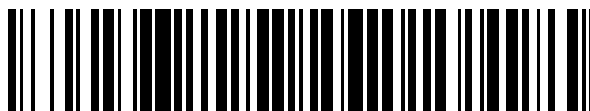


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 139**

51 Int. Cl.:

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A61K 31/568** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2009 PCT/US2009/043015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09137602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2009 E 09743588 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2276496**

54 Título: **Modulación terapéutica de la lubricación de la superficie ocular**

30 Prioridad:

**07.05.2008 US 5111208 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.03.2020**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)  
1111 Franklin Street, 5th Floor  
Oakland, CA 94607-5200, US y  
SCHEPENS EYE RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SULLIVAN, BENJAMIN;  
SCHMIDT, TANNIN, A. y  
SULLIVAN, DAVID, A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 748 139 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

Modulación terapéutica de la lubricación de la superficie ocular

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al mantenimiento de la lubricación ocular. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella.

**Antecedentes**

10 El gen de proteoglicano 4 (*prg4*) codifica proteínas muy glicosiladas denominadas factor estimulante de megacariocitos (MSF), lubricina, y proteína de zona superficial (SZP) (1). Estas moléculas se denominan en conjunto PRG4 o proteínas PRG4. PRG4 está presente en el líquido sinovial y en la superficie de la membrana sinovial (2), tendón (3), y menisco (4), y se sospecha que es un componente importante para las articulaciones sinoviales sanas. Véanse, p.ej., (5), (6).

15 En tejidos tales como las articulaciones sinoviales, los modos fisicoquímicos de lubricación se han clasificado como por película de líquido o límite. Los modos operativos de lubricación dependen de las fuerzas normales y tangenciales en los tejidos articulares, de la velocidad relativa del movimiento tangencial entre estas superficies, y del historial de tiempo tanto de carga como de movimiento. El coeficiente de fricción,  $\mu$ , proporciona una medida cuantitativa, y se define como la proporción de fuerza de fricción tangencial respecto de la fuerza normal. Un tipo de modo de lubricación mediado por líquido es el hidrostático. Al inicio de la carga y en general para una duración prolongada, el líquido intersticial del cartílago se presuriza, debido a la naturaleza bifásica del tejido; el líquido también puede verse forzado en las asperezas entre las superficies articulares a través de un mecanismo de exudación. El líquido intersticial presurizado y las mezclas de lubricante atrapadas, por lo tanto, pueden contribuir significativamente a soportar la carga normal con poca resistencia a la fuerza de cizalla, lo que facilita un  $\mu$  muy bajo. Además, al inicio de la carga y/o el movimiento, se dan los tipos de película por compresión, hidrodinámico, y elastohidrodinámico de lubricación por película de líquido, con la presurización, el movimiento, y la deformación actuando para dirigir el lubricante viscoso desde y/o a través del hueco entre dos superficies en movimiento relativo.

20 El grado relevante en el que ocurre la lubricación por presión/película de líquido frente a la lubricación límite depende clásicamente de varios factores (13). Cuando la película de lubricante puede fluir entre las superficies deslizantes adaptadas, que se pueden deformar elásticamente, se da la lubricación elastohidrodinámica. La presión, la rugosidad de la superficie, y la velocidad relativa de deslizamiento determinan cuándo empieza a fallar la lubricación del líquido completa y la lubricación entra en nuevos regímenes. A medida que la velocidad disminuye más, las películas lubricantes adherentes a las superficies articulares empiezan a contribuir, y se da un régimen mixto de lubricación. Si la velocidad disminuye aún más y sólo queda una capa lubricante ultra-fina compuesta por unas pocas moléculas, se da la lubricación límite. Un modo de lubricación límite se indica, por lo tanto, por un coeficiente de fricción (proporción de la fuerza de fricción medida entre dos superficies en contacto en movimiento relativo respecto de la fuerza normal aplicada) durante el deslizamiento estacionario invariable con factores que influyen en la formación de una película de líquido, tales como la velocidad relativa de deslizamiento y la carga axial (14). Para el cartílago articular, se ha concluido que es seguro que se da la lubricación límite, aunque complementada mediante la presurización del líquido y otros mecanismos (15-18).

30 En la lubricación límite, la carga se soporta por el contacto superficie-superficie, y las propiedades friccionales asociadas están determinadas por moléculas lubricantes de la superficie. Se ha propuesto que este modo es importante porque las capas de cartílago opuestas se ponen en contacto en un ~10% del área total, y aquí puede ser donde ocurre la mayor parte de la fricción (19). Además, con un tiempo de carga y disipación de la presión hidrostática crecientes, las superficies recubiertas de lubricante soportan una parte cada vez mayor de la carga respecto del líquido presurizado y, consecuentemente, este modo puede ser cada vez más dominante (13, 20). La lubricación límite, en esencia, mitiga el efecto de adherencia-deslizamiento (13), y por lo tanto se manifiesta como una resistencia disminuida tanto hacia el movimiento estacionario como hacia el inicio del movimiento. La última situación es relevante para superficies articulares que soportan carga después de una carga compresiva prolongada (por ejemplo, sentado o de pie *in vivo*) (21). Los patrones de deterioro típicos de las superficies de cartílago (22) también sugieren que la lubricación límite del cartílago articular es crucial para la protección y el mantenimiento de la estructura de la superficie articular.

40 Con un tiempo de carga y disipación de la presión hidrostática crecientes, las superficies recubiertas de lubricante soportan una parte cada vez mayor de la carga respecto al líquido presurizado y, consecuentemente,  $\mu$  puede estar dominado cada vez más por este modo de lubricación. Un modo de lubricación límite está indicado por valores de  $\mu$  durante el deslizamiento estacionario que son invariables con factores que influyen en la formación de una película de líquido, tal como la velocidad relativa de deslizamiento y la carga axial. La lubricación límite, en esencia, mitiga el efecto de adherencia-deslizamiento, y por lo tanto se manifiesta como una resistencia disminuida tanto al movimiento estacionario como al inicio del movimiento.

Actualmente se desconocen los mecanismos precisos de la lubricación límite en las interfases biológicas. Sin embargo, el proteoglicano 4 (PRG4) puede desempeñar un papel crucial como lubricante límite en las articulaciones. Se cree que esta glicoproteína secretada protege las superficies cartilaginosas frente a las fuerzas friccionales, la adhesión celular y la deposición de proteínas. Se han aislado y caracterizado varias proteínas e isoformas de lubricina nativas y recombinantes. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.326.558; 6.433.142; 7.030.223, y 7.361.738 describen una familia de factores estimuladores de megacariocitos (MSF) humanos y composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de dichos MSFs para tratar estados patológicos o trastornos, tales como una deficiencia de plaquetas. Las patentes de EE.UU. n°s 6.960.562 y 6.743.774 también describen un polipéptido lubricante, tribonectina, que comprende un fragmento sustancialmente puro de MSF, y métodos para lubricar articulaciones mediante la administración de tribonectina de manera sistémica o directamente en los tejidos.

Un desafío para la lubricación límite es la presencia de inflamación en los tejidos circundantes, así como los niveles incrementados de proteasas en el líquido sinovial. La pérdida de la capacidad de lubricación límite del líquido sinovial después de una lesión se asocia a daño en la matriz de cartilago articular. Esto se puede atribuir a procesos inflamatorios que son el resultado de la lesión, especialmente en las fases tempranas. Otro desafío para la lubricación límite es un desequilibrio de los esteroides sexuales, especialmente en trastornos artríticos tales como la artritis reumatoide. Los esteroides sexuales están implicados en la patogénesis y la regulación de la inflamación en la artritis reumatoide, una enfermedad caracterizada por sinovitis inflamatoria crónica. Los andrógenos inhiben, mientras los estrógenos estimulan, los procesos inflamatorios. Por lo tanto, los niveles relativos de andrógenos y estrógenos en el medio sinovial son extremadamente importantes en la determinación de la progresión de la inflamación (7, 8, 23). Diversos compuestos de andrógenos reducen la magnitud de la infiltración de linfocitos en el tejido lagrimal. Véanse, p.ej., los documentos de patentes de EE.UU. n°s 5.620.921; 5.688.765; 5.620.921; y 6.107.289.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona, en varias realizaciones, composiciones farmacéuticas para el uso en el mantenimiento de la lubricación ocular, que incluye la reposición y el enriquecimiento terapéuticos de moléculas de lubricación límite en la superficie ocular.

La presente invención proporciona el descubrimiento de que se expresa mRNA de PRG4 en las células epiteliales corneales y conjuntivales humanas, así como en las glándulas lagrimales y de Meibomio de ratón, lo que indica que la proteína PRG4 se presenta en estos tejidos en la superficie ocular. Además, la proteína PRG4 sirve para proteger la córnea y la conjuntiva contra las fuerzas de cizalla significativas generadas durante un parpadeo, el uso de lentes de contacto, y otras condiciones indeseables. El impacto de la película lagrimal, que incluye el impacto de la inflamación, las citocinas proinflamatorias, el desequilibrio de esteroides sexuales y las proteasas sobre la composición y la función de las películas, proporcionan un curso de terapia para los tejidos oculares que estimula la lubricación límite.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella para la aplicación tópica en una superficie ocular, que comprende un compuesto que induce PRG4 en combinación con una concentración terapéuticamente eficaz de PRG4. Los compuestos que inducen PRG4 usados en la presente invención son un andrógeno, un análogo de andrógeno, en el que dicho análogo de andrógeno se selecciona del grupo que consiste en 17 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-2-oxa-5 $\alpha$ -androstan-3-ona, 4,5 $\alpha$ -dihidrotosterona, y 19-nortestosterona, o un modulador selectivo de receptores de andrógenos. En ciertos casos de la presente invención se describe la observación de que la expresión de PRG4 en las células epiteliales corneales y conjuntivales se estimula mediante los compuestos que inducen PRG4, como se discutió anteriormente, y, por tanto, se proporciona una protección sinérgica de la córnea y la conjuntiva contra las fuerzas de cizalla significativas con PRG4.

Los análogos de andrógeno son 17 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-2-oxa-5 $\alpha$ -androstan-3-ona, 4,5 $\alpha$ -dihidrotosterona o 19-nortestosterona.

En ciertas realizaciones, los moduladores selectivos de receptores de andrógenos (SARMs) incluyen un compuesto de aril-propionamida, tal como S-3-(4-acetilamino-fenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S-4], o S-3-(4-fluorofenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S-1].

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso en la presente invención comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas, en el intervalo de alrededor del 0,0001-0,1% p/v, en combinación con una concentración terapéuticamente eficaz de PRG4 en el intervalo de 100-300  $\mu$ g/mL. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso en la presente invención comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de uno o más ácidos hialurónicos o sales de los mismos, en el intervalo de alrededor de 10-100.000  $\mu$ g/mL. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso en la presente invención comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de uno o más fosfolípidos tensioactivos, tales como L- $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiélna (Sp), lípidos neutros o polares, en el intervalo de alrededor de 10-10.000  $\mu$ g/mL. La presente invención proporciona que las combinaciones de un compuesto que

induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas y PRG4, y otros moduladores o moléculas de lubricación límite, permiten el transporte directo de PRG4 y otras moléculas de lubricación límite a las células de la superficie ocular, en donde PRG4 y las moléculas de lubricación límite tienden a agregarse, y proporcionan un vehículo farmacéuticamente eficaz a la córnea y la conjuntiva para una modulación eficaz de la lubricación límite.

5 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para el uso como se describe en la presente memoria comprenden un agente incrementador del tiempo de permanencia que incrementa el tiempo de permanencia del compuesto que induce PRG4 en la superficie ocular. En ciertas realizaciones, el agente incrementador del tiempo de permanencia está presente en una cantidad que, cuando se administra la composición farmacéutica en la superficie de un ojo de un individuo, se conserva una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4  
10 descrito en la presente memoria en la superficie del ojo. En ciertas realizaciones, el agente incrementador del tiempo de permanencia se selecciona y/o está presente en una cantidad de forma que la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que induce PRG4 se conserva en la superficie del ojo durante cualquier periodo de tiempo terapéuticamente eficaz, al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, o más. En ciertas realizaciones, los agentes incrementadores del tiempo de permanencia o mucoadhesivos oftálmicamente aceptables pueden incluir, a modo de ejemplo no limitante, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), poliacarbofilo, poli(óxido de etileno), copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato sódico, dextrano, o combinaciones de los mismos. La presente invención abarca cualquier polímero de peso molecular elevado que incremente el tiempo que el compuesto que induce PRG4 sigue estando en la superficie del ojo.

La composición farmacéutica para el uso en la presente invención puede comprender además uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, excipiente oftálmicamente aceptable, astringente oftálmicamente aceptable, vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, y emoliente oftálmicamente aceptable.

25 Los demulcentes oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados para el uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, carboximetilcelulosa sódica (p.ej., alrededor del 0,2 al 2,5% p/v), hidroxietil celulosa (p.ej., alrededor del 0,2 al 2,5% p/v), hipromelosa (p.ej., alrededor del 0,2 al 2,5% p/v), metilcelulosa (p.ej., alrededor del 0,2 al 2,5% p/v), dextrano 70 (p.ej., alrededor del 0,1% p/v), gelatina (p.ej., alrededor del 0,01% p/v), glicerina (p.ej., alrededor del 0,2 al 1% p/v), polietilén glicol 300 (p.ej., alrededor del 0,2 al 1% p/v), polietilén glicol 400 (p.ej., alrededor del 0,2 al 1% p/v), polisorbato 80 (p.ej., alrededor del 0,2 al 1% p/v), propilén glicol (p.ej., alrededor del 0,2 al 1% p/v), poli(alcohol vinílico) (p.ej., alrededor del 0,1 al 4% p/v), povidona (p.ej., alrededor del 0,1 al 2% p/v). Los excipientes/emolientes oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados en la presente invención incluyen, pero sin limitación, lanolina anhidra (p.ej., alrededor del 1 al 10% p/v), lanolina (p.ej., alrededor del 1 al 10% p/v), aceite mineral ligero (p.ej., ≤ alrededor del 50% p/v), aceite mineral (p.ej., ≤ alrededor del 50% p/v), parafina (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v), petrolato (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), pomada blanca (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), petrolato blanco (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), cera blanca (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v), cera amarilla (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v). Un astringente oftálmicamente aceptable ejemplar contemplado en la presente invención incluye, pero sin limitación, sulfato de zinc (p.ej., alrededor del 0,25% p/v). Los vasoconstrictores oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados en la presente invención incluyen, pero sin limitación, hidrocloreto de efedrina (p.ej., alrededor del 0,123% p/v), hidrocloreto de nafazolina (p.ej., alrededor del 0,01 a alrededor del 0,03% p/v), hidrocloreto de fenilefrina (p.ej., alrededor del 0,08 a alrededor del 0,2% p/v), e hidrocloreto de tetrahidrozolina (p.ej., alrededor del 0,01 a alrededor del 0,05% p/v).

45 En algunas de estas realizaciones, los demulcentes, excipientes, astringentes, vasoconstrictores, emolientes y electrolitos proporcionan un medio para administrar el compuesto que induce PRG4 y la proteína PRG4 de una manera oftálmicamente aceptable. Las composiciones oftálmicamente aceptables son adecuadas para la aplicación tópica en la superficie ocular si carecen de una toxicidad ocular inaceptable, ardor, picor, viscosidad, visión borrosa, etc. tras la aplicación.

50 La presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella para la aplicación tópica en una superficie ocular que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 y una proteína PRG4 suspendidos en una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende electrolitos lagrimales, que incluyen, pero sin limitación, cloruro sódico (p.ej., alrededor del 44%-54% de fracción molar), cloruro potásico (p.ej., alrededor del 8%-14% de fracción molar), bicarbonato sódico (p.ej., alrededor del 8%-18% de fracción molar), bicarbonato potásico (p.ej., alrededor del 0%-4% de fracción molar), cloruro cálcico (p.ej., alrededor del 0%-4% de fracción molar), cloruro magnésico (p.ej., alrededor del 0%-4% de fracción molar), citrato trisódico (p.ej., alrededor del 0%-4% de fracción molar), ácido clorhídrico (p.ej., alrededor del 0%-20% de fracción molar) o hidróxido sódico (p.ej., alrededor del 0%-20% de fracción molar). En una realización, el vehículo se podría formular para generar una disolución acuosa de electrolitos en el intervalo 150-200 mM.

60 La presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella para la aplicación tópica en una superficie ocular, que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 y PRG4 suspendido en una

5 disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende al menos tres electrolitos, que incluyen, pero sin limitación, cloruro sódico (NaCl) 0,64%, cloruro potásico (KCl) 0,075%, cloruro cálcico dihidrato ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,048%, cloruro magnésico hexahidrato ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,03%, acetato sódico trihidrato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 0,39%, citrato sódico dihidrato ( $\text{C}_6\text{HSNa}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,17%, hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,5) con una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/L.

10 La presente descripción se refiere a una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella para la aplicación tópica en una superficie ocular, que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 y PRG4 suspendidos en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, compuesta de sodio ( $\text{Na}^+$ ) aproximadamente 128 mM, potasio ( $\text{K}^+$ ) aproximadamente 24 mM, cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) aproximadamente 113 mM, calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aproximadamente 0,4 mM, magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) aproximadamente 0,3 mM,  $\text{HCO}_3^-$  aproximadamente 5 mM, citrato aproximadamente 1 mM, fosfato aproximadamente 14 mM, acetato aproximadamente 15 mM, e hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,5) con una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/L.

15 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar la deficiencia de lubricación ocular, o los síntomas asociados a ella, en un individuo que lo necesita. El método comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular del individuo que lo necesita cualquier composición farmacéutica descrita en la presente memoria. La composición farmacéutica es una que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 usado en la presente invención y una proteína PRG4. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica, p.ej. una que comprende el compuesto que induce PRG4 y la proteína PRG4, se administra en combinación con una formulación oftálmicamente aceptable que comprende uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, excipiente oftálmicamente aceptable, astringente oftálmicamente aceptable, vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, y emoliente oftálmicamente aceptable.

20 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas y un agente mucoadhesivo oftálmicamente aceptable y la proteína PRG4, se administra en combinación con una disolución oftálmicamente aceptable que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de hialuronato sódico o ácido hialurónico, o un fosfolípido tensioactivo, como se discutió anteriormente. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el compuesto que induce PRG4 y la proteína PRG4 se administra en combinación con una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende uno o más electrolitos, como se discutió anteriormente.

25 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar una deficiencia de la lubricación ocular o los síntomas asociados a ella (p.ej., ojo seco), debido a la pérdida lagrimal o a una película lagrimal inestable en la curva del borde ocular, tal como deficiencia de andrógenos, síndrome de Sjögren y queratoconjuntivitis seca (QCS). Tal método comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular de un individuo que lo necesita la composición farmacéutica usada en la presente invención.

30 La descripción se refiere además a una composición farmacéutica para el uso en un método para abordar y tratar las afecciones asociadas a la lubricación ocular, que incluyen una lubricación ocular desfavorable o deficiente. Las afecciones ejemplares incluyen, pero sin limitación, enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de Meibomio, terapia de sustitución de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, tiempo reducido de ruptura de la película lagrimal, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles de proteasas incrementados en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento.

35 La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica para el uso en un método para inducir localmente PRG4 en una superficie ocular, que comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular de un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición farmacéutica descrita en la presente memoria, p.ej., una composición que comprende un compuesto que induce PRG4 y PRG4 y un agente mucoadhesivo oftálmicamente aceptable. En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método para inducir localmente PRG4 en una superficie ocular, que comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular de un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier composición farmacéutica descrita en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 que se conserva en la superficie ocular durante un periodo de tiempo terapéuticamente eficaz.

#### 40 Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 representa bucles de retroalimentación en la lubricación límite de la superficie ocular.

La Figura 2 ilustra la expresión de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas. Se aislaron células epiteliales corneales humanas de los bordes corneoesclerales de hombres y mujeres donantes. Las muestras amplificadas se cribaron con respecto a la presencia de los productos de PRG4 mediante el uso de un bioanalizador

Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: L. Escalera de PM; 1. Control sin molde; 2. Tejido corneal de una mujer de 33 años; 4. Células epiteliales corneales cultivadas de una mujer de 70 años; 6. Células epiteliales corneales cultivadas de un hombre de 53 años;

5 La Figura 3 ilustra la expresión de mRNA de PRG4 en células epiteliales conjuntivales humanas. Se aislaron células epiteliales corneales humanas de los bordes corneoesclerales de hombres y mujeres donantes. Las muestras amplificadas se cribaron con respecto a la presencia de productos de PRG4 mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa. Los carriles verticales contienen: 1. Escalera de PM; 2. Control sin molde; 4. Conjuntiva de mujer; 5. Conjuntiva de hombre.

10 La Figura 4 ilustra la expresión de mRNA de PRG4 en muestras de citología de impresión conjuntival humana. Las muestras de citología de impresión conjuntival se aislaron de hombres y mujeres donantes. Las muestras amplificadas se cribaron con respecto a la presencia de los productos de PRG4 mediante el uso de un bioanalizador Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: L. Escalera de PM; 1-9. Muestras de citología de impresión conjuntival; 10. Repetición de las células epiteliales conjuntivales humanas (Carril 4 de la Figura 3).

15 La Figura 5 ilustra la expresión de mRNA de PRG4 en muestras de tejido humano del borde corneoescleral. L. Se aislaron células epiteliales corneales humanas de los bordes corneoesclerales de hombres y mujeres donantes. Las muestras amplificadas se cribaron con respecto a la presencia de los productos de PRG4 mediante el uso de un bioanalizador Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: Escalera de PM; 1. Patrón de cADN de hígado humano; 2. Tejido del borde corneoescleral de una mujer de 24 años; 3. Tejido del borde corneoescleral de una mujer de 51 años; 4. Células epiteliales conjuntivales humanas

20 La Figura 6 ilustra la evolución a lo largo del tiempo del incremento relativo de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales primarias bajo la influencia de dihidrotestosterona 10 nM. Las células se cultivaron en medios de queratinocitos sin suero hasta que alcanzaron una confluencia de alrededor del 80%. Las células (n = 3 pocillos/tratamiento/experimento) se incubaron después con vehículo o dihidrotestosterona (DHT) 10 nM durante hasta 5 días. A los tiempos designados se procesaron las células para el aislamiento del ARN total y el análisis del mRNA de PRG4 mediante RT-PCR. Los resultados muestran que DHT induce un incremento notable de los niveles de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas primarias. Este efecto de los andrógenos, respecto de los niveles de control en el Día 0, se hicieron prominentes después de 3 (incremento de 10,3 veces), 4 (incremento de 3,6 veces) y 5 (incremento de 2,8 veces) días de exposición a la hormona. Esta influencia de DHT sobre la expresión del mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas primarias se confirmó en otro experimento. El tratamiento de las células durante 5 días con DHT provocó un incremento de 46 veces en el contenido de mRNA de PRG4, respecto del de los controles tratados con vehículo.

### Descripción detallada de la invención

En ciertas realizaciones de la presente memoria se proporcionan composiciones para el uso en métodos para tratar la deficiencia de lubricación ocular (p.ej., deficiencia de lubricación límite ocular), o síntomas asociados a ella, en un individuo que lo necesita, que comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular del individuo una composición farmacéutica que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas en combinación con PRG4. En realizaciones adicionales, el compuesto que induce PRG4 está en combinación con un agente que incrementa el tiempo de permanencia oftálmicamente aceptable (p.ej., un agente que prolonga el periodo en el que el compuesto que induce PRG4 y/o PRG4 siguen estando terapéuticamente disponibles en el ojo). En realizaciones específicas de la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto que induce PRG4 y PRG4 para el uso como se describe en la presente memoria en una formulación oftálmicamente aceptable. En la presente memoria se describe una composición farmacéutica adecuada para la aplicación tópica en una superficie ocular que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 en combinación con PRG4 suspendidos en una disolución tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, y además puede estar en combinación con uno o más agentes o vehículos oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, un excipiente oftálmicamente aceptable, un astringente oftálmicamente aceptable, un vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, un emoliente oftálmicamente aceptable, ácido hialurónico, hialuronato sódico, y fosfolípidos tensioactivos para el uso como se describe en la presente memoria.

En ciertas realizaciones de la presente memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento de una deficiencia de la lubricación ocular en la superficie ocular (p.ej., una deficiencia de la lubricación límite ocular, disminuida o indeseable). Una composición farmacéutica para el uso en ciertas realizaciones de la presente descripción comprende un compuesto que induce PRG4 en combinación con una proteína PRG4 aislada o purificada suspendida en una disolución tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, y además puede estar en combinación con uno o más agentes oftálmicos seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmico, excipiente, astringente, vasoconstrictor, y emoliente. En ciertas realizaciones, cualquier composición farmacéutica para el uso como se describe en la presente memoria puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en hialuronato sódico, fosfolípidos tensioactivos, y electrolitos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración tópica.

La presente invención proporciona, en ciertas realizaciones, una composición farmacéutica para el tratamiento de la lubricación límite ocular disminuida estimulando la expresión de lubricante límite en la superficie ocular. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica estimula la producción de PRG4 mediante un compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En ciertos casos, la estimulación de la expresión de PRG4 se localiza de manera específica en la superficie ocular (actuando sobre el epitelio conjuntival y corneal, células caliciformes, etc.), y no requiere la modulación de otros tejidos oculares, tales como la glándula lagrimal o de Meibomio.

10 Tal como se usa en la presente memoria, un "compuesto que induce PRG4" o "inductor de PRG4" se refiere a un compuesto que incrementa la concentración de PRG4, p.ej., un compuesto que es capaz de estimular la expresión de PRG4, que estimula la biosíntesis de PRG4, que inhibe la degradación de PRG4, o similares. Los compuestos que inducen PRG4 usados en la presente invención son un andrógeno o análogo de andrógeno como se define en las reivindicaciones adjuntas, o un modulador selectivo de receptores de andrógenos.

El andrógeno o análogo de andrógeno se selecciona del grupo que consiste en una 17 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-2-oxa-5 $\alpha$ -androstan-3-ona, 4,5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, o 19-nortestosterona.

- 15 En otra realización preferida, los moduladores selectivos de receptores de andrógenos (SARMs) se seleccionan de un grupo que consiste en aril-propionamida (p.ej. S-3-(4-acetilamino-fenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S-4] o S-3-(4-fluorofenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S-1]).

20 Otra realización de la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente para el tratamiento de la lubricación límite ocular disminuida modulando la hiperosmolaridad en la superficie ocular. Interrumpiendo los mecanismos de retroalimentación que impiden que los componentes secretados reduzcan los coeficientes de fricción y mitiguen la tensión de cizalla, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la lubricación límite disminuida modulando la osmolaridad en la superficie ocular.

25 En otra realización, la presente invención también proporciona una composición terapéutica para el uso para tratar y aliviar las afecciones indeseables para la lubricación límite ocular compensando las alteraciones de la expresión de esteroides sexuales en la superficie ocular. Los andrógenos inhiben la aromatización en las células sinoviales cuando su concentración es lo suficientemente elevada. La testosterona antagoniza el efecto de IL-1 sobre la pérdida de proteoglicanos y la síntesis de proteoglicanos en el cartílago. La deshidroepiandrosterona, un precursor de andrógenos, disminuye la hinchazón de la articulación de la rodilla durante la artritis inducida por antígenos (AIA) aguda y crónica, así como los signos histológicos de inflamación y la destrucción de la articulación durante AIA crónica (9). Los andrógenos también parecen proteger el cartílago de la degradación inducida por la inflamación. Este hallazgo apoya un papel patógeno para el hipoandrogenismo en la artritis reumatoide, y sugiere que la sustitución de andrógenos a largo plazo puede ayudar a prevenir el daño articular y la discapacidad. Así, en una realización de la invención, los efectos proinflamatorios inducidos por citocinas en el desequilibrio de esteroides sexuales y la inflamación asociada en la superficie ocular se pueden contrarrestar mediante la administración de andrógenos.

35 Ciertas realizaciones de la presente descripción se refieren a composiciones terapéuticas para el uso para el tratamiento y el alivio de afecciones indeseables para la lubricación límite ocular, tales como inflamación crónica e hiperosmolaridad que resultan de la deficiencia de andrógenos, la terapia de sustitución de estrógenos, el uso de lentes de contacto, alergia, envejecimiento, enfermedades de la superficie ocular, y niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular. En una realización, la modulación de la regulación de PRG4 en la superficie ocular promueve condiciones favorables para la lubricación límite adecuada interrumpiendo el bucle de retroalimentación positiva central por medio de la reducción de la tensión de cizalla en la superficie ocular.

45 Se debería indicar que la importancia y el mecanismo de la lubricación límite ocular no se han reconocido hasta ahora en la comunidad oftálmica. Durante años, el consenso científico en la comunidad de investigación ortopédica fue que la lubricación hidrodinámica era con mucho el modo dominante de lubricación para el cartílago articular, y que la lubricación límite sólo era una idea adicional. Además, los investigadores que estudiaron la lubricación límite en las superficies del cartílago sugieren que la lubricación límite probablemente sólo es importante a "alta carga y baja velocidad", lo que es opuesto a las condiciones en la superficie ocular, donde existen cargas axiales relativamente bajas y velocidades de deslizamiento relativamente rápidas. Véase, p.ej., (10). Además, la lubricación límite que implica el glicocálix corneal no se ha considerado hasta ahora. Jay et al. comparó el factor lubricante purificado de líquido sinovial bovino con "glicoproteína mucinosa de saliva submandibular humana y lágrimas estimuladas", y concluyó que "la mucina secretada por la glándula lagrimal no lubricaba", pasando por alto la posibilidad de que el epitelio corneal fuera una fuente de lubricante o que la lubricación límite fuera un contribuyente importante en la superficie ocular. Véase, p.ej., (11). Los modelos matemáticos más recientes de dinámica de películas lagrimales también ignoran la posibilidad de la lubricación límite, reivindicando una "aproximación de lubricación" por la altura de la película lagrimal de manera que "puede considerarse que la capa mucosa de la córnea proporciona una superficie no deslizante para la película acuosa" y que "se debería indicar que el modelo sólo predice la evolución antes de que el grosor [de la película lagrimal] alcance un valor críticamente delgado, en el

que el modelo falla". Véase, p.ej., (12).

5 Existe la necesidad de mantener la lubricación ocular y proteger la córnea y la conjuntiva contra las fuerzas de cizalla significativas generadas por las afecciones indeseables descritas en la presente memoria, que incluyen, a modo de ejemplo no limitante, enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de Meibomio, terapia de sustitución de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, tiempo reducido de ruptura de la película lagrimal, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento.

10 En ciertos casos, la carga de la córnea y la conjuntiva está dominada probablemente por fuerzas de cizalla. En ciertos casos, el parpadeo, así como el uso de lentes de contacto, genera una tensión significativa en las células epiteliales de la superficie ocular, y esto es especialmente cierto en presencia de una película lagrimal comprometida. Como se muestra en la Figura 1, se sugiere que la tensión de cizalla incrementada conduce a la inestabilidad de la película lagrimal, una pérdida lagrimal evaporativa, hiperosmolaridad, cambios en la presión de hinchamiento y una elevación por retroalimentación en la tensión de cizalla. En ciertos casos, se cree que la tensión de cizalla incrementada también estimula la inflamación, la deficiencia de andrógenos y la expresión disminuida de proteoglicanos. En ciertos casos, la tensión de cizalla incrementada y sus secuelas pueden conducir, a lo largo del tiempo, a una pérdida de lubricación límite en la superficie ocular.

15 Se puede determinar una deficiencia de la lubricación ocular y los síntomas asociados a ella mediante cualquier método adecuado. En ciertos casos, una deficiencia de la lubricación ocular y los síntomas asociados a ella se definen de manera cualitativa (p.ej., una sensación de lubricación baja, ojo seco, molestias, etc.) o cuantitativamente (p.ej., medido a través de métodos mecánicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos u otro tipo de ensayos cuantitativos).

20 En ciertos casos, en los estados indeseables de lubricación límite ocular, tales como los que resultan de una enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de Meibomio, terapia de sustitución de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, tiempo reducido de ruptura de la película lagrimal, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad y envejecimiento, existirá una película lagrimal comprometida. En algunas de estas situaciones, la evaporación incrementada puede impedir una lubricación por película líquida eficaz, pero permite una lubricación límite y un mecanismo molecular protector para reducir la tensión de cizalla en la superficie celular. Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan que la regulación terapéutica, la reposición y el enriquecimiento de moléculas de lubricación límite en la superficie ocular interrumpirían el bucle de retroalimentación a través del cual las condiciones desfavorables asociadas con una deficiencia de lubricación ocular estimulan el malestar de la superficie ocular.

25 En ciertos casos, y como se proporciona en la presente memoria, la proteína PRG4 desempeña un papel crucial en el ojo como lubricante límite. En ciertos casos, esta glicoproteína secretada protege la superficie ocular para proteger la córnea y la conjuntiva contra las fuerzas de cizalla significativas generadas durante un parpadeo, el uso de lentes de contacto, y cualquier otra lubricación límite ocular indeseable provocada por inflamación crónica e hiperosmolaridad que resulta de una enfermedad de ojo seco, deficiencia de andrógenos, terapia de sustitución de estrógenos, alergia, envejecimiento, enfermedades de la superficie ocular, y niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular.

30 Cualquier composición farmacéutica usada en la presente descripción (p.ej., una composición que comprende un compuesto que induce PRG4 y una proteína PRG4 suspendida en una disolución tamponada con fosfato o una disolución equilibrada oftálmicamente aceptable) se aplica de manera tópica en la superficie ocular, en la que el compuesto que induce PRG4 estimula la expresión de la proteína PRG4 y la localización en la superficie ocular a la que está asociado PRG4, se une, y actúa como un receptor asociado a la superficie que permite interactuar con las proteínas endógenas y los proteoglicanos de la película lagrimal para establecer un mecanismo protector para reducir la fricción durante los parpadeos en la superficie ocular, previene la adsorción de proteínas en la superficie ocular, y reduce los puntos secos provocados por la inestabilidad de la película lagrimal.

35 En otra realización de la invención actual, cualquier composición farmacéutica para el uso como se describe en la presente memoria (p.ej., una composición que comprende un compuesto que induce PRG4 y una proteína PRG4) puede estar además en combinación con una o más construcciones de ácido hialurónico y fosfolípidos. En ciertos casos de esta realización, PRG4 actúa como receptor unido a la superficie que interacciona con el ácido hialurónico y/o los fosfolípidos suministrados de manera exógena para establecer el mecanismo protector para reducir la fricción durante los parpadeos en la superficie ocular, prevenir la adsorción de proteínas en la superficie ocular, y reducir los puntos secos provocados por la inestabilidad de la película lagrimal. En esta realización, las construcciones de ácido hialurónico y fosfolípidos se disocian del PRG4 durante un evento de cizalla. En otra realización más, la construcción completa se desprende durante el evento de cizalla para prevenir que la tensión de cizalla alcance el epitelio.

40 En otra realización más, los fragmentos funcionales, multímeros (p.ej., dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.), homólogos u ortólogos de PRG4 actúan como receptor de superficie y/o construcciones formadoras de gel en el



mecanismo de protección. Los fragmentos funcionales y los homólogos de PRG4 incluyen los que tienen menos repeticiones en el dominio central de repeticiones KEPAPTT similar a mucina, las formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína, variantes de corte y empalme, formas recombinantes, y similares. Un fragmento lubricante de PRG4 exhibe al menos un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% del efecto lubricante oftálmico de PRG4 humano, tal como se mide de manera cualitativa, mecánicamente, ópticamente, eléctricamente, o mediante ensayo bioquímico.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "PRG4", "proteína PRG4", "proteoglicano 4", y "lubricante" se usan de manera intercambiable. PRG4 se usa en la presente memoria además para abarcar la expresión factor estimulante de megacariocitos (MSF), que se ha aceptado para la base de datos de Nomenclatura de Genes Humanos UCL/HGNC/HUGO, y la proteína de zona superficial (SZP). La proteína PRG4 o lubricina (usada de manera intercambiable en la presente memoria con proteoglicano de lubricina), tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier proteína lubricina nativa o recombinante, aislada o purificada, homólogos, fragmentos funcionales o motivos, isoformas, y/o mutantes de la misma. En ciertas realizaciones, la proteína PRG4 aislada o purificada comprende una secuencia de aminoácidos para una proteína lubricina humana nativa o recombinante. En otras realizaciones, la proteína PRG4 aislada o purificada comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los exones del gen *prg4* que codifican la proteína PRG4 de longitud completa o estructuras primarias de isoformas. El gen de proteoglicano 4 (*prg4*) contiene 12 exones. La proteína PRG4 usada en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los exones 1-12 del gen *prg4*, más preferiblemente, los exones 6-12, y lo más preferiblemente, los exones 9-12.

Tal como se usa en la presente memoria, la proteína PRG4 incluye cualquier proteína PRG4 conocida en la actualidad, o descrita posteriormente. En ciertas realizaciones, una secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4 preferida se proporciona en SEQ ID N°:1. La proteína PRG4 comparte la estructura primaria de aminoácidos de cualquier proteína PRG4 o las isoformas conocidas con una homología de al menos un 60%, preferiblemente una homología del 75%, más preferiblemente una homología del 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. En ciertas realizaciones, una proteína PRG4 preferida tiene una masa molar media de entre 50 kDa y 400 kDa, que comprende una o más porciones activas biológicas de la proteína PRG4, o fragmentos funcionales, tales como un fragmento lubricante, o un homólogo del mismo.

Tal como se usa en la presente memoria, la proteína PRG4 comprende una parte biológicamente activa de la proteína. Tal como se usa en la presente memoria, una "parte biológicamente activa" de la proteína PRG4 incluye un fragmento funcional de una proteína que comprende secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas con, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína, que incluye menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y exhibe al menos una actividad de la proteína de longitud completa. En general, una parte biológicamente activa comprende un dominio o motivo funcional con al menos una actividad de la proteína. Una parte biológicamente activa de una proteína puede ser un polipéptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100, 200 o más aminoácidos. En una realización, una parte biológicamente activa de la proteína PRG4 se puede usar como un agente terapéutico solo o en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar una lubricación límite ocular indeseable o disminuida.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de varias proteínas PRG4 o lubricina nativas y recombinantes, y la caracterización de las proteínas PRG4 y las diversas isoformas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n°s 5.326.558; 6.433.142; 7.030.223; 7.361.738 de Turner et al., y las patentes de EE.UU. n°s 6.743.774 y 6.960.562 de Jay et al., publicación de EE.UU. n° 20070191268 de Flannery et al. también describen moléculas de PRG4 o lubricina recombinantes útiles en la presente invención.

Los métodos para el aislamiento, la purificación, y la expresión recombinante de una proteína PRG4 son muy conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, el método comienza con la clonación y el aislamiento del mRNA y cADN que codifica las proteínas PRG4 o las isoformas mediante el uso de técnicas habituales de biología molecular, tales como PCR o RT-PCR. El cADN aislado que codifica la proteína PRG4 o la isoforma se clona después en un vector de expresión, y se transforma y se expresa posteriormente en una célula huésped para producir la proteína PRG4 recombinante.

Tal como se usa en la presente memoria, "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otra manera *in vitro* (p.ej., "polinucleótido recombinante"), a métodos de uso de los polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. "Recombinante" también abarca la ligadura de ácidos nucleicos que tienen varias regiones codificantes o dominios o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para la expresión, p.ej., la expresión inducible o constitutiva, de una proteína de fusión que comprende un dominio activo del gen PRG4 y una secuencia de ácido nucleico amplificada mediante el uso de un cebador de la invención.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína PRG4 puede contener una o más mutaciones, deleciones, o inserciones. En tales realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína PRG4 tiene una homología de al menos un 60%, preferiblemente una homología del 75%, más preferiblemente una homología del 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, respecto de un ácido nucleico que codifica una proteína PRG4 de

tipo natural.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "cADNs" incluye el ADN que es complementario a moléculas de mRNA presentes en el mRNA de una célula u organismo que se puede convertir en cADN con una enzima tal como la transcriptasa inversa. En ciertas realizaciones, el cADN que codifica la proteína PRG4 se aísla del mRNA de PRG4 expresado en las células epiteliales humanas corneales o conjuntivales mediante el uso de un método de RT-PCR muy conocido en la técnica.

10 Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "polinucleótido", "ácido nucleico/nucleótido," y "oligonucleótido" se usan de manera intercambiable, e incluyen las formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. Lo siguiente son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADN, cADN, ADN genómico, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Los polinucleótidos pueden ser naturales, sintéticos, 15 recombinantes o cualquier combinación de los mismos.

20 Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones de la estructura de los nucleótidos se pueden conferir antes o después del montaje del polímero. La secuencia nucleotídica se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también incluye moléculas tanto bicatenarias como monocatenarias. A menos que se especifique o sea necesario de otra manera, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se conocen o que se predice que constituyen la forma bicatenaria.

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia polinucleotídica" es la representación alfabética de una molécula polinucleotídica. Un polinucleótido está compuesto de una secuencia específica de cuatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) en lugar de timina cuando el polinucleótido es ARN, en vez de ADN. Esta representación alfabética se puede introducir en bases de datos en un ordenador y se puede usar para aplicaciones bioinformáticas tales como, por ejemplo, genómica funcional y búsquedas de homología.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "polinucleótido/cADN aislado" incluye moléculas polinucleotídicas que están separadas de otras moléculas polinucleotídicas que están presentes en la fuente natural del polinucleótido. Por ejemplo, con respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye las moléculas polinucleotídicas que están separadas del cromosoma con el que el ADN genómico está asociado de manera natural. Preferiblemente, un polinucleótido "aislado" está exento de las secuencias que flanquean de manera natural al polinucleótido (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido de interés) en el ADN genómico del organismo del cual procede el polinucleótido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula polinucleotídica aislada que codifica la proteína PRG4 usada en la invención puede contener menos de alrededor de 35 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias nucleotídicas que flanquean de manera natural la molécula polinucleotídica en el ADN genómico de la célula de la que se obtiene el polinucleótido. Además, una molécula polinucleotídica "aislada", tal como una molécula de cADN, puede estar sustancialmente exenta de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

45 Tal como se usa en la presente memoria, un "gen" incluye un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de haberlo transcrito y traducido. Cualquiera de las secuencias polinucleotídicas descritas en la presente memoria se puede usar además para identificar fragmentos mayores o secuencias codificantes de longitud completa del gen con el que están asociadas. Los expertos en la técnica conocen los métodos para aislar secuencias de fragmentos mayores. Tal como se usa en la presente memoria, una molécula polinucleotídica "nativa o que se da de manera natural" incluye, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se da en la naturaleza (p.ej., 50 codifica una proteína natural).

55 Tal como se usan en la presente memoria, los términos "polipéptido" o "proteína" son intercambiables, e incluyen un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, o moléculas peptidomiméticas. Las subunidades se pueden unir mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad se puede unir mediante otros enlaces, p.ej., éster, éter, etc. Tal como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los dos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y moléculas peptidomiméticas. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente oligopéptido. Las cadenas peptídicas de tres o más aminoácidos se denominan polipéptido o proteína.

En ciertas realizaciones, la proteína PRG4 usada en la presente memoria se refiere a proteínas PRG4 o diversos homólogos o isoformas de las mismas, que se expresan de manera natural o recombinante en seres humanos u

5 otras células hospedadoras. Tal como se usa en la presente memoria, "expresar" o "expresión" incluye el proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben a ARN y/o se traducen a polipéptidos. Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARN, si se selecciona un hospedador eucariótico adecuado. Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras para la unión de la ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para la unión al ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano incluye un promotor tal como el promotor lac, y para el inicio de la transcripción la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De forma similar, un vector de expresión eucariótico incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación posterior, el codón de inicio AUG, y un codón de terminación para la separación del ribosoma. Tales vectores se pueden obtener comercialmente o ensamblarlos mediante las secuencias descritas en métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos más adelante en general para construir vectores. Tal como se usa en la presente memoria, el término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico autorreplicante que transfiere un polinucleótido insertado en y/o entre células hospedadoras. El término pretende incluir vectores que funcionan principalmente para la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, vectores de replicación que funcionan principalmente para la replicación del ácido nucleico y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o la traducción del ADN o ARN. También se pretenden vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores.

10 Tal como se usa en la presente memoria, una "célula hospedadora" pretende incluir cualquier célula individual o cultivo de células que puede ser, o ha sido, un receptor para los vectores o para la incorporación de polinucleótidos y/o polipéptidos exógenos. También pretende incluir la progenie de una única célula. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en contenido de ADN genómico o total) a la célula progenitora original debido a mutaciones naturales, accidentales, o deliberadas. Las células pueden ser procariontes o eucariotas, e incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células animales, y células mamíferas, que incluyen, pero sin limitación, células murinas, de rata, de simio o humanas. Tal como se usa en la presente memoria, una "célula hospedadora" también incluye las células modificadas genéticamente. La expresión "células modificadas genéticamente" incluye las células que contienen y/o que expresan un gen o secuencia polinucleotídica ajena o exógena, que a su vez modifica el genotipo o el fenotipo de la célula o su progenie. "Genéticamente modificado" también incluye una célula que contiene o que expresa una secuencia génica o polinucleotídica que se ha introducido en la célula. Por ejemplo, en esta realización, en una célula modificada genéticamente se ha introducido un gen que también es endógeno para la célula. La expresión "modificado genéticamente" incluye también cualquier adición, delección, o alteración de los nucleótidos endógenos de una célula. Tal como se usa en la presente memoria, una "célula hospedadora" puede ser cualquier célula que exprese una proteína PRG4 humana.

15 Tal como se usa en la presente memoria, "homólogos" se definen en la presente memoria como dos ácidos nucleicos o péptidos que tienen secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos similares, o sustancialmente idénticas, respectivamente. El término "homólogo" también abarca las moléculas de ácido nucleico que difieren de una de las secuencias de nucleótidos debido a la degeneración del código genético, y por tanto codifica las mismas secuencias de aminoácidos. En una de las realizaciones preferidas, los homólogos incluyen las variantes alélicas, ortólogos, parálogos, agonistas, y antagonistas de los ácidos nucleicos que codifican la proteína PRG4 (p.ej., SEQ ID N°:1).

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "ortólogos" se refiere a dos ácidos nucleicos de especies diferentes, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común mediante especiación. Normalmente, los ortólogos codifican péptidos que tienen las mismas funciones o funciones similares. En particular, los ortólogos de la invención exhibirán en general al menos un 80-85%, más preferiblemente un 85-90% o 90-95%, y lo más preferiblemente un 95%, 96%, 97%, 98%, o incluso un 99% de identidad, o un 100% de identidad de secuencia, con todo o parte de la secuencia de aminoácidos de cualquier proteína PRG4 conocida (p.ej., SEQ ID N°:1), isoformas, o análogos de la misma, y exhibirán una función similar a estos péptidos. Como también se usa en la presente memoria, el término "parálogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que están relacionados por la duplicación en un genoma. Los parálogos normalmente tienen funciones diferentes, pero estas funciones pueden estar relacionadas.

25 Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para una comparación óptima (p.ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de un polipéptido para una alineación óptima con el otro polipéptido o ácido nucleico). Después se comparan los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el residuo del mismo aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. Se puede hacer el mismo tipo de comparación entre dos secuencias de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad de secuencia entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de secuencia = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100). Preferiblemente, los homólogos de aminoácidos aislados incluidos en la presente invención son idénticos en al menos alrededor del 30-60%, preferiblemente al menos alrededor del 60-70%, y más preferiblemente al menos alrededor del 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, o 90-95%, y lo más preferiblemente al menos alrededor del 96%, 97%, 98%, 99% o más respecto de una secuencia de aminoácidos completa de cualquier proteína PRG4 conocida (p.ej., SEQ ID N°:1).

30 En ciertas realizaciones, un homólogo de ácido nucleico aislado que codifica la proteína PRG4 comprende una

secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos alrededor del 40-60%, preferiblemente al menos alrededor del 60-70%, más preferiblemente al menos alrededor del 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, o 90-95%, e incluso más preferiblemente al menos alrededor del 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más respecto de una secuencia de nucleótidos que codifica secuencias de aminoácidos de la proteína PRG4 (p.ej., SEQ ID N°:1).

5 La determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias peptídicas es muy conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el paquete informático Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, Bethesda, MD) para determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias peptídicas. En este método, se usa una penalización por apertura de hueco de 15 y una penalización por extensión de hueco de 6,66 para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Se  
10 usa una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1 para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los demás parámetros se ajustan a los ajustes por defecto. Para la alineación múltiple (algoritmo Clustal W), la penalización por apertura de hueco es 10, y la penalización por extensión de hueco es 0,05 con la matriz blosum62. Se debe entender que con el fin de determinar la identidad de secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido de timidina es equivalente a un nucleótido de uracilo.  
15

Además, la proteína PRG4 usada en la presente memoria incluye la proteína PRG4 codificada por un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que codifica la proteína PRG4 en condiciones rigurosas. Tal como se usa en la presente memoria, "hibridación" incluye una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. Los  
20 enlaces de hidrógeno se pueden dar mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, uniones de Hoogsteen, o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura doble, tres o más cadenas que forman un complejo multicatenario, una única cadena que auto-hibrida, o cualquier combinación de éstas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido mediante una ribozima.

25 Las reacciones de hibridación se pueden realizar en diferentes condiciones rigurosas. La presente invención incluye polinucleótidos capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad reducida, más preferiblemente condiciones rigurosas, y lo más preferiblemente condiciones muy rigurosas, con polinucleótidos que codifican la proteína PRG4 descrita en la presente memoria. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación durante la noche a 60 °C en disolución de Denhart 10x, 6xSSC, 0,5% de SDS, y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las transferencias se lavan secuencialmente a 62 °C durante 30 minutos cada vez en 3xSSC/0,1% de SDS, seguido de 1xSSC/0,1% de SDS, y finalmente 0,1xSSC/0,1% de SDS. También tal como se usa en la presente memoria, en ciertas realizaciones, la expresión "condiciones rigurosas" se  
30 refiere a la hibridación en una disolución 6xSSC a 65 °C. En otras realizaciones, "condiciones muy rigurosas" se refiere a la hibridación durante la noche a 65 °C en disolución de Denhart 10x, 6xSSC, 0,5% de SDS y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las transferencias se lavan secuencialmente a 65 °C durante 30 minutos cada vez en 3xSSC/0,1% de SDS, seguido de 1xSSC/0,1% de SDS, y finalmente 0,1xSSC/0,1% de SDS. Los métodos para las hibridaciones de ácido nucleico se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, las proteínas PRG4 codificadas por los ácidos nucleicos usados en la presente memoria incluyen un ácido nucleico que tiene una homología de al menos el 60%, preferiblemente una homología del 75%, más preferiblemente una homología del 83%, más preferiblemente del 90%, lo más preferiblemente del 95%, 96%, 97%, 98%, 99% respecto de una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína PRG4 humana (p.ej., SEQ ID N°:1) o una isoforma u homólogo específico de la misma.  
40

Además, las proteínas PRG4 usadas en la presente memoria también pueden ser una proteína quimérica o una proteína de fusión. Tal como se usa en la presente memoria, una "proteína quimérica" o una "proteína de fusión" comprende un primer polipéptido unido de forma operable a un segundo polipéptido. Las proteínas quiméricas pueden comprender opcionalmente un tercer, cuarto o quinto polipéptido o más, unido de forma operable a un primer o segundo polipéptido. Las proteínas quiméricas pueden comprender dos o más polipéptidos diferentes. Las proteínas quiméricas pueden comprender múltiples copias del mismo polipéptido. Las proteínas quiméricas también pueden comprender una o más mutaciones en uno o más de los polipéptidos. Los métodos para producir proteínas quiméricas son muy conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones de la presente invención, la proteína quimérica es una quimera de la proteína PRG4 con otras isoformas de la proteína PRG4.  
50

Tal como se usa en la presente memoria, una proteína, polinucleótido o molécula "aislada" o "purificada" significa extraída del medio en el que se da de manera natural, o sustancialmente exenta de material celular, tal como otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la cual se obtiene la proteína, polinucleótido o molécula, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente exenta de material celular" incluye las preparaciones separadas de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante o se sintetiza. En ciertas realizaciones, la expresión "sustancialmente exenta de material celular" incluye las preparaciones de una proteína PRG4 que tiene menos de alrededor del 30% (en peso seco) de otras proteínas (también denominadas en la presente memoria "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de alrededor del 20%, todavía más preferiblemente menos de alrededor del 10%, y lo más preferiblemente menos de alrededor del 5% de otras proteínas. Cuando la proteína o polinucleótido se produce de manera recombinante, preferiblemente  
60

también está sustancialmente exenta del medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor del 20%, más preferiblemente menos de alrededor del 10%, y lo más preferiblemente menos de alrededor del 5% del volumen de la preparación de la proteína de interés.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella, para la administración tópica, en una superficie ocular de un individuo que lo necesita, de una concentración farmacéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4, como se define en las reivindicaciones adjuntas, un agente mucoadhesivo opcional, y PRG4 suspendido en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, y en combinación con uno o más agentes oftálmicamente aceptables. Los agentes oftálmicamente aceptables se pueden seleccionar del grupo que  
10 consiste en un demulcente, excipiente, astringente, vasoconstrictor, y emoliente oftálmicamente aceptables. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "concentración o cantidad eficaz" o "concentración o cantidad terapéuticamente eficaz" pretende significar una concentración o cantidad atóxica pero suficiente de un compuesto que induce PRG4, el PRG4, o los otros agentes terapéuticos para proporcionar los efectos terapéuticos deseados. La concentración o cantidad que es eficaz variará entre individuos, dependiendo de la edad y el estado general del  
15 individuo, los agentes particulares, y similares. Así, no siempre es posible especificar una concentración o cantidad eficaz exacta. Sin embargo, alguien de experiencia habitual en la técnica puede determinar una concentración o cantidad eficaz adecuada en cualquier caso individual mediante el uso de la experimentación rutinaria. Además, la concentración o cantidad eficaz exacta de un compuesto que induce PRG4, la proteína PRG4, o los otros agentes terapéuticos incorporados en una composición o forma farmacéutica de la presente invención no es crucial, con tal de que la concentración esté en un intervalo suficiente para permitir la aplicación sencilla de la disolución o formulación para administrar una cantidad del compuesto que induce PRG4, la proteína PRG4, o los otros agentes activos que están en un intervalo terapéuticamente eficaz.

En ciertas realizaciones, la concentración farmacéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas está en un intervalo del 0,0001-0,1% p/v, y la concentración  
25 farmacéuticamente eficaz de la proteína PRG4 está en un intervalo de 100-300 µg/mL. Tal como se usa en la presente memoria, los agentes oftálmicamente aceptables comprenden los demulcentes, excipientes, astringentes, vasoconstrictores, y emolientes oftálmicamente aceptables que se definen completamente en el Código de Regulaciones Federales 21CFR349.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para el uso como se describe en la presente memoria comprenden un agente incrementador del tiempo de permanencia que incrementa el tiempo de permanencia del compuesto que induce PRG4 en la superficie ocular. En ciertas realizaciones, el agente incrementador del tiempo de permanencia está presente en una cantidad que, cuando se administra la composición farmacéutica en la superficie de un ojo de un individuo, se conserva una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 descrito en la presente memoria en la superficie del ojo. En ciertas realizaciones, el agente incrementador del tiempo de permanencia se selecciona y/o está presente en una cantidad de forma que la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que induce PRG4 se conserva en la superficie del ojo durante cualquier periodo de tiempo terapéuticamente eficaz, al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, o más. En ciertas realizaciones, los agentes incrementadores del tiempo de permanencia o mucoadhesivos oftálmicamente aceptables pueden incluir, a modo de ejemplo no limitante, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbómero (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), policarbofilo, poli(óxido de etileno), copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato sódico, dextrano, o combinaciones de los mismos. La presente invención abarca cualquier polímero de peso molecular elevado que incremente el tiempo que el compuesto que induce PRG4 sigue estando en la superficie del ojo.

45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "administración tópica" se usa en su sentido convencional y significa la administración de la composición que comprende la proteína PRG4 y uno o más agentes oftálmicamente aceptables en el ojo. En general, la administración tópica se lleva a cabo a través de una formulación líquida para colirios o lavados, y proporciona un efecto local.

En ciertas realizaciones, cualquier composición farmacéutica para el uso como se describe en la presente memoria comprende, o los agentes oftálmicamente aceptables anteriormente mencionados están o se pueden combinar, con uno o más de carboximetilcelulosa sódica (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 2,5% p/v), hidroxietil celulosa (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 2,5% p/v), hipromelosa (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 2,5% p/v), metilcelulosa (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 2,5% p/v), dextrano 70 (p.ej., alrededor del 0,1% p/v), gelatina (p.ej., alrededor del 0,01% p/v), glicerina (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 1% p/v), polietileno glicol 300 (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 1% p/v), polietileno glicol 400 (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 1% p/v), polisorbato 80 (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 1% p/v), propileno glicol (p.ej., alrededor del 0,2 a alrededor del 1% p/v), poli(alcohol vinílico) (p.ej., alrededor del 0,1 a alrededor del 4% p/v), povidona (p.ej., alrededor del 0,1 a alrededor del 2% p/v), sulfato de zinc (p.ej., alrededor del 0,25% p/v), lanolina anhidra (p.ej., alrededor del 1 a alrededor del 10% p/v), lanolina (p.ej., alrededor del 1 a alrededor del 10% p/v), aceite mineral ligero (p.ej., ≤ alrededor del 50% p/v), aceite mineral (p.ej., ≤ alrededor del 50% p/v), parafina (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v), petrolato (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), pomada blanca (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), petrolato blanco (p.ej., ≤ alrededor del 100% p/v), cera blanca (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v), cera amarilla (p.ej., ≤ alrededor del 5% p/v),

hidrocloruro de efedrina (p.ej., alrededor del 0,123% p/v), hidrocloruro de nafazolina (p.ej., alrededor del 0,01 a alrededor del 0,03% p/v), hidrocloruro de fenilefrina (p.ej., alrededor del 0,08 a alrededor del 0,2% p/v), e hidrocloruro de tetrahidrozolina (p.ej., alrededor del 0,01 a alrededor del 0,05% p/v). En ciertos casos, las cantidades en porcentaje utilizadas en la presente memoria son cantidades en porcentaje en peso.

- 5 En realizaciones adicionales, cualquier composición farmacéutica para el uso en la presente descripción (p.ej., una composición que comprende un compuesto que induce PRG4 y PRG4) puede comprender además una concentración terapéuticamente eficaz de ácido hialurónico o hialuronato sódico en el intervalo de 10-100.000 µg/mL, preferiblemente 500-5.000 µg/mL. Además, la composición farmacéutica para el uso en la presente invención puede comprender además uno o más fosfolípidos tensioactivos en el intervalo de 10-10.000 µg/mL, y tales fosfolípidos tensioactivos incluyen, pero sin limitación, L-α-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomiélin (Sp), u otros lípidos neutros y polares. En esta realización, la combinación de los moduladores más hidrófobos con las moléculas anfífilas de lubricante límite permite el transporte directo de las moléculas terapéuticamente eficaces a las células de la superficie ocular, en las que las moléculas de lubricante límite tienden a agregar, y proporciona un vehículo farmacéuticamente eficaz para los compuestos terapéuticos para el epitelio corneal y conjuntival para una lubricación límite eficaz. Por ejemplo, la solubilización de los andrógenos hidrófobos en DPPC, después la complejación de DPPC, HA y PRG4 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, transporta y concentra los andrógenos en las células de la superficie ocular, donde pueden estimular más eficazmente la expresión de lubricante límite.

- 20 La composición farmacéutica para el uso en la presente invención puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables o vehículos que comprenden cualquier material aceptable, y/o uno o más aditivos conocidos en la técnica. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "portadores" o "vehículos" se refieren a materiales portadores adecuados para la administración tópica de fármacos. Los portadores y vehículos útiles en la presente memoria incluyen cualquier material conocido en la técnica, que es atóxico y no interacciona con otros componentes de la composición de una manera perjudicial. Se puede incluir en la composición diversos aditivos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar disolventes, que incluyen cantidades relativamente pequeñas de alcohol, para solubilizar ciertas sustancias farmacológicas. Otros aditivos opcionales incluyen opacificantes, antioxidantes, perfumes, colorantes, agentes gelificantes, agentes espesantes, estabilizantes, tensioactivos, y similares. También se pueden añadir otros agentes, tales como agentes antimicrobianos, para prevenir el deterioro en el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios tales como levaduras y hongos. Los agentes antimicrobianos adecuados se seleccionan en general del grupo que consiste en ésteres de metilo y propilo de ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propil parabeno), benzoato sódico, ácido sórbico, imidurea, y combinaciones de los mismos. También se pueden incluir potenciadores de la permeabilidad y/o aditivos de mitigación de la irritación en la composición farmacéutica de la presente invención.

- 35 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso en la presente invención se prepara en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada osmóticamente de electrolitos lagrimales, que incluye uno o más de cloruro sódico de alrededor del 44% a alrededor del 54% de fracción molar, cloruro potásico de alrededor del 8% a alrededor del 14% de fracción molar, bicarbonato sódico de alrededor del 8% a alrededor del 18% de fracción molar, bicarbonato potásico de alrededor del 0% a alrededor del 4% de fracción molar, cloruro cálcico de alrededor del 0% a alrededor del 4% de fracción molar, cloruro magnésico de alrededor del 0% a alrededor del 4% de fracción molar, citrato trisódico de alrededor del 0% a alrededor del 4% de fracción molar, y ácido clorhídrico de alrededor del 0% a alrededor del 20% de fracción molar o hidróxido sódico de alrededor del 0% a alrededor del 20% de fracción molar. En ciertas realizaciones, el vehículo farmacéutico se puede formular para generar una disolución acuosa de electrolitos en el intervalo de alrededor de 150-200 mM. Otras formulaciones adecuadas, tales como pomadas, cremas, geles, pastas, y similares, adecuadas para la administración tópica, también se contemplan en la presente invención. En ciertas realizaciones, los electrolitos proporcionan un equilibrio osmótico adecuado cuando se combinan con el compuesto que induce PRG4 y PRG4 opcional para producir una disolución oftálmicamente aceptable.

- 50 La presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar la lubricación límite ocular disminuida o indeseada, los síntomas asociados a ella, o una afección que está asociada con, o que provoca, una deficiencia de la lubricación ocular, en un individuo que lo necesita, que comprende administrar de manera tópica en la superficie ocular del individuo que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 en combinación con PRG4. En una realización, el método de la presente invención comprende administrar de manera tópica una composición farmacéutica que comprende la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 en combinación con PRG4 que está suspendido en una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende uno o más electrolitos lagrimales. En otra realización, la presente invención comprende administrar de manera tópica una composición farmacéutica que comprende un compuesto que induce PRG4 como se define en las reivindicaciones adjuntas y PRG4 que se formula en una formulación oftálmicamente aceptable que comprende uno o más agentes oftálmicamente aceptables adicionales como se discutió anteriormente.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "tratar o tratamiento" se refiere a la reducción de la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, la eliminación de los síntomas y/o la causa subyacente, la prevención de la aparición

de los síntomas y/o su causa subyacente, y la mejora o el remedio del daño. La expresión "tratar o tratamiento" abarca también tanto la prevención de un trastorno en un individuo predispuesto como el tratamiento del trastorno en un individuo clínicamente sintomático.

5 En ciertas realizaciones, la lubricación límite ocular disminuida está provocada por una pérdida lagrimal evaporativa incrementada o una película lagrimal inestable en la curva del borde ocular. Tal lubricación límite ocular disminuida o indeseada está asociada con la enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca (QCS), deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de Meibomio, terapia de sustitución de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, alergia, tiempo reducido de ruptura de la película lagrimal, trastornos de la superficie ocular, niveles de proteasas incrementados en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento. Como se discutió anteriormente, la tensión de cizalla incrementada conduce a la inestabilidad de la película lagrimal, una pérdida lagrimal evaporativa, hiperosmolaridad, cambios en la presión de hinchamiento y una elevación por retroalimentación en la tensión de cizalla. La tensión de cizalla incrementada también estimula la inflamación, la deficiencia de andrógenos y la expresión disminuida de proteoglicanos. A lo largo del tiempo, la tensión de cizalla incrementada y sus secuelas conducen a una pérdida de lubricación límite en la superficie ocular. Por lo tanto, la presente invención proporciona la reducción de la tensión de cizalla reponiendo y enriqueciendo la expresión de proteoglicanos, tales como proteína PRG4, en la superficie ocular, mediante el uso de un compuesto que induce PRG4 como se discutió anteriormente, para prevenir o incrementar la lubricación límite ocular.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1

Expresión de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales y conjuntivales humanas

Se aislaron células epiteliales corneales humanas de los bordes corneoesclerales de hombres y mujeres donantes. Las células se procesaron directamente (n = 8), o primero se cultivaron en medios de queratinocitos sin suero y sin rojo fenol (n = 2). Las conjuntivas bulbares (n = 2), muestras de citología de impresión conjuntival (n = 9), células epiteliales conjuntivales humanas inmortalizadas después del cultivo (n = 1), glándulas lagrimales de ratón NOD (n = 5 ratones adultos/sexo, 10 glándulas/muestra), y glándulas de Meibomio de ratón BALB/c (n = 7 ratones adultos/sexo, glándulas de 28 párpados/muestra) se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos. Estas muestras se procesaron para el análisis del mRNA de PRG4 principalmente mediante el uso de RT-PCR (n = 18 humanas, todas de ratón) y Affymetrix GeneChips (n = 4 córneas humanas). Los cebadores de PRG4 para la PCR abarcaron 1 kbp de secuencias intrónicas, para inhibir la amplificación del ADN cromosómico contaminante (Tabla 1). Las muestras amplificadas se cribaron con respecto a la presencia de productos de PRG4 mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa y un bioanalizador Agilent 2100. Para confirmar la identidad de los amplicones, se secuenciaron los productos de PCR de las muestras de córnea (n = 2), células epiteliales conjuntivales (n = 1) y un patrón de hígado humano (n = 1) con un analizador genético 3100 en el Massachusetts Eye and Ear Infirmary DNA Sequencing Center for Vision Research (Boston, MA), y los datos resultantes se analizaron con búsquedas BLASTn de las bases de datos de GenBank.

Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos diseñados para el análisis mediante RT-PCR del mRNA de PRG4

Especie	Orientación	Secuencia de nucleótidos (5' - 3')	Exones	Tamaño del Amplicón (pb)
Humano	Directa	GATGCAGGGTACCCCAA (SEQ ID N°:2)	9-12	526
	Inversa	CAGACTTTGGATAAGGTCTGCC (SEQ ID N°:3)		

40 Se demostró que el mRNA de PRG4 está presente en todas las muestras de células epiteliales corneales y conjuntivales humanas y de citología de impresión. La identidad de los productos de PCR de PRG4 se confirmó mediante el análisis de las secuencias de ADN (Tabla 2). Los resultados muestran que PRG4 se transcribe en las células epiteliales corneales y conjuntivales humanas.

Tabla 2. Identificación de las secuencias de amplicones de muestras humanas de córnea, conjuntiva e hígado

45

	Dirección de la secuenciación	Pares de bases alineados con PRG4 humano	Pares de bases totales del amplicón	Identidad de la búsqueda BLASTn
Patrón de hígado humano				
A	Directo	495	500	PRG4 humano
A	Inverso	488	491	PRG4 humano
B	Directo	496	499	PRG4 humano
B	Inverso	498	500	PRG4 humano
Córnea humana (mujer de 24 años)				
A	Directo	497	499	PRG4 humano
A	Inverso	490	492	PRG4 humano
B	Directo	500	504	PRG4 humano
B	Inverso	498	501	PRG4 humano
Córnea humana (mujer de 51 años)				
A	Directo	498	499	PRG4 humano
A	Inverso	474	489	PRG4 humano
B	Directo	496	498	PRG4 humano
B	Inverso	490	491	PRG4 humano
Células epiteliales conjuntivales humanas				
A	Directo	496	499	PRG4 humano
A	Inverso	490	492	PRG4 humano
B	Directo	495	499	PRG4 humano
B	Inverso	474	491	PRG4 humano

Se secuenciaron dos muestras diferentes (A y B) de cada preparación en las direcciones directa e inversa. Las muestras de córnea humana fueron células epiteliales de los bordes corneoesclerales de mujeres donantes. El número de acceso del gen para PRG4 humano es NM\_005807.

#### Ejemplo 2

##### Regulación de la expresión de PRG4 *in vitro* mediante andrógenos

5 El tratamiento con andrógenos estimula la expresión de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas primarias. Métodos. Las células se cultivaron en medios de queratinocitos sin suero hasta que alcanzaron una confluencia de alrededor del 80%. Las células (n = 3 pocillos/tratamiento/experimento) se incubaron después con vehículo o dihidrotestosterona (DHT) 10 nM durante hasta 5 días. A los tiempos designados se procesaron las células para el aislamiento del ARN total y el análisis del mRNA de PRG4 mediante RT-PCR. Resultados. Los resultados muestran que DHT induce un incremento notable de los niveles de mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas primarias (Figura 6). Este efecto de los andrógenos, respecto de los niveles de control en el Día 0, se hizo prominente después de 3 (incremento de 10,3 veces), 4 (incremento de 3,6 veces) y 5 (incremento de 2,8 veces) días de exposición a la hormona. Esta influencia de DHT sobre la expresión del mRNA de PRG4 en células epiteliales corneales humanas primarias se confirmó en otro experimento. El tratamiento de las células durante 5 días con DHT provocó un incremento de 46 veces en el contenido de mRNA de PRG4, respecto del de los controles tratados con vehículo.

15 El tratamiento combinado con 17 $\beta$ -estradiol y progesterona inhibe la expresión del mRNA de PRG4 en tejido lagrimal de ratón. Se adquirieron ratones BALB/c adultos jóvenes y de edades coincidentes, que se sometieron a ovariectomía cuando tenían 8 semanas de edad, de Taconic Laboratories (Germantown, NY). Los animales se mantuvieron en habitaciones a una temperatura constante con un periodo fijo de luz/oscuridad de 12 horas de duración. Diez días tras la cirugía, se implantaron de manera subcutánea esferas que contenían vehículo (colesterol,

20



metilcelulosa, lactosa), o 17 $\beta$ -estradiol (0,5 mg) más progesterona (10 mg) en los ratones ovariectomizados. Las esferas se obtuvieron de Innovative Research of America (Sarasota, FL) y se diseñaron para la liberación constante de placebo o de cantidades fisiológicas de esteroides sexuales (es decir, como en la gestación) durante 3 semanas. Después de 14 días de tratamiento, los ratones (n = 7 ratones/condición/experimento) se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se extrajeron las glándulas lagrimales exorbitales, se mezclaron según el grupo (n = 14 glándulas/muestra) y se procesaron para los procedimientos de biología molecular.

Se extrajo el ARN total de los tejidos mediante el uso del reactivo TRIzol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Cuando se indica, las muestras también se expusieron a DNasa sin RNasa (Invitrogen), se examinaron de manera espectrofotométrica a 260 nm para determinar la concentración y se evaluaron en geles del 6,7% de formaldehído/1,3% de agarosa (Gibco/BRL, Grand Island, NY) para verificar la integridad del ARN. Las muestras de ARN se purificaron adicionalmente con columnas de centrifugación RNAqueous (Ambion, Austin, Tx), y la integridad de estas preparaciones se estudió con un kit RNA 6000 Nano LabChip con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Las muestras de ARN se procesaron después para la hibridación con un sistema CodeLink Bioarray. Brevemente, se sintetizó cADN a partir de ARN (2  $\mu$ g) con un kit de reactivos de ensayo de expresión CodeLink (Amersham, Piscataway, NJ) y purificó con un kit de purificación QIAquick (Qiagen, Valencia, CA). Después de secar la muestra, se produjo cARN con un kit de reactivos de ensayo de expresión CodeLink (Amersham), se recuperó con un kit RNeasy (Qiagen) y se cuantificó con un espectrofotómetro UV. Después se incubó el cARN fragmentado, marcado con biotina y se agitó (agitador a 300 rpm) en un sistema CodeLink Bioarray a 37 °C durante 18 horas. El Bioarray se lavó, se expuso a estreptavidina-Alexa 647, y se escaneó mediante el uso de un programa informático ScanArray Express y un escáner ScanArray Express HT (Packard BioScience, Meriden, CT) con el láser ajustado a 635 nm, potencia del láser al 100%, y tensión del tubo fotomultiplicador al 60%. Los archivos de imágenes escaneadas se analizaron utilizando un programa informático de análisis de imágenes y datos CodeLink (Amersham), que produjo intensidades de señales de hibridación tanto en bruto como normalizadas para cada punto de la matriz. Las intensidades de los puntos (~10.000) en la imagen de la micromatriz se normalizaron a una mediana de 1. Los datos normalizados, con intensidades de señal que superaron 0,75, se analizaron con el programa informático GeneSifter.Net (VizX Labs LLC, Seattle, WA, vizxlabs.com). El análisis estadístico de los datos de expresión génica individual se llevó a cabo con una prueba t de Student (bilateral, para datos independientes).

Los datos muestran que el tratamiento combinado con estradiol y progesterona, en comparación con el placebo, provoca una disminución significativa (p = 0,020) de 1,6 veces en la expresión génica de PRG4 en la glándula lagrimal de ratón.

### Ejemplo 3

#### Tratamiento de la lubricación límite ocular deficiente *in vivo* con andrógeno y PRG4

En un paciente que se quejaba de irritación de la superficie ocular se examina la lubricación ocular o afecciones asociadas con una deficiencia de la lubricación ocular midiendo los síntomas mayores de 2 respuestas positivas en el cuestionario McMonnies, mayores de una puntuación de 5 en el Índice de Enfermedad de la Superficie Ocular (OSDI), o a través de la evidencia de ciertos síntomas en la Escala Analógica Visual, en combinación con signos objetivos que incluyen uno o más de un tiempo reducido de rotura de la película lagrimal (menos de 10 segundos), osmolaridad del menisco lagrimal lateral inferior mayor de 308 mOsm/L, valor de tira de Schirmer bajo (menos de 10 mm), tinción corneal o conjuntival con fluoresceína sódica (puntuaciones > 0 con múltiples macropunteados), restos significativos resultantes de la citología de impresión, disfunción de la glándula de Meibomio determinada por cualquier medio, una disminución de la velocidad de desplazamiento post-parpadeo de una lente de contacto, un cambio en la función de transferencia espaciotemporal de una lente de contacto tras la aplicación de una serie de impulsos de presión, una disminución de la velocidad de relajación de la película lagrimal interferométrica post-parpadeo, un incremento de la concentración de citocinas proinflamatorias, una concentración reducida de lactoferrina o lisozima, o un incremento de la velocidad de decoherencia de la función de dispersión de punto post-parpadeo.

El paciente se administra en la superficie de cada ojo 1 a 2 gotas de una disolución que contiene 4,5a-dihidrotestosterona y 200  $\mu$ g/mL de proteína PGR4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable. Se instruye al paciente para que cierre los ojos durante 10 segundos.

Las visitas de seguimiento pueden vigilar una reducción de la osmolaridad lagrimal lateral inferior, el tiempo incrementado de rotura de la película lagrimal, o los demás signos anteriormente mencionados. En particular, si la osmolaridad de la película lagrimal se reduce desde un valor anormal (quizás 330 mOsm/L) hasta un valor más normal (quizás 304 mOsm/L), la modulación y la reposición terapéutica de la lubricación de la superficie ocular se considerarían eficaces.

### Referencias

1. G. D. Jay, Curr Opin Orthop 15, 355 (2004).
2. Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. J Orthop Res,

enero de 1999;17(1):110-20.

3. S. G. Rees et al., *Matrix Biology* 21, 593 (2002).
4. Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL. Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res.* mayo de 2005;23(3):562-8.
- 5 5. J. Marcelino et al., *Nat Genet* 23, 319 (1999).
6. D. K. Rhee et al., *J Clin Invest* 115, 622 (2005).
7. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:538-547.
- 10 8. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Pizzomi C, Paolino S, Seriola B, Felli L, Straub RH. Anti-TNF and sex hormones. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:391-400.
9. Rontzsch A, Thoss K, Petrow PK, Henzgen S, Brauer R. Amelioration of murine antigen-induced arthritis by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Inflamm Res* 2004;53:189-198.
10. Schwarz IM, Hills BA, *Br. J. Rheum.* 1998;37:21-26.
11. Jay GD, Hong BS. *Connect Tissue Res*, 1992; 28(1-2):89-98.
- 15 12. Jones MB. et. al. *Mathematical Medicine and Biology* 2005; 22, 265.
13. E. Meyer, R. M. Overney, K. Dransfeld, T. Gyalog. *Nanoscience: Friction and Rheology on the Nanometer Scale* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, River Edge, Nueva Jersey, 2002), pág. 373.
14. D. Dowson, *Proc Inst Mech Eng [H]* 215, 335 (2001).
- 20 15. G. A. Ateshian, V. C. Mow, en *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology* V. C Mow, R. Huiskes, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2005), págs. 447-494.
16. F. Guilak, *Arthritis Rheum* 52, 1632 (Junio, 2005).
17. K. C. Morell, W. A. Hodge, D. E. Krebs, R. W. Mann, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14819 (11 de oct., 2005).
18. S. A. V. Swanson, en *Adult Articular Cartilage* M. A. R. Freeman, Ed. (Pitman Medical, Tunbridge Wells, Inglaterra, 1979), págs. 415-460.
- 25 19. K. C. Morrell, W. A. Hodge, D. E. Krebs, R. W. Mann, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102. 14819 (11 de oct., 2005).
20. C. W. McCutchen, *Fed Proceedings* 25, 1061 (1966).
21. T. Murakami, Y. Sawae, M. Ihara, *JSME Int J Series C-Mechanical Systems Machine Elements & Manufacturing* 46, 594 (2003).
22. G. Meachim, *Ann Rheum Dis* 31, 457 (1972).
- 30 23. Schmidt M, Naumann H, Weidler C, Schellenberg M, Anders S, Straub RH. Inflammation and sex hormone metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:236-246.

**Lista de secuencias**

SEQ ID N°:1

MAWKTLPIYLLLLLSVFVIQVSSQDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCNDYNCQHYM  
ECCPDFKRVC TAELSCKGRCFESFERGRECDCAQCKKYDKCCPDYESFCAEVHN  
PTSPPSSKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKKTKKVIESEEITEEHSVSENQESS  
SSSSSSSSSTIRKIKSSKNSAANRELQKLLKVKDNKKNRKTKKPTPKPPVDEAGS  
GLDNGDFKVTTTPTDSTTQHNVSTSPKITTAKPINRPSLPPNSDTSKETS LTVNKE  
TTVETKETTTTNKQSTSDGKEKTTSAKETQSIEKTS AKDLAPTSKVLAKPTPKAET  
TTKGPALTTTPEPTPTTTPKEPASTTPEPTPTTIKSAPTTTTPKEPAPTTTTSAPTTTPEP  
APTTTKEPAPTTTTPKEPAPTTTKEPAPTTTTSAPTTTTPKEPAPTTTTPKAPTTTTPKEPAP  
TTPKEPTPTTTPKEPAPTTTKEPAPTTTTPKEPAPTAPKKAPTTTTPKEPAPTTTTPKEPAPTTT  
EPSPTTTPKEPAPTTTTSAPTTTTPKEPAPTTTTSAPTTTTPKEPSPTTTPKEPAPTTTTPKEPAP  
TTPKAPTTTTPKEPAPTTTTPKEPAPTTTTPKAPTTTTPKEPAPTTTTPKETAPTTTTPKKTPTTTP  
EKLAPTTTPEKAPTTTPEELAPTTTPEEPTPTTPEEPAPTTTPKAAAPNTPKEPAPTTTPE  
PAPTTTTPKEPAPTTTTPKETAPTTTTPKGTAPTTTTPKEPAPTTTTPKAPKELAPTTTTPKEPTSTT  
CDKAPTTTTPKGTAPTTTTPKEPAPTTTTPKEPAPTTTTPKGTAPTTTTPKEPAPTTTTPKAPKEL  
APTTTTPKGTSTTSDKAPTTTTPKETAPTTTTPKEPAPTTTTPKAPTTTTPETPPPTTSEVSTP  
TTTKEPTTTHKSPDESTPELSAEPKALENSPKEPGVPTTTPAATKPEMTTAKD  
KTTERRDLRTTPETTTAAAPKMTKETATTTTEKTTESKITATTTTQVTSTTTTQDTPFKIT  
TLKTTTLAPKVTTTTKTITTTTEIMNKPEETAAPKDRATNSKATTPKPKPTKAPK  
PTSTKPKTTPRVRKPKTTPTPRKMTSTMPELNPTSRIAEAMLQTTTRPNQTPNSK  
LVEVNPKSEDAGGAEGETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLPRVNPQGHINPMLSD  
ETNICNGKPV DGLTTLRNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPSPARRITEVWGIPSPIDTV  
FTRCNCEGKTTFFFKDSQYWRFTNDIKDAGYKPIFKGFGGLTGQIVAALSTAKYK  
NWPESVYFFKRGGSIQYYIKQEPVQKCPGRRPALNYPVYGETTQVRRRRFERAI  
GPSQTHITIRIQYSPARLAYQDKGVLHNEVKVSILWRGLPNVVTSAISLPNIRKPDG  
YDYYAFSKDQYYNIDVPSRTARAITRSGQTL SKVWYNCP

SEQ ID N°:2: GATGCAGGGTACCCCAA (humana, directa)

5 SEQ ID N°:3: CAGACTTTGGATAAGGTCTGCC (humana, inversa)

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la deficiencia de lubricación ocular o los síntomas asociados a ella que comprende PRG4 o un fragmento lubricante del mismo en combinación con una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto que induce PRG4 seleccionado del grupo que consiste en un andrógeno, un modulador selectivo de receptores de andrógenos, y un análogo de andrógeno, en el que dicho análogo de andrógeno se selecciona del grupo que consiste en 17 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-2-oxa-5 $\alpha$ -androstan-3-ona, 4,5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, y 19-nortestosterona, en el que dicho tratamiento comprende la administración tópica de dicha composición en una superficie ocular.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que la deficiencia de lubricación ocular es una lubricación límite ocular indeseable resultante de una enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de Meibomio, terapia de sustitución de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, tiempo reducido de ruptura de la película lagrimal, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad o envejecimiento.
- 15 3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que el modulador selectivo del receptor de andrógenos se selecciona del grupo que consiste en un compuesto de aril-propionamida seleccionado del grupo que consiste en S-3-(4-acetilamino-fenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S4], y S-3-(4-fluorofenoxi)-2-hidroxi-2-metil-N-(4-nitro-3-trifluorometil-fenil)-propionamida [S-1]).
- 20 4. La composición farmacéutica para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho andrógeno es testosterona.
5. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende 10-10.000  $\mu$ g/mL de PRG4.
6. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición comprende 50-500  $\mu$ g/mL de PRG4.
- 25 7. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende un 0,0001-0,1% p/v del andrógeno, el análogo de andrógeno, o el modulador selectivo de receptores de andrógenos.
8. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que PRG4 tiene una masa molar media de entre 50 kDa y 400 kDa, que comprende uno o más fragmentos lubricantes.
- 30 9. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que PRG4 es un polipéptido recombinante o aislado.
10. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que PRG4 es un homólogo de aminoácido aislado con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75% idéntica a SEQ ID N°: 1.
- 35 11. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, que comprende además hialuronato sódico o ácido hialurónico en una concentración terapéuticamente eficaz de 10-100.000  $\mu$ g/mL.
12. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, que comprende además uno o más fosfolípidos tensioactivos seleccionados del grupo que consiste en L- $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidil-etanolamina y esfingomielina en una concentración terapéuticamente eficaz de 10-10.000  $\mu$ g/mL.
- 40 13. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, que comprende además una disolución salina tamponada con fosfato, o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de uno o más electrolitos seleccionados del grupo que consiste en fosfato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, bicarbonato sódico, bicarbonato potásico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, citrato trisódico, ácido clorhídrico, e hidróxido sódico.
- 45 14. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, que comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de uno o más demulcentes oftálmicos, excipientes, astringentes, vasoconstrictores, emolientes, o un agente que incrementa el tiempo de permanencia, en la que opcionalmente el agente que incrementa el tiempo de permanencia se selecciona del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbómero, polímero de ácido acrílico, poli(metacrilato de metilo), poli(acrilamida), policarbofilo, poli(óxido de etileno), copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato sódico, dextrano, o una combinación de los mismos.
- 50 15. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la composición comprende 100-300  $\mu$ g/mL de PRG4 y 0,0001-0,1% p/v de dicho compuesto que induce PRG4.

Figura 1

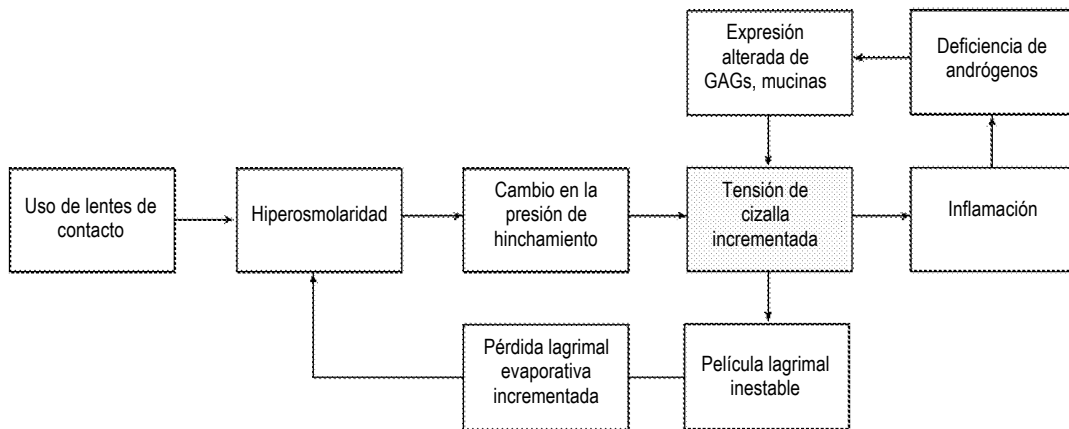


Figura 2

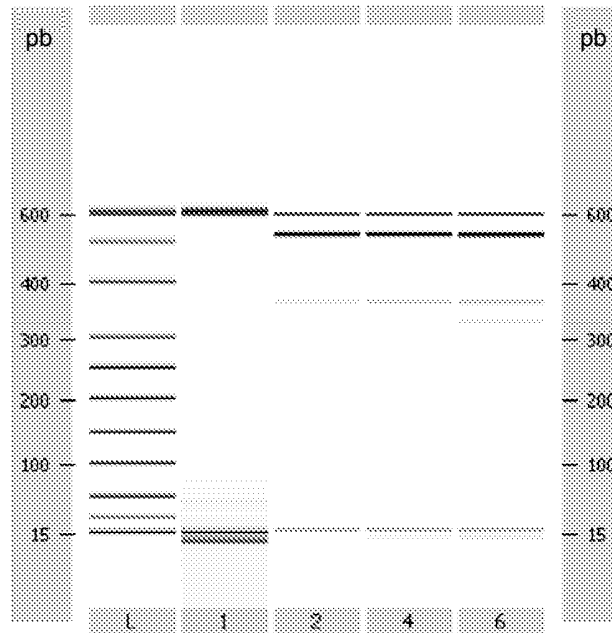


Figura 3

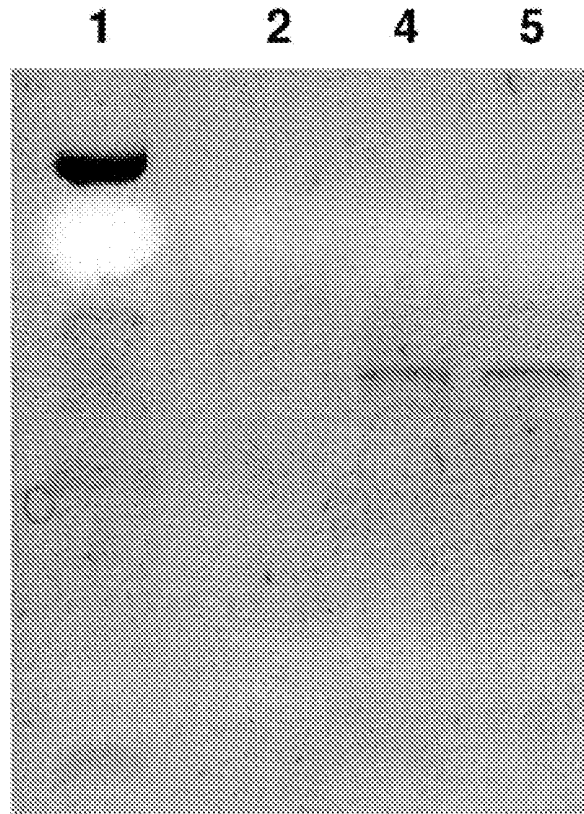


Figura 4

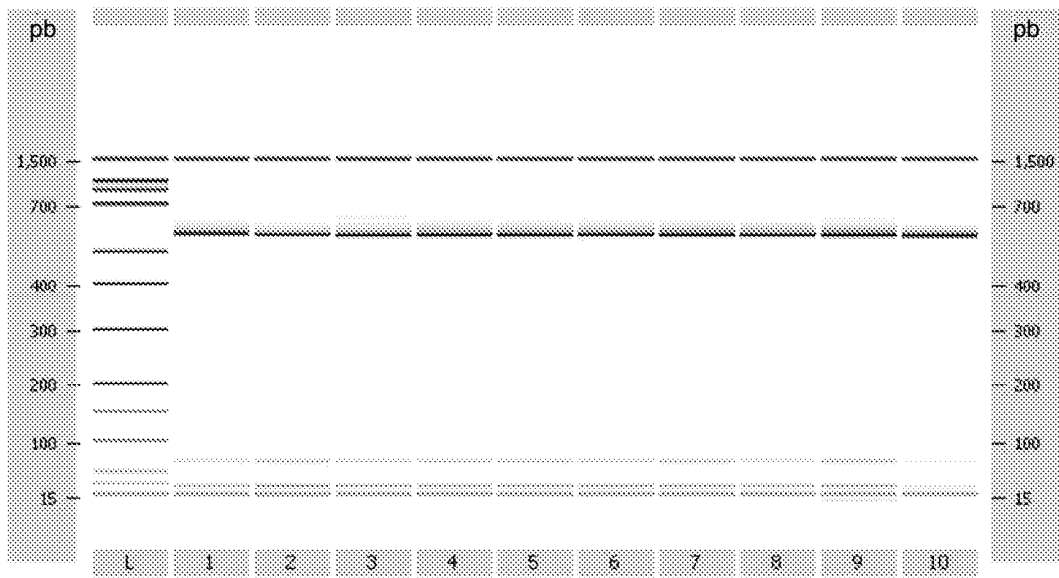




Figura 5

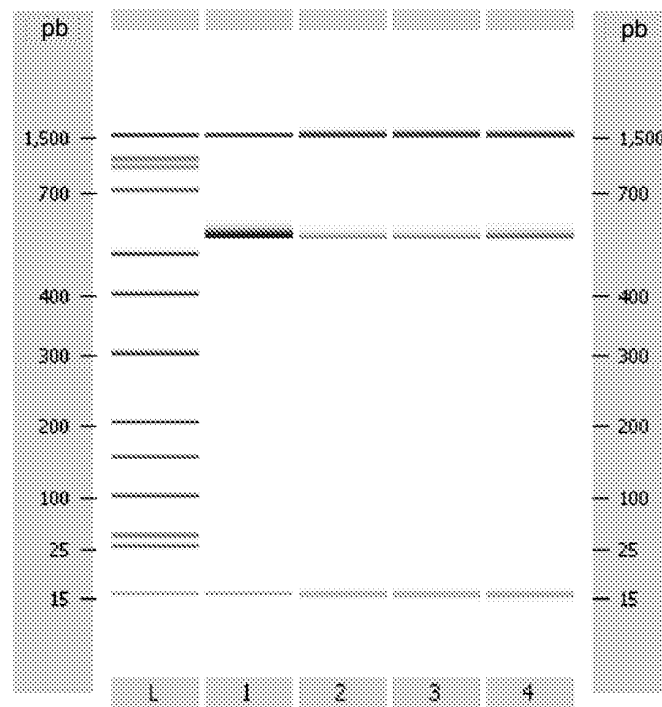


Figura 6

