 5 ml, se lavó con PBS, pH 7,4 y se eluyó con un gradiente de 100 mM de tampón de citrato, pH 3. Las fracciones eluidas se neutralizaron con 1/10 de volumen de 1 M Tris-HCl, pH 9,5. Las fracciones se ejecutaron en gel de SDS-PAGE y se tomaron imágenes en modo de fluorescencia. La proteína final etiquetada se intercambió con tampón en PBS, pH 7,4.

Animales y régimen de tratamiento

Los animales utilizados en este ejemplo fueron conejos macho/New Zealand White x New Zealand Red. El régimen de tratamiento utilizado se muestra en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

N.º de grupo	Artículo de prueba (dosis)	Régimen de dosificación		
		Animales por grupo	Volumen/inyección (µL) ^a	Dosis totales
1	2,5 µg total proteína/inyección de FITC-PROTEÍNA 6	3	50	1
2	5 µg total proteína/inyección de FITC-PROTEÍNA 6	3	50	1

^a administrado por inyección intravítrea, OU (ambos ojos)

Las evaluaciones del estudio y la frecuencia se describen en la Tabla 3.

Tabla 3

Evaluaciones	Frecuencia
--------------	------------

Observaciones clínicas	Preselección
Control de Morbilidad/Mortalidad	Días de estudio 1, 2 y 3
Pesos corporales	Preselección
Inyecciones IVT OU	Día de estudio 1
Imágenes de gran angular	Preselección, después de la inyección, 16 h, 24 h, aproximadamente 48 h y aproximadamente 72 h
Fluorofotometría	Preselección, después de la inyección, 16 h, 24 h, aproximadamente 48 h y aproximadamente 72 h
OU = ambos ojos	

Retina de Heidelberg e imágenes vítreas:

5 Se usó BluePeak™ no invasivo - Modo de imagen de autofluorescencia con láser azul en Spectralis® de Heidelberg Engineering, Inc. para obtener fotografías de gran angular de cámara vítrea/retina. Se usó una lente de contacto de ángulo ancho (lente de contacto Staurengi 150°) con un gel de transmisión de metilcelulosa en contacto con la córnea para ayudar a la visualización del segmento posterior del ojo. El párpado se retrajo; la lente de contacto fue colocada en la córnea y posicionada frente a la cámara por un técnico capacitado.

10 Fluorofotometría

15 La fluorofotometría mide la concentración de un compuesto fluorescente, generalmente fluoresceína, a lo largo del eje óptico del ojo desde la película lagrimal hasta la retina. Los párpados se retrajeron y el animal fue colocado frente al Fluorotron Master por un técnico capacitado. El contenido de fluoresceína se cuantificó luego por el fluorofotómetro sin hacer contacto con el ojo. Se realizaron dos o tres exploraciones para cada ojo en cada punto de tiempo. El promedio de estas exploraciones individuales repetidas para cada ojo en cada punto de tiempo se utilizó para análisis adicionales.

20 Inyección intravítrea

25 Se usó un microscopio quirúrgico para visualizar el segmento posterior del ojo durante el procedimiento. El párpado se retrajo con un espéculo de alambre. El globo fue inmovilizado utilizando pinzas oculares. Se pasó una aguja de calibre 30 unida a una jeringa estéril, que contenía el artículo de prueba, a través de la esclerótica de 3 a 5 mm posterior al limbo temporal y en ángulo posterior para evitar la lente. La ubicación objetivo de la inyección fue la región temporal superior.

El cuidado de los animales, incluido el tratamiento del dolor, cumplía con los requisitos generales del bienestar animal.

30 Resultados:

Visualización microscópica (microscopio quirúrgico)

35 El artículo de ensayo se observó en el vítreo de los animales mediante visualización microscópica inmediatamente después de la inyección en ambas dosis (2 y 5 µg). El color resultó evidente bajo la iluminación estándar del microscopio quirúrgico sin necesidad de filtros de excitación o emisión. No se realizó visualización microscópica en otros puntos temporales.

Retina de Heidelberg e imágenes vítreas:

40 Las imágenes del punto de referencia no mostraron ninguna evidencia de fluorescencia. Después de la inyección IVT, el artículo de ensayo de ambos grupos de dosis se difundió en el vítreo, tal como se ve en las imágenes de gran angular de la cámara vítrea. Se observó una pequeña área de fluorescencia cerca del lugar de la inyección después de la inyección para ambos grupos de dosis. A las 16 horas, el artículo de ensayo se había dispersado aún más con la dosis de 5 µg en los ojos (Grupo 2, Figura 4B), mostrando una fluorescencia relativamente más alta que la dosis de 2,5 µg en los ojos (Grupo 1, Figura 4A). El artículo de ensayo continuó siendo visible a través del vítreo a las 24, 48 y 45 72 horas en ambos grupos de dosis (véanse las Figuras 5-7, respectivamente) con un desvanecimiento de la intensidad después de 24 horas. Tal como se esperaba, el grupo de dosis altas de 5 µg demostró una fluorescencia más alta que la dosis más baja de 2,5 µg (véanse las Figuras 4-7).

50 Fluorofotometría:

El fluorofotómetro mide la fluorescencia del tejido ocular en una exploración lineal a lo largo del eje óptico del ojo. Una inyección vítrea de fluoresceína no se puede detectar hasta que la fluoresceína entra en el eje óptico del ojo.

Para el grupo de dosis de 2,5 µg, la fluorescencia del artículo de ensayo se observó por primera vez 16 h después de la inyección en la cavidad vítrea (Figura 4A y Figura 1). La fluorescencia relativa en el vítreo también fue más alta en este momento. La fluorescencia relativa en el vítreo fue similar en el punto de tiempo de 24 horas (Figura 5A y Figura 1), con disminuciones observadas a las 48 horas (Figura 6A y Figura 1) y nuevamente a las 72 horas (Figura 7A y Figura 1). No se observó ningún cambio evidente en el nivel de fluorescencia en el segmento anterior del ojo (desde la córnea hasta el cristalino).

Para el grupo de dosis de 5 µg, se detectó fluorescencia relativa en el vítreo después de la inyección, sin embargo, no se dispersó uniformemente en ese momento. A las 16 h, la fluorescencia se dispersó mejor en el vítreo (Figura 4B y Figura 2). Se observó una tendencia similar de la difusión del artículo de ensayo, tal como se observó con el grupo de dosis de 2,5 µg después del grupo de dosis de dosis altas de 5 µg, excepto que la fluorescencia fue relativamente mayor que en el grupo de 2,5 µg. Además, no se observó ningún cambio evidente en el nivel de fluorescencia en el segmento anterior del ojo (desde la córnea hasta el cristalino).

Resumen:

La proteína de unión a hialuronano conjugada con cromóforos, FITC-Proteína 6, una proteína glicosilada, se inyectó en el vítreo y se observó mediante imágenes de gran angular y fluorofotometría inmediatamente después de la inyección (solo para el grupo de dosis de 5 µg con fluorofotometría), y a 16 horas, 24 horas, aproximadamente 48 horas y aproximadamente 72 horas después de la inyección (véase la Figura 4A, la Figura 5A, la Figura 6A, la Figura 7A, respectivamente para la dosis de 2,5 µg, y véase la Figura 4B, la Figura 5B, Figura 6B, Figura 7B, respectivamente para la dosis de 5 µg). La difusión vítrea completa del artículo de ensayo resultó evidente tras la observación a las 16 h después de la inyección para ambos grupos de dosis. Tal como se esperaba, el grupo de dosis altas de 5 µg demostró una mayor fluorescencia en el vítreo que la dosis más baja de 2,5 µg. No se observaron cambios obvios en el nivel de fluorescencia en el segmento anterior del ojo (desde la córnea hasta el cristalino). Este estudio demostró que la FITC-Proteína 6, se difundió en el vítreo y también demostró la posibilidad de visualizar el vítreo durante la cirugía de vitrectomía.

Ejemplo 2: Cirugía ocular

La composición de la invención se coloca en una formulación adecuada para inyección intravítrea (es decir, con el pH apropiado, la osmolaridad, el bajo nivel de endotoxinas, etc., que es habitualmente alcanzable por los expertos en la materia de la formulación de fármacos para inyección intravítrea y demostrada en los estudios de investigación piloto previamente mencionados en ojos de conejo). Algunas horas antes de la cirugía o incluso de uno a tres días antes de la cirugía, la formulación que contenía la composición se inyectó en el vítreo. El volumen de la dosis estaría en el rango de 1 microlitro a 100 microlitros. Como es habitual en las inyecciones intravítreas, el lugar de la inyección se sitúa en unos pocos mm posteriores al limbo, de modo que la aguja entra en el ojo por la pars plana. La composición de delineación vítrea de la invención se inyecta a aproximadamente 5-10 mm de profundidad en el vítreo.

Como se demostró en los estudios piloto del Ejemplo 1 anterior, la composición se difunde a través del vítreo en cuestión de horas, de modo que a las 16 horas (y quizás mucho antes en los ojos de los humanos de mayor edad con sinéresis vítrea) existe una concentración relativamente uniforme de la composición en toda la cavidad vítrea. Tal como se muestra en el Ejemplo 1, esta difusión y dispersión de la composición en todo el vítreo no requiere ninguna manipulación especial del ojo; se espera que ocurra en el curso de la actividad normal y el movimiento normal del ojo de un paciente. Una vez que el gel vítreo es coloreado o fluorescente, el ojo está listo para un procedimiento quirúrgico. El vítreo se vuelve visible por el propio cromóforo a la luz blanca del microscopio quirúrgico o, de manera alternativa, se vuelve fluorescente cada vez que el cirujano activa una luz estándar o una luz láser con la longitud de onda (tono) apropiada para generar una señal detectable a partir de la composición.

Debido a que la composición se adhiere al ácido hialurónico, no se lavará durante el enjuague del vítreo con líquido como ocurre normalmente durante la cirugía de vitrectomía. En cambio, la composición mantendrá su unión al hialuronano, un componente esencial del vítreo. Como el cirujano elimina el vítreo con instrumentos quirúrgicos de manera estándar en tales procedimientos, las regiones del vítreo que aún no se han eliminado resultan fácilmente evidentes por el color o la fluorescencia de la composición de la invención, que puede observarse constantemente o siempre que la luz apropiada se encienda de manera transitoria durante el procedimiento. Debido a la gran diferencia en el contenido de hialuronano en el vítreo en comparación con la retina interna y especialmente en comparación con la membrana limitante interna de la retina, la composición de delineación vítrea de la invención delinea claramente la interfaz vitreoretiniana y, por lo tanto, permite al cirujano acercarse a la retina con instrumentos de vitrectomía solo cuando sea necesario para eliminar los últimos restos de vítreo.

La composición también facilita el reconocimiento del desprendimiento vítreo posterior debido al bajo contenido de hialuronano que presenta el líquido transparente entre el vítreo y la retina. La composición de delineación vítrea de la invención se une al hialuronano presente en el vítreo cortical posterior, distinguiendo así claramente un límite entre el vítreo cortical y el espacio del haloide posterior lleno de líquido. El límite del haloide está, por lo tanto, visiblemente delimitado por la composición de delineación vítrea unida al vítreo. Esto permite que el cirujano visualice con precisión

el haloide posterior y el vítreo durante el procedimiento, y que elimine completa y fácilmente el haloide posterior y el vítreo formado. La eliminación completa puede confirmarse cuando no queda ninguna composición de delineación vítrea en la superficie de la retina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en un ojo en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo sea visible para la corrección quirúrgica y la eliminación del vítreo para corregir quirúrgicamente un trastorno ocular.
- 10 2. Composición para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en el ojo de un mamífero, que comprende una formulación inyectable de un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un resto ópticamente detectable como agente de delineación vítrea en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo sea visible para el cirujano, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 a) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; o
- b) 95 aminoácidos consecutivos de la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.
- 20 3. Composición oftálmica para su uso en la visualización del vítreo mediante la inyección de la composición en el ojo de un mamífero, que comprende un péptido de unión a hialuronano (HA) enlazado a un fragmento ópticamente detectable en una cantidad eficaz para hacer que el vítreo sea visible cuando se genera una señal por parte del resto detectable, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 a) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; o
- b) 95 aminoácidos consecutivos de la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.
- 30 4. La composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que el resto ópticamente detectable es luminiscente, fotoluminiscente, electroluminiscente, bioluminiscente, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente, o es un cromóforo.
- 35 5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el resto ópticamente detectable es un material quimiosensor fluorescente.
- 40 6. La composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde dicha composición comprende además un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.
- 45 7. La composición para el uso de la reivindicación 6, en donde dicho agente terapéutico es un agente antiinfeccioso, un agente inmunosupresor, un agente antiproliferativo, un agente antiangiogénico, un agente de curación de heridas, un agente cicatrizante o una combinación de los mismos.
8. La composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en donde dicha composición es inerte.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición se formula en la forma de una vesícula seleccionada del grupo que consiste en un liposoma y una microesfera.
- 50 10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha composición tiene una formulación seleccionada del grupo que consiste en una solución, una emulsión y una suspensión.
11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 para inyección antes de una vitrectomía o durante la misma.
- 55 12. Procedimiento de coloración del vítreo del ojo de un mamífero en el que se ha inyectado la composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende la aplicación de una fuente de energía al ojo para la generación de una señal por parte del resto detectable.
- 60 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la fuente de energía es una luz o un láser.
14. Procedimiento de monitorización de un analito en el vítreo del ojo de un mamífero en el que se ha inyectado la composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende la detección de una señal generada por parte del resto detectable.

FIG. 1

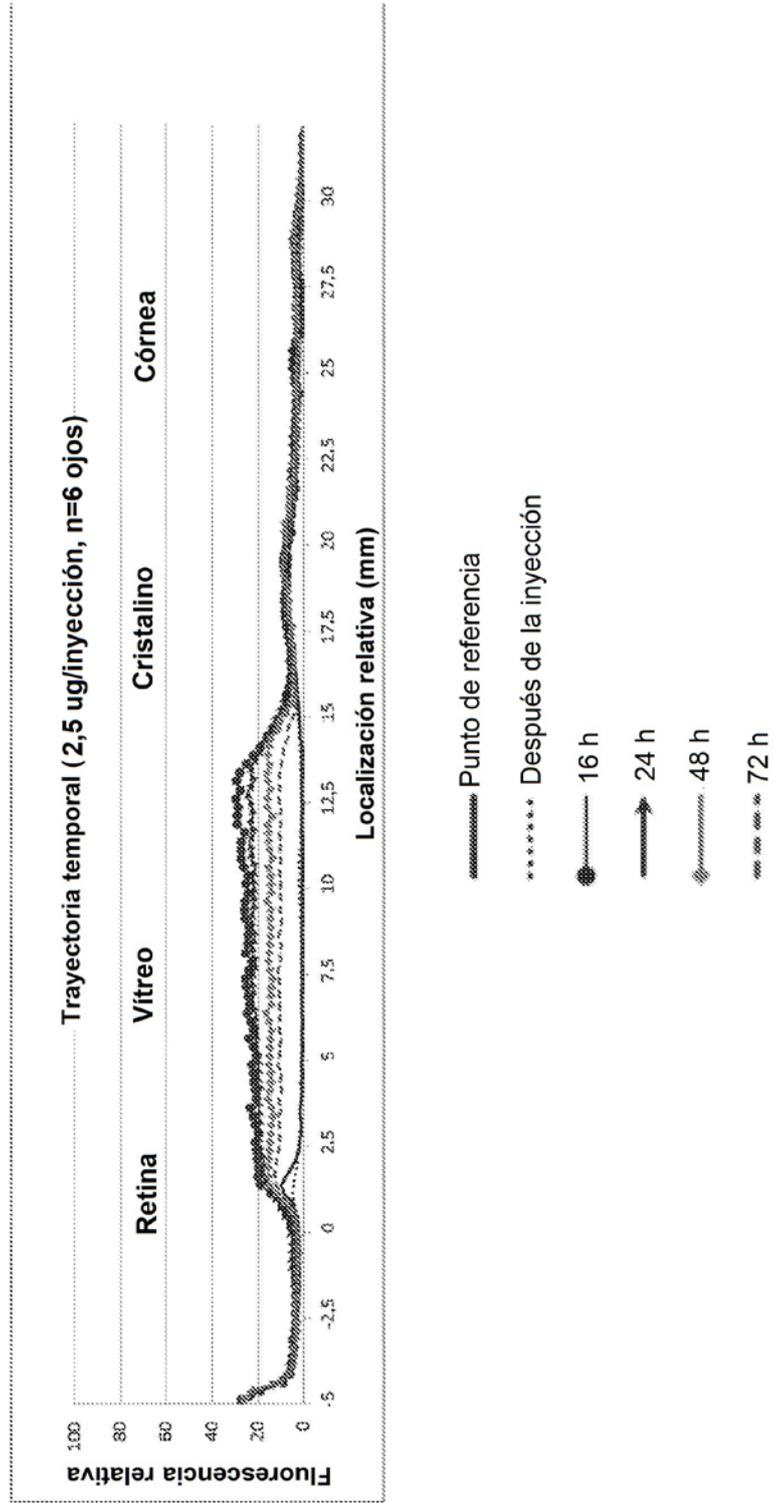


FIG. 2

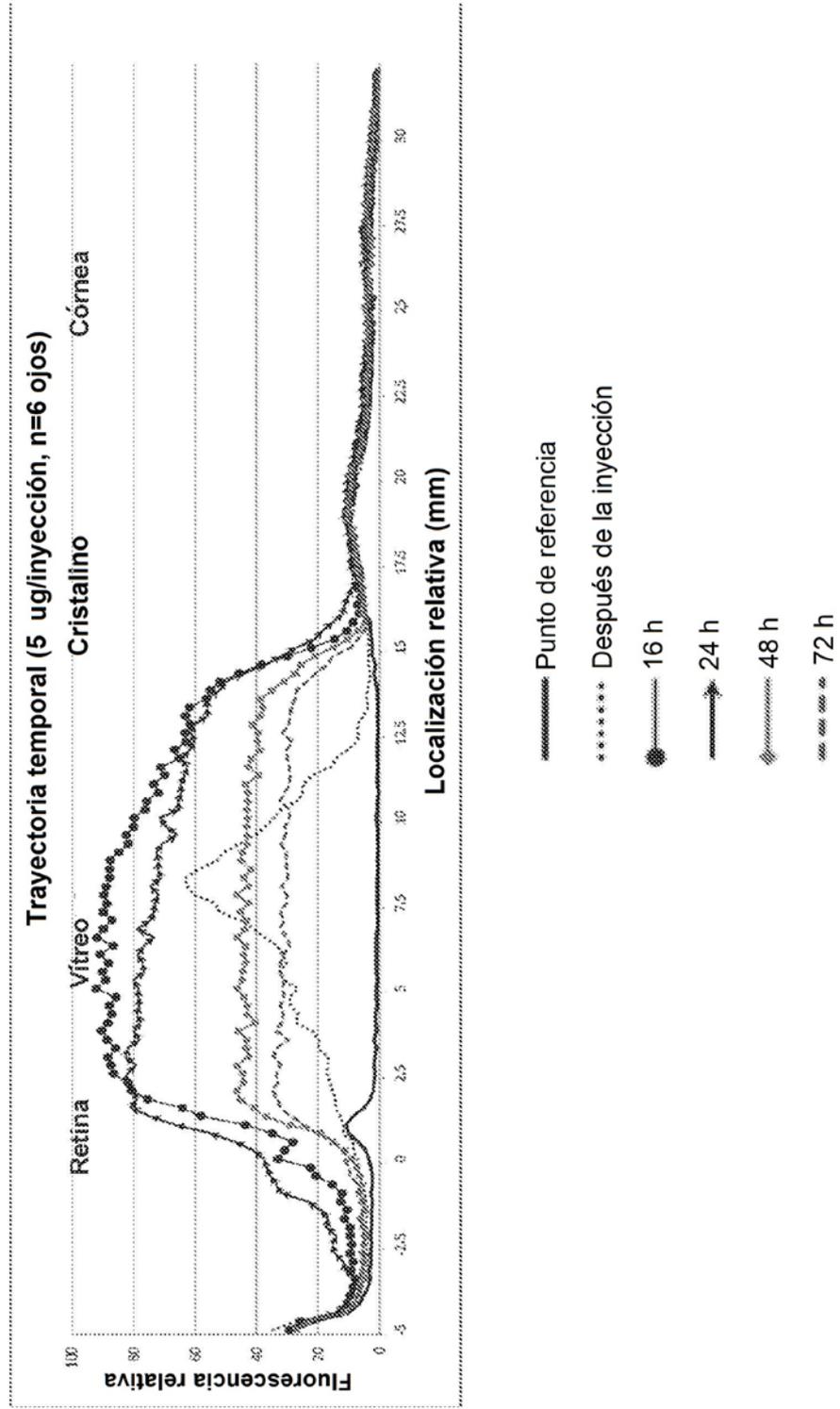


FIG. 5A

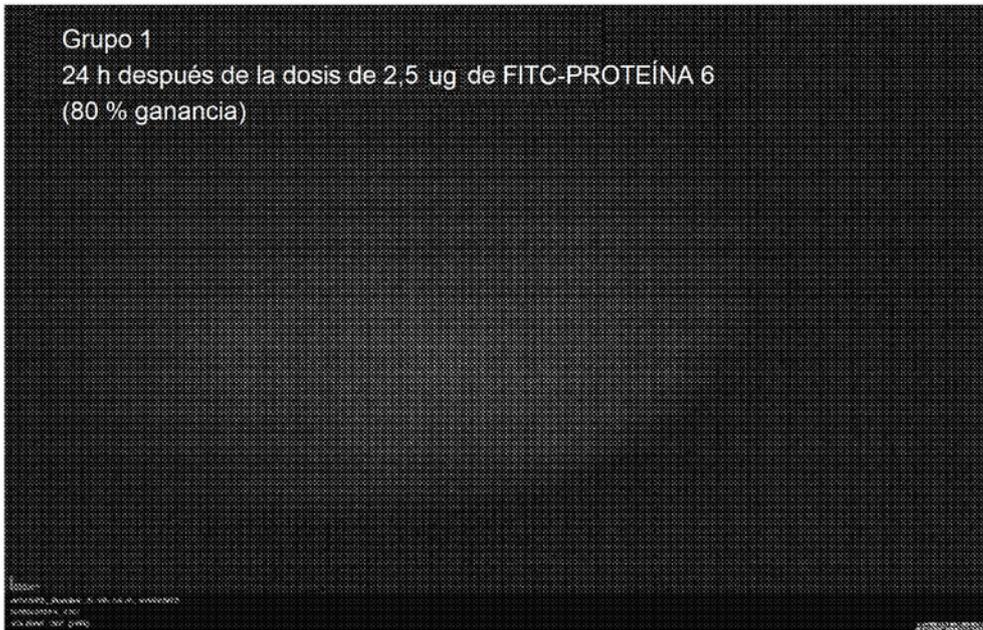


FIG. 5B

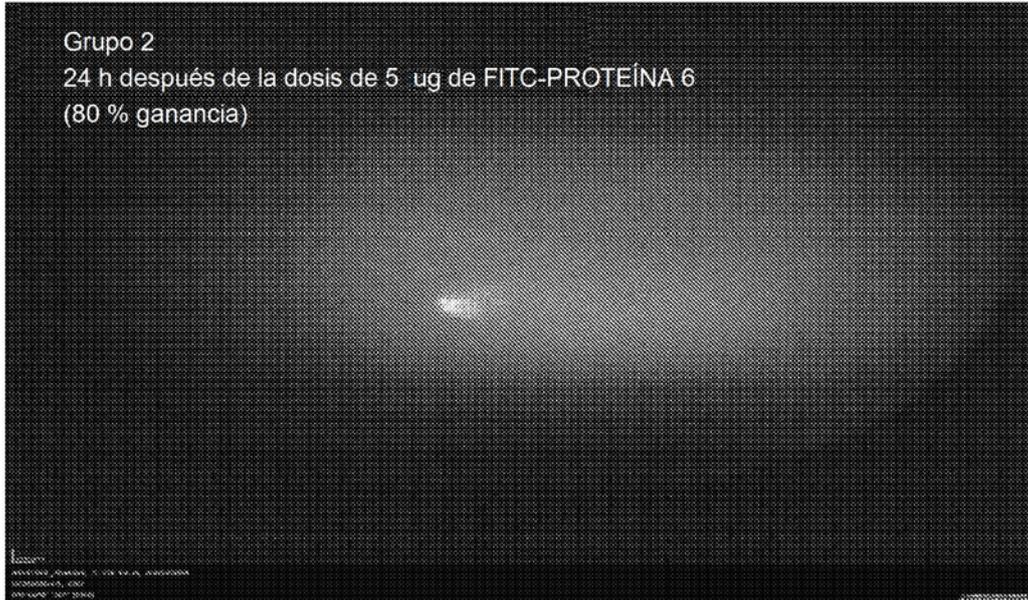


FIG. 6A

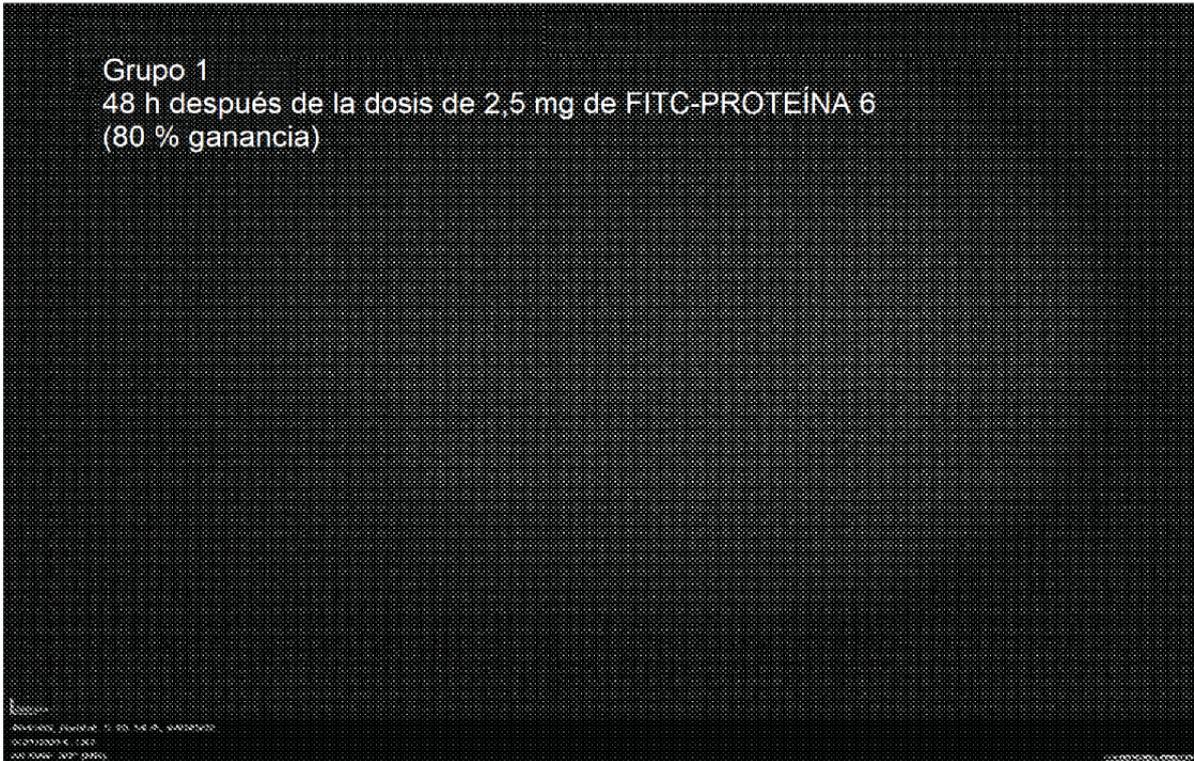


FIG. 6B

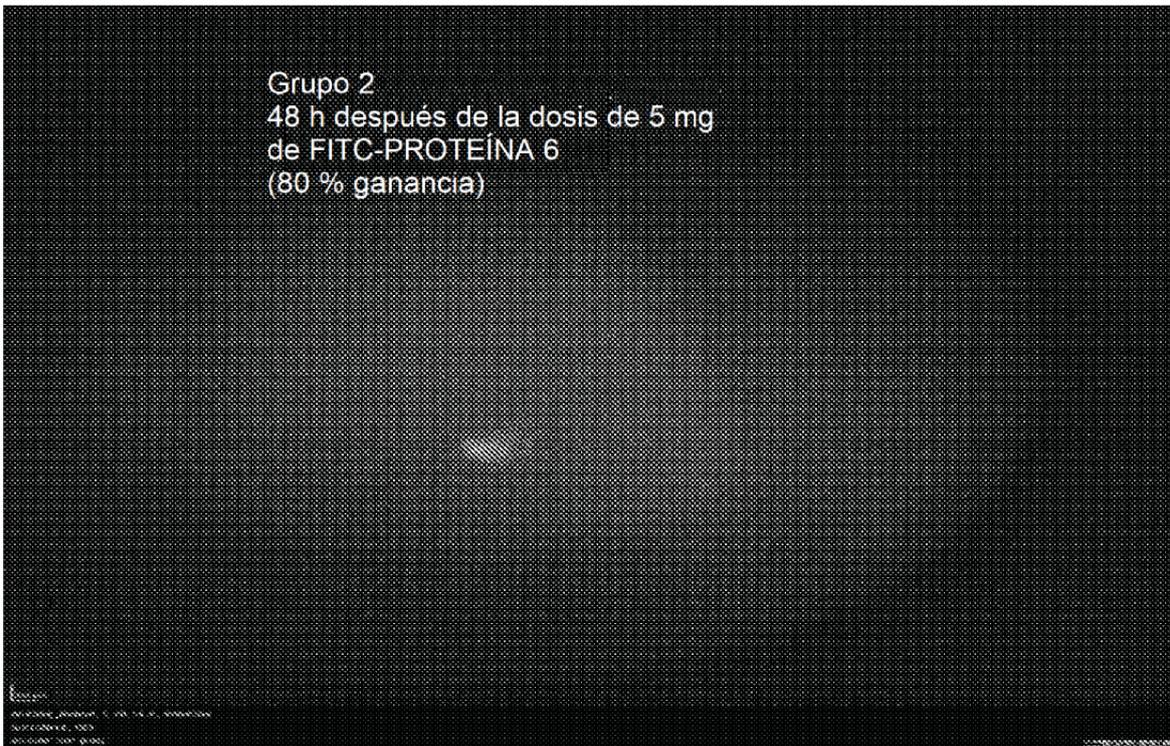


FIG. 7A

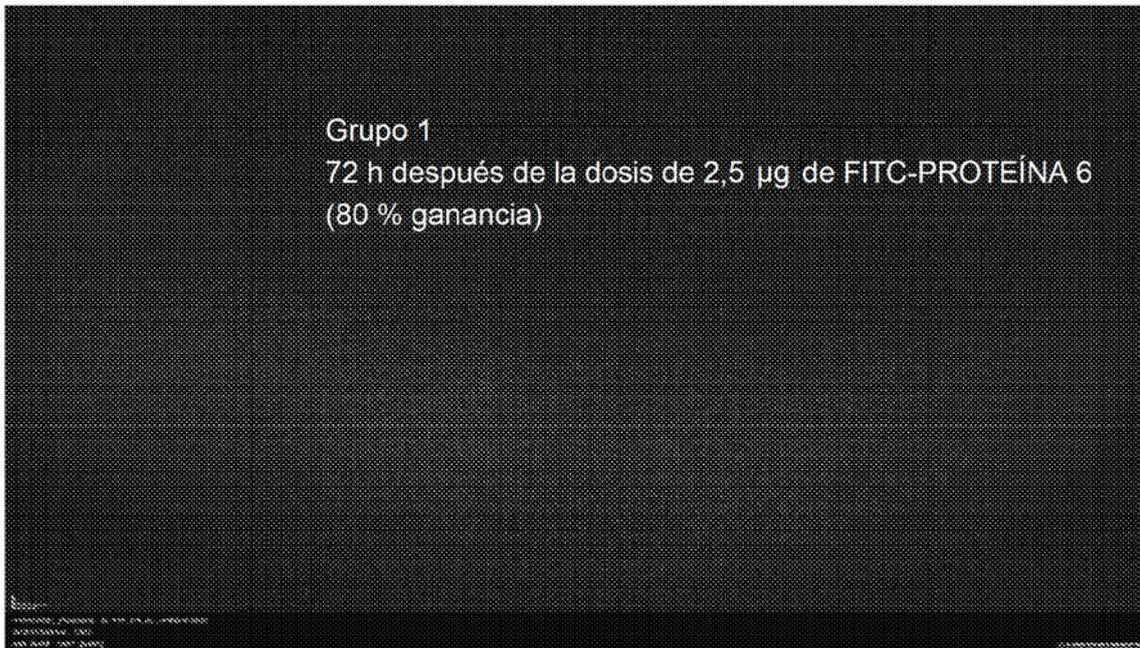


FIG. 7B

