

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 772**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2015** **PCT/CN2015/073257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16134498**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2015** **E 15882936 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3262060**

54 Título: **Péptidos para su uso en la prevención y tratamiento del ojo seco**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.07.2020

73 Titular/es:

MACKAY MEMORIAL HOSPITAL (100.0%)
No. 92, Sec. 2, Zhongshan N. Rd., Zhongshan
District
Taipei City 104, TW

72 Inventor/es:

HO, TSUNG-CHUAN y
TSAO, YEOU-PING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 772 772 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos para su uso en la prevención y tratamiento del ojo seco

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se define en las reivindicaciones 1-2. La presente divulgación se refiere al descubrimiento de un péptido sintético corto, y su uso para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedad ocular.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La enfermedad del ojo seco (DED, por sus siglas en inglés) es un término general para una variedad de afecciones caracterizadas por anomalías en la película lagrimal, posiblemente como resultado del daño a la superficie corneal. El ojo seco se caracteriza por síntomas como una sensación arenosa rasposa en el ojo, quemazón, irritación o una sensación de cuerpo extraño que empeora durante el día. Los pacientes que padecen DED se quejan de síntomas leves a graves, y aquellos con síntomas graves pueden experimentar irritación ocular constante e incapacitante, y desarrollar enfermedad epitelial de la superficie ocular y ulceración corneal estéril o microbiana que amenaza la vista. Actualmente, los únicos fármacos recetados aprobados por la FDA para el tratamiento de la DED son corticosteroides y Restasis (ciclosporina al 0,05 %). Sin embargo, ninguno de los fármacos puede curar el tejido de la córnea dañado; además, ambos fármacos tardan entre 4-6 meses en producir una mejoría significativa en los síntomas de DED o en la curación del tejido corneal dañado.

25 En consecuencia, existe una necesidad en el campo relacionado de un medicamento y/o método mejorado para tratar y/o prevenir la DED.

Resumen

30 En general, la presente divulgación se refiere al desarrollo de nuevos compuestos y/o el uso de los mismos para tratar y prevenir enfermedades oculares, en particular, la enfermedad del ojo seco (DED).

35 En consecuencia, el primer aspecto de la presente divulgación tiene como objetivo proporcionar un péptido sintético corto capaz de tratar DED. El péptido sintético corto que consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina (SEQ ID NO: 2) o leucina y arginina (SEQ ID NO: 3) o glutamina y arginina (SEQ ID NO: 4) o glutamina y lisina (SEQ ID NO: 5).

40 De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 comprende al menos un resto de aminoácido en forma D. En algunos ejemplos, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 tiene dos restos de aminoácidos en forma D.

45 El segundo aspecto de la presente divulgación tiene como objetivo proporcionar un péptido sintético para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad del ojo seco (DED) en un sujeto. El péptido sintético corto consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina (SEQ ID NO: 2) o leucina y arginina (SEQ ID NO: 3) o glutamina y arginina (SEQ ID NO: 4) o glutamina y lisina (SEQ ID NO: 5). De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, el péptido sintético se usa para ese propósito administrando al sujeto una cantidad eficaz del péptido sintético para mejorar los síntomas relacionados con la DED.

50 De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 comprende al menos un resto de aminoácido en forma D. En algunos ejemplos, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 tiene dos restos de aminoácidos en forma D.

55 Con referencia al uso descrito en el presente documento, en un ejemplo, puede incluir además la administración de una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la calcineurina, un antibiótico, un agonista del receptor de acetilcolina nicotínico y un agente anti-angiogénico para tratar la DED a un sujeto.

60 En algunos ejemplos, el agente antiinflamatorio puede ser ciclosporina. El inhibidor de la calcineurina puede ser voclosporina. El antibiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, teicoplanina, vancomicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, nafcilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polymixina B, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, mafenida, sulfacetamida, sulfametizol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, cotrimoxazol, desmeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina. El agonista del receptor de acetilcolina nicotínico

puede ser cualquiera de pilocarpina, atropina, nicotina, epibatidina, lobelina o imidacloprid. El agente anti-linfangiogénico puede ser un anticuerpo del factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C), un anticuerpo de VEGF-D o un anticuerpo de VEGF-3.

5 De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, el sujeto que se va a tratar es un ser humano.

El péptido sintético según la presente invención como se define en la reivindicación 1 puede usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de DED.

10 Breve descripción de los dibujos

La presente descripción se puede comprender a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee en relación con los dibujos adjuntos, en donde:

15 La Fig. 1A son fotografías de tejido corneal teñido con fluoresceína que representan los efectos profilácticos del presente péptido sintético sobre la desecación de ratones estresados de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación;
 La Fig. 1B es un gráfico de barras que representa el análisis cuantitativo de la Fig. 1A;
 la Fig. 2 ilustra los efectos del presente péptido sintético sobre las capacidades de producción de lágrimas en la
 20 desecación de ratones estresados de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación;
 La Fig. 3A son fotografías de tejido corneal teñido con fluoresceína que representan los efectos terapéuticos del presente péptido sintético sobre la desecación de ratones estresados de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación;
 la Fig. 3B es un gráfico de barras que representa el análisis cuantitativo de la Fig. 3A;
 25 la Fig. 4A son fotografías que ilustran el examen histológico de la sección de la córnea mediante tinción con H&E de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación;
 la Fig. 4B es un gráfico de barras que representa el análisis cuantitativo de la Fig. 4A; y
 la Fig. 5A son fotografías del epitelio conjuntival teñido con PAS de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, en el que las células caliciformes (rosadas, positivas a la tinción de PAS) se indican con flechas; y
 30 la Fig. 5B es un gráfico de barras que representa el análisis cuantitativo de la Fig. 5A.

Descripción

35 La descripción detallada proporcionada a continuación en relación con los dibujos adjuntos pretende ser una descripción de los presentes ejemplos y no pretende representar las únicas formas en que la presente invención puede construirse o utilizarse. La descripción establece las funciones de la presente invención y la secuencia de etapas para construirlas y aplicarlas.

1. DEFINICIONES

40 Por conveniencia, en esta sección se recopilan determinados términos empleados en el contexto de la presente divulgación. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente el experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

45 Como se usa en el presente documento, el término "péptido" denota un polímero de restos de aminoácidos. Por el término "péptido sintético" como se usa en el presente documento, se entiende un péptido que no comprende una molécula proteica de origen natural completa. El péptido es "sintético" porque puede ser producido por intervención humana usando técnicas tales como síntesis química, técnicas genéticas recombinantes o fragmentación de antígeno completo o similares. A lo largo de la presente divulgación, las posiciones de cualquier resto de aminoácido especificado dentro de un péptido se numeran a partir del extremo N del péptido.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de péptidos sintéticos identificados en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia
 55 candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de péptidos específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como
 60 los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para fines del presente documento, la comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevó a cabo mediante el programa informático Blastp (proteína-proteína BLAST) provisto en línea por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una
 65

secuencia de aminoácidos A dada que tiene un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula mediante la fórmula de la siguiente manera:

$$\frac{X}{Y} \times 100 \%$$

donde X es el número de restos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia BLAST en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en A o B, el que sea más corto.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento pretende significar obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, por ejemplo, retrasar, inhibir o mejorar las afecciones asociadas con la enfermedad del ojo seco. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" como se usa en el presente documento incluye el tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico), curativo o paliativo de una enfermedad en un mamífero, particularmente un ser humano; e incluye: (1) el tratamiento preventivo (por ejemplo, profiláctico), curativo o paliativo de una enfermedad o afección que se produce en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado como que la tiene; (2) inhibir una enfermedad (por ejemplo, deteniendo su desarrollo); o (3) aliviar una enfermedad (por ejemplo, reducir los síntomas asociados con la enfermedad).

El término "administrado", "administrar" o "administración" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un modo de suministro, incluyendo, sin limitación, administrando por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intracraneal o subcutánea un agente (por ejemplo, un compuesto o una composición) de la presente invención.

La expresión "una cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado con respecto al tratamiento de una enfermedad. Por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco, un agente (es decir, un compuesto, un péptido sintético o un ácido nucleico que codifica un péptido terapéutico) que disminuye, previene, retrasa o suprime o detiene cualquier síntoma de la enfermedad del ojo seco sería eficaz. No se requiere una cantidad eficaz de un agente para curar una enfermedad o afección, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o afección de tal manera que el inicio de la enfermedad o afección se retrase, obstaculice o prevenga, o los síntomas de la enfermedad o afección mejoren. La cantidad eficaz puede dividirse en una, dos o más dosis en una forma adecuada para administrarse en una, dos o más veces durante un período de tiempo designado.

El término "mamífero" se refiere a todos los miembros de la clase Mammalia, incluyendo seres humanos, primates, animales domésticos y de granja, tal como conejo, cerdo, oveja y vaca; así como animales de zoológicos, deportivos o mascotas; y roedores, tal como un ratón o una rata. La expresión "mamífero no humano" se refiere a todos los miembros de la clase Mammalia excepto seres humanos.

El término "sujeto" o "paciente" se usa indistintamente en el presente documento y pretende significar un animal que incluye la especie humana que es tratable por el péptido sintético de la presente invención. El término "sujeto" o "paciente" pretende referirse tanto al género masculino como al femenino a menos que se indique específicamente un género. En consecuencia, el término "sujeto" o "paciente" comprende cualquier mamífero que pueda beneficiarse de un tratamiento con el péptido sintético de la presente invención. Ejemplos de un "sujeto" o "paciente" incluyen, aunque sin limitación, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaros y aves. En un ejemplo, el paciente es un ser humano.

La expresión "transportador, excipiente o estabilizante farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un vehículo, agente o compuesto adecuado que es farmacéuticamente aceptable para administración oftálmica. Como se usa en el presente documento, la expresión "composición oftálmica" denota una composición destinada a la aplicación en el ojo o destinada al tratamiento de un dispositivo para ponerlo en contacto con el ojo, tal como una lente de contacto.

La expresión "enfermedad del ojo seco (DED)" como se usa en el presente documento pretende significar cualquier trastorno caracterizado por la sequedad persistente de la conjuntiva y la opacidad de la córnea que fue el resultado de cualquiera de los siguientes, disminución de la producción de lágrimas, evaporación excesiva de las lágrimas, una anomalía en la producción de moco o lípidos que normalmente se encuentran en la capa lagrimal. Las causas de DED incluyen, aunque sin limitación, exposición a ambientes secos como aviones y lugares de trabajo, deficiencia de vitamina A, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, quemaduras químicas o térmicas, medicamentos tal como atenolol, clorfeniramina, hidrocortizida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacino, oxibutinina y tolterodina.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan de la forma más precisa

posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente determinados errores que son necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo. Además, como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" generalmente significa dentro del 10 %, 5 %, 1 % o 0,5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, el término "aproximadamente" significa dentro de un error estándar aceptable de la media cuando lo considera un experto en la materia. Aparte de en los ejemplos operativos/de trabajo, o a menos que se especifique expresamente lo contrario, todos los intervalos numéricos, cantidades, valores y porcentajes tal como aquellos para cantidades de materiales, duración de tiempos, temperaturas, condiciones operativas, las proporciones de cantidades, y similares de los mismos divulgados en el presente documento, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la presente divulgación son aproximaciones que pueden variar según se desee. Muy al final, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

Las formas en singular "un/a", "y" y "el/la" se usan en el presente documento para incluir referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

2. Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente divulgación está basada, al menos en parte, en el descubrimiento de péptidos sintéticos cortos que son capaces de tratar y/o prevenir que un sujeto desarrolle una enfermedad ocular, tal como la enfermedad del ojo seco (DED). En consecuencia, esta invención proporciona además que comprende el uso de los péptidos sintéticos recientemente identificados para el tratamiento y/o la profilaxis de la DED.

2.1 Los presentes péptidos sintéticos

El péptido sintético corto que de la presente divulgación consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina o leucina y arginina o glutamina y arginina o glutamina y lisina.

De acuerdo con ejemplos adicionales, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 puede comprender al menos un resto de aminoácido en forma D. En algunos ejemplos, el péptido sintético de la SEQ ID NO: 1 tiene dos restos de aminoácidos en forma D.

El presente péptido sintético puede sintetizarse de acuerdo con cualquier protocolo convencional de síntesis de péptidos en la técnica. En un ejemplo, los presentes péptidos sintéticos se sintetizaron mediante el uso de un sintetizador de péptidos en fase sólida (sintetizador de péptidos ABI433A, Applied Biosystems Inc., Life Technologies Corp., Foster City, CA, EE.UU) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Los péptidos sintéticos de la presente divulgación se designan como 7-mer (X₁, X₂) (SEQ ID NO: 1), 7-mer (SEQ ID NO: 2), 7-mer (V→L) (SEQ ID NO: 3), 7-mer (V→Q) (SEQ ID NO: 4), y 7-mer (VR→QK) (SEQ ID NO: 5) y se describen en detalle en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Los presentes péptidos sintéticos

N.º de Péptido	Secuencia de Aminoácidos	SEQ ID NO
7-mer (X ₁ , X ₂)	NH ₂ -Asp-Leu-Tyr-Arg-X ₁ -X ₂ -Ser-COOH o DLYRX ₁ X ₂ S	1
7-mer	NH ₂ -Asp-Leu-Tyr-Arg-Val-Arg-Ser-COOH o DLYRVRS	2
7-mer (V→L)	NH ₂ -Asp-Leu-Tyr-Arg-Leu-Arg-Ser-COOH o DLYRLRS	3
7-mer (V→Q)	NH ₂ -Asp-Leu-Tyr-Arg-Gln-Arg-Ser-COOH o DLYRQRS	4
7-mer(VR→QK)	NH ₂ -Asp-Leu-Tyr-Arg-Gln-Lys-Ser-COOH o DLYRQKS	5

X₁, X₂ son respectivamente cualquier aminoácido.

Cualquier persona experta en esta materia puede modificar los péptidos sintetizados por métodos (tal como un programa de simulación por ordenador) que predicen el efecto sobre la conformación de polipéptidos de un cambio en la secuencia de polipéptidos y, por lo tanto, pueden "diseñar" o "modificar" el presente péptido sintético (por ejemplo, 7-mer) basándose en la información divulgada en el presente documento proponiendo y probando un péptido sintético modificado para determinar si el péptido sintético modificado conserva una función o conformación deseada. El presente péptido sintético (por ejemplo, 7-mer) puede modificarse específicamente para alterar una característica del péptido no relacionada con su actividad fisiológica. Por ejemplo, determinados aminoácidos se pueden cambiar y/o eliminar sin afectar la actividad fisiológica del péptido en este estudio (es decir, su capacidad para tratar la DED). De acuerdo con algunos ejemplos, los restos de aminoácidos quinto y sexto (valina y arginina, respectivamente) del 7-mer pueden sustituirse por cualquier resto de aminoácido sin afectar su capacidad para tratar y/o prevenir la DED. Por lo tanto, esta divulgación abarca derivados funcionalmente equivalentes del péptido sintético preferido de la SEQ ID NO: 2 (es decir, 7-mer), incluyendo los péptidos que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos.

De acuerdo con otros ejemplos, los restos de aspartato (D) y serina (S) ubicados respectivamente en los extremos N

y C de la SEQ ID NO: 2 se eliminan, y los péptidos resultantes designados respectivamente como 7-mer-ΔD (LYRVRS, SEQ ID NO: 6) y 7-mer-ΔS (DLRVRS, SEQ ID NO: 7) no poseen ninguna función biológica hacia DED. En consecuencia, los restos de aspartato (D) y serina (S) ubicados respectivamente en los extremos N y C de la SEQ ID NO: 2 son necesarios para la capacidad del presente péptido sintético para tratar DED, estos dos restos solo se pueden sustituir por restos de aminoácidos conservativos.

Como alternativa, los presentes péptidos sintéticos pueden prepararse usando tecnología recombinante. Por ejemplo, se puede clonar un ácido nucleico que codifica el presente péptido en un vector de expresión, en el que el ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora adecuada para expresar el presente péptido en una célula hospedadora. Entonces se puede introducir el vector en una célula hospedadora adecuada para expresar el péptido. El polipéptido recombinante expresado puede purificarse a partir de la célula hospedadora por métodos tales como precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de fraccionamiento. Un péptido preparado de este modo puede analizarse para determinar su actividad de acuerdo con el método descrito en los ejemplos a continuación.

Los ácidos nucleicos o polinucleótidos mencionados anteriormente pueden suministrarse mediante el uso de dispositivos de suministro de micropartículas o microcápsulas poliméricas biodegradables conocidas en la técnica. Otra forma de lograr la absorción del ácido nucleico en un hospedador es usando liposomas, preparados por métodos convencionales. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de suministro o incorporarse conjuntamente con anticuerpos específicos de tejido. Como alternativa, se puede preparar un conjugado molecular compuesto por un plásmido u otro vector unido a la poli-L-lisina por fuerzas electrostáticas o covalentes. Como alternativa, el direccionamiento específico de tejido se puede lograr mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que se conocen en la técnica. EL suministro de "ADN desnudo" (es decir, sin un vehículo de suministro) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio para lograr la expresión *in vivo*.

2.2 Composiciones para el tratamiento y/o profilaxis de la DED

Los presentes péptidos sintéticos son adecuados para tratar a un sujeto que padece la DED o para prevenir que un sujeto desarrolle la DED.

En consecuencia, un aspecto adicional de la presente divulgación es el uso del presente péptido sintético para tratar y prevenir la DED. Se puede fabricar un medicamento para tal uso mezclando una cantidad adecuada del presente péptido sintético con un transportador, excipiente o estabilizante farmacéuticamente aceptable en una composición adecuada para administración oftálmica, tal como una formulación liofilizada o una solución acuosa. De acuerdo con la presente invención, el péptido sintético se selecciona del grupo de péptidos cuya secuencia es cualquiera de las SEQ ID NO: 2-5.

La cantidad del péptido presente en la composición dependerá del péptido utilizado. El péptido generalmente estará presente en la composición en la cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0 % en peso; en particular en una cantidad de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % en peso, tal como 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, y 5,0 % en peso.

Los portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables para su uso con los péptidos sintéticos son bien conocidos en la técnica relevante, e incluyen, pero sin limitación, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilo amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenos de alquilo tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteínas); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo, TWEEN®), poloxámeros (por ejemplo, PLURONICS®), o polietilenglicol (PEG).

En un ejemplo particular, una composición que comprende el péptido sintético puede formularse y administrarse mediante aplicación tópica. Las formulaciones tópicas son generalmente de naturaleza acuosa, tamponadas a un pH fisiológico aceptable y generalmente conservadas para la dispensación múltiple. Por consiguiente, en un ejemplo particular, la composición es una composición oftálmica tópica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz

del presente péptido sintético (es decir, 7-mer, 7-mer ($V \rightarrow L$), 7-mer ($V \rightarrow Q$) o 7-mer ($VR \rightarrow QK$)) y un transportador farmacéuticamente aceptable para dicho péptido en donde el transportador farmacéuticamente aceptable es un transportador adecuado para la administración oftálmica tópica. Como es bien conocido por los expertos en la materia, se pueden utilizar varios tipos de vehículos. Los vehículos serán generalmente de naturaleza acuosa. Generalmente se prefieren las soluciones acuosas, basándose en la facilidad de formulación, así como en la capacidad de los pacientes para administrar fácilmente tales composiciones mediante la instilación de una a dos gotas de las soluciones en los ojos afectados. Sin embargo, el péptido sintético proporcionado por la invención también puede incorporarse fácilmente en otros tipos de composiciones, tales como suspensiones, geles viscosos o semiviscosos u otros tipos de composiciones sólidas o semisólidas. Se pueden preferir suspensiones para péptidos que son relativamente insolubles en agua. Las composiciones oftálmicas también pueden incluir varios ingredientes diferentes, tales como tampones, conservantes, codisolventes y agentes de construcción de la viscosidad.

En relación con cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, es preferible que se incluya una cantidad eficaz de tampón para mantener el pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, preferentemente aproximadamente 7. Los tampones utilizados son los conocidos por los expertos en la materia, y algunos ejemplos son tampones de acetato, ascorbato, borato, bicarbonato, carbonato, citrato y fosfato. Preferentemente, el tampón comprende borato. Una cantidad eficaz de tampón necesario se puede determinar fácilmente por un experto en la materia sin experimentación indebida. En los casos en que el tampón comprende borato, es preferible que la concentración del tampón de borato sea de aproximadamente 0,6 %.

En cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, es preferible incluir un agente de tonicidad. Los agentes de tonicidad se usan en composiciones oftálmicas para ajustar la concentración de material disuelto al intervalo isotónico deseado. Los expertos en la materia oftálmica conocen agentes de tonicidad, y algunos ejemplos incluyen glicerina, manitol, sorbitol, cloruro de sodio y otros electrolitos. Preferentemente, el agente de tonicidad es cloruro sódico.

Las formulaciones oftálmicas se envasan generalmente en forma multidosis. Por lo tanto, se requieren conservantes para evitar la contaminación microbiana durante su uso. También puede haber razones para usar un conservante en composiciones de un solo uso, dependiendo de las circunstancias individuales. El término "conservante" tiene el significado comúnmente entendido en la técnica oftálmica. Los conservantes se usan para prevenir la contaminación bacteriana en preparaciones oftálmicas de uso múltiple, y los ejemplos incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, metil parabeno, propil parabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico, polyquaternium-1, complejos de oxiclono estabilizados (también conocidos como Purite®), acetato fenilmercúrico, clorobutanol, alcohol bencílico u otros agentes conocidos por los expertos en la materia. Dichos conservantes se emplean generalmente a un nivel de 0,001 a 1,0 por ciento en peso, basándose en el peso total de la composición (% en peso).

En determinadas circunstancias, se podría usar un tensioactivo u otro codisolvente apropiado en cualquiera de las composiciones proporcionadas por esta divulgación. Los términos "tensioactivo" y "codisolvente" usados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido en la técnica. Los tensioactivos se usan para ayudar a solubilizar el agente terapéuticamente activo u otros componentes insolubles de la composición, y también pueden servir para otros fines. Ejemplos ilustrativos de dichos compuestos incluyen aceites de ricino polietoxilados, Polisorbato 20, 60 y 80; Pluronic® F-68, F-84 y P-103 (BASF Corp., Parsippany NJ, EE. UU.); ciclodextrinas; u otros agentes conocidos por los expertos en la materia. Se pueden usar todos los tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros, zwitteriónicos y no iónicos en ejemplos de la divulgación. Para los fines de la presente divulgación, es preferible que un tensioactivo no iónico, tal como polisorbatos, poloxámeros, etoxilatos alcohólicos, copolímeros de bloqueo de etilenglicol-propilenglicol, amidas de ácidos grasos, etoxilatos de alquilfenol o fosfolípidos, se use en situaciones en las que es deseable usar un tensioactivo. Tales tensioactivos o codisolventes se emplean generalmente a un nivel de 0,01 a 2 % en peso.

Puede ser deseable una viscosidad mayor que la de las soluciones acuosas simples para aumentar la absorción ocular del principio activo, disminuir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de formulación y/o, de otra manera, mejorar la formulación oftálmica. Dichos agentes desarrolladores de la viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa u otros agentes conocidos por los expertos en la materia. Tales agentes se emplean generalmente a un nivel de 0,01 a 2 % en peso.

Otro tipo de compuesto que podría usarse en cualquier composición con el péptido sintético de esta invención es un agente quelante. El término agente quelante se refiere a un compuesto que es capaz de complejar un metal, tal como lo entienden los expertos en la materia química. Los agentes quelantes se usan en composiciones oftálmicas para potenciar la eficacia conservante. Mientras que algunos agentes quelantes útiles para los propósitos de esta divulgación son sales de edetato, como edetato disódico, edetato de calcio disódico, edetato de sodio, edetato trisódico y edetato dipotásico.

En un ejemplo de la presente divulgación, el presente péptido sintético puede administrarse en forma de una composición tópica adecuada para aplicación oftálmica, tal como gotas para los ojos, ungüentos, cremas, etc.

Las composiciones que incluyen el péptido sintético de la presente invención pueden administrarse por vía tópica al ojo. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, se puede administrar al paciente de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) del presente péptido sintético. Una dosificación diaria o semanal típica podría variar desde aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más. Las dosis utilizadas para cualquiera de los propósitos de administración tópica descritos anteriormente serán generalmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal (mg/kg), administradas de una a varias, por ejemplo, cuatro, seis, ocho o incluso más, veces por día.

En otro ejemplo de la presente divulgación, la composición comprende dos o más péptidos sintéticos, en donde al menos uno de ellos es el 7-mer o un derivado del mismo (tal como 7-mer (V → L), 7-mer (V → Q) o 7-mer (VR → QK) y que tiene la capacidad de tratar o prevenir la DED. En un ejemplo, los péptidos sintéticos pueden formularse para su uso separado, simultáneo o sucesivo.

De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, la composición también puede ser parte de un kit, en donde un "kit" se entiende como un producto que contiene el péptido o péptidos sintéticos proporcionados por la presente invención y/o los compuestos terapéuticos adicionales que forman la composición envasada de modo que se permite el transporte, almacenamiento y administración simultánea o sucesiva de la misma. Por lo tanto, dichos kits pueden contener una o más suspensiones, jeringas y similares que contienen los péptidos sintéticos de la invención y que pueden prepararse en una dosis única o en dosis múltiples. El kit puede contener adicionalmente un vehículo adecuado para solubilizar los péptidos sintéticos tales como medios acuosos tal como solución salina, solución de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio; medios solubles en agua tal como alcohol, polietilenglicol, propiltilenglicol; y vehículos insolubles en agua si fuera necesario. Otro componente que puede estar presente en el kit es un envase que permite mantener las composiciones dentro de límites determinados. Los materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobrecitos y similares.

El kit puede contener adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o por separado de las diferentes formulaciones presentes en el kit. En otras palabras, el kit puede comprender adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o por separado de los diferentes componentes. Dichas instrucciones pueden ser en forma de material impreso o en forma de soporte electrónico que pueda almacenar las instrucciones para que un sujeto pueda leerlas, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener adicional o alternativamente páginas web de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

2.3 Uso de un péptido sintético para el tratamiento y/o profilaxis de la DED

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos sintéticos descritos en la presente invención (reivindicación 1) son útiles para la prevención y/o el tratamiento de la DED (reivindicación 2).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un péptido sintético para su uso en la prevención y/o tratamiento de la DED. Para ese propósito, un medicamento o una composición que comprende un péptido sintético corto que consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina (SEQ ID NO: 2) o leucina y arginina (SEQ ID NO: 3) o glutamina y arginina (SEQ ID NO: 4) o glutamina y lisina (SEQ ID NO: 5); y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un ejemplo de la presente divulgación, el péptido sintético está en forma de una composición, en donde la composición comprende uno o más de los péptidos sintéticos, en donde el péptido sintético se selecciona del grupo de péptidos cuya secuencia es cualquiera de SEQ ID NO: 2-5, o una combinación de las mismas.

En un ejemplo de la presente divulgación, tratar y prevenir la DED mediante el uso del péptido sintético descrito en el presente documento puede incluir además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la calcineurina, un antibiótico, un agonista del receptor de acetilcolina nicotínico y un agente anti-linfangiogénico para tratar la DED.

En algunos ejemplos, el agente antiinflamatorio puede ser ciclosporina. El inhibidor de la calcineurina puede ser voclosporina. El antibiótico puede seleccionarse del grupo que consiste en, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, teicoplanina, vancomicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, nafcilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacino, enoxacina, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacina, moxifloxacino, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, mafenida, sulfacetamida, sulfametizol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, cotrimoxazol, desmeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina. El agonista del receptor de acetilcolina nicotínico puede ser cualquiera de pilocarpina, atropina, nicotina, epibatidina, lobelina o imidacloprid. El agente anti-linfangiogénico puede ser un anticuerpo del factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C), un anticuerpo de VEGF-D o un anticuerpo de VEGF-3,

Un sujeto adecuado para el tratamiento es un ser humano.

La presente invención, que se define en las reivindicaciones 1-2, a continuación se describirá más específicamente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan con el propósito de demostración en lugar de limitación.

Ejemplos

Materiales y métodos

Materiales

La carboximetilcelulosa sódica (CMC), el reactivo ácido peryódico de Schiff (PAS) y la dexametasona fueron todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Se utilizó CMC (1% p/v) en solución salina equilibrada como vehículo de 7-mer. Todos los péptidos fueron sintetizados por GenScript (Piscataway, NJ, EE.UU.), en el que cada péptido se modificó por acetilación en el extremo NH₂ y amidación en el extremo COOH para mejorar su estabilidad, y posteriormente se caracterizó mediante espectrometría de masas (> 95 % de pureza).

Animales experimentales

Se usaron ratones C57BL/6 (7-8 semanas de edad, cada uno con un peso aproximado de 18 a 25 g) en el presente estudio. Todos los ratones se mantuvieron en las instalaciones de animales de acuerdo con los procedimientos aprobados por la Junta de Revisión del Hospital Mackay Memorial (Taiwán, R.O. C.). Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron de acuerdo con la Declaración de ARVO para el Uso de Animales en la Investigación Oftálmica y de la Visión.

Modelo Animal de Ojo Seco

Los ojos secos se indujeron colocando ratones en una cámara de ambiente controlado (CEC, por sus siglas en inglés) de acuerdo con los procedimientos descritos previamente por Barabino et al (IVOS (2005) 46 (8), 2766-2771). Los ratones colocados en la CEC fueron expuestos a una humedad relativa (HR) < 25 %, temperatura de 20 a 22 °C y flujo de aire de 15 Umin, 12 horas por día. Los ratones de control se mantuvieron en un entorno normal (HR > 50 %, sin flujo de aire, temperatura de 21-23 °C) durante la misma duración.

Tinción corneal con fluoresceína

Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de zoletil (6 mg/kg) y xilazina (3 mg/kg). La lesión epitelial corneal se determinó mediante tinción con fluoresceína tópica (Fluor-I-Strip, Ayerst Laboratories, Filadelfia, PA). Tinción corneal con fluoresceína se examinó con un biomicroscopio con lámpara de hendidura bajo luz azul cobalto y se fotografió con una cámara digital. Los datos se presentan como media ± DT. El número de puntos de tinción de fluoresceína se calificó en la zona central de la córnea de 1 mm de cada ojo, en una escala normalizada de cinco puntos (0 puntos, grado 0; 1-5 puntos, grado 1; 6-15 puntos, grado 2; 16-30 puntos, grado 3; 30 puntos, grado 4). Se añadió un punto a la puntuación si había un área de tinción confluyente, y se añadieron dos puntos para dos o más áreas de confluencia. (Li J et al., Mole Vision 2012, 18, 317).

Medición de la Producción Lacrimal

La producción de lágrimas se midió mediante hilos de algodón impregnados con rojo fenol (Zone-Quick; Oasis, Glendora, CA). La validez de esta prueba en ratones se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos previamente por Dursun et al. (IVOS (2002) 43, 632-638). Los hilos se sostuvieron con pinzas de joyero y se colocaron en el canto lateral durante 60 segundos. La producción de lágrimas se expresa en milímetros de hilo mojado por la lágrima y cambiado a rojo.

Histopatología epitelial corneal

El daño epitelial corneal se evaluó como se describió anteriormente (Pflugfelder et al., 2005, Am J Pathol 166, 61-71). En resumen, el número de células apicales desprendidas se contó desde un campo de visión de microscopio completo de tres secciones de tejido separadas, por dos observadores con enmascaramiento independientes, utilizando un objetivo de 20. Se evaluaron tres ratones en cada tratamiento.

Tinción de células caliciformes con ácido peryódico de Schiff (PAS)

Después de que los animales se sacrificaran, los ojos se extirparon quirúrgicamente, se fijaron en formalina al 10 %, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm. Las secciones se tiñeron con el reactivo PAS (Sigma-Aldrich) adecuado para detectar células caliciformes en la conjuntiva superior e inferior, las secciones teñidas con PAS se examinaron y se fotografiaron con un microscopio equipado con una cámara digital.

Estadísticas

Los resultados se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). Se utilizó ANOVA de 1 vía para las comparaciones estadísticas. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

Ejemplo 1 el presente péptido sintético evita la desecación del ojo seco inducida por estrés

El ojo seco se creó en ratones usando una cámara de ambiente controlado (CEC) de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección "materiales y métodos". El tratamiento se inició el primer día cuando los ratones se alojaron en CEC, en el que el presente péptido sintético (es decir, 7-mer, 100 μ M), vehículo peptídico (1 % de CMC), o péptidos derivados de 7-mer (es decir, 7-mer- Δ D, 7-mer- Δ S, 7-mer (V $\rightarrow$ L) y 7-mer (VR $\rightarrow$ QK), 100 μ M) se administraron tópicamente a los ojos tres veces al día durante 14 días. Los péptidos 7-mer- Δ D (LYRVRS, SEQ ID NO: 6) y 7-mer- Δ S (DLRVRS, SEQ ID NO: 7) representaron péptidos con un resto de aminoácido respectivamente eliminado del extremo 5' (D; ácido aspártico) y del extremo 3' (S; Serina) de 7-mer, y se utilizaron como péptidos de control negativo. Además, los efectos de la sustitución de aminoácidos simple y doble en 7-mer que generan 7-mer (V $\rightarrow$ L) y 7-mer (VR $\rightarrow$ QK) también se usaron para tratar el ojo seco.

La tinción con fluoresceína se usó para evaluar los cambios en la integridad del epitelio corneal, y los resultados se ilustran en las Fig. 1A y 1B. Las Fig. 1A son fotografías tomadas en ojos secos tratados respectivamente con el vehículo de CMC al 1%, 7-mer y sus derivados; y la Fig. 1B proporciona el análisis cuantitativo de la Fig. 1A.

Como es evidente de la Fig. 1A, el tratamiento con el vehículo de CMC al 1% no produjo una tinción con fluoresceína destacada en el epitelio corneal, indicando que el tratamiento con vehículo no logró evitar el desecación del daño epitelial corneal inducido por estrés. Por el contrario, se observó una reducción significativa en la tinción con fluoresceína en ratones tratados con 7-mer ($3,8 \pm 0,31$ frente a $1,3 \pm 0,21$), lo que indicó que las estructuras epiteliales corneales estaban relativamente intactas en ratones tratados con 7-mer, una indicación de que el péptido sintético de 7-mer fue capaz de proteger y/o prevenir que los ratones desarrollen DED. También se observaron efectos protectores similares en ratones tratados con péptidos derivados de 7-mer, es decir, 7-mer (V $\rightarrow$ L) y 7-mer (VR $\rightarrow$ QK); mientras que el 7-mer (Δ D) y el 7-mer (Δ S) no tuvieron tal efecto.

Los efectos protectores del 7-mer y sus derivados en la DED también se evaluaron midiendo las lágrimas producidas por los animales de prueba, y los resultados se representan en la Fig. 2.

Después de alojarse en CEC durante 14 días, el volumen de lágrimas producido por los ratones tratados con vehículo de CMC al 1 % disminuyó significativamente en comparación con los ratones sanos normales que no se habían alojado en CEC o que no recibieron ningún tratamiento ($P < 0,05$). Por el contrario, el tratamiento con 7-mer, 7-mer (V $\rightarrow$ L) o 7-mer (VR $\rightarrow$ QK) restableció la capacidad de producción de lágrimas de los ratones que estaban sujetos a estrés por desecación, en comparación con el control del vehículo ($5,1 \pm 0,21$, $5,0 \pm 0,16$ y $4,9 \pm 0,15$ frente a $3,7 \pm 0,25$; Fig. 2); mientras que ni los péptidos 7-mer (Δ D) ni 7-mer (Δ S) poseían tal efecto.

Los resultados de este ejemplo confirmaron que el péptido sintético 7-mer puede evitar que el animal desarrolle DED inducida por estrés por desecación.

Ejemplo 2 el presente péptido sintético ejerce una eficacia terapéutica en la desecación del ojo seco inducida por el estrés

El ojo seco se creó al alojar a los animales de prueba en CEC durante 14 días de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección "materiales y métodos". Después de la confirmación de signos de DED por tinción con fluoresceína (Fig. 3A; panel superior; día 14), los animales fueron retirados de la CEC y colocados en el ambiente normal (día 15), después comenzaron el tratamiento mediante la administración de gotas para los ojos que contenían CMC al 1 %, dexametasona (Dex) al 1 %, 7-mer (100 μ M) o 7-mer (Δ S) (100 μ M) durante 7 días (Fig. 3A; panel inferior; día 21; y Fig. 3B).

Los resultados cuantitativos representados en la Fig. 3B indicaron que dexametasona al 0,1 % y el péptido de control 7-mer (Δ S) no tuvieron efecto terapéutico hacia la DED; por el contrario, el péptido sintético de 7-mer de la presente divulgación puede reducir significativamente la puntuación de tinción corneal con fluoresceína, en comparación con la de los ratones de control tratados con CMC al 1 % ($1,5 \pm 0,18$ frente a $3,6 \pm 0,26$; Fig. 3B).

Se identificaron células apicales superficiales desprendidas en secciones de tejido de córnea teñidas con H&E tomadas de ratones tratados con vehículo de CMC al 1 %, Dex al 0,1 % así como con el péptido de control 7-mer (Δ S) (Fig. 4A), mientras que no se encontraron células desprendidas en tejidos de la córnea tomados de ratones sanos normales y ratones tratados con 7-mer. El péptido sintético de 7-mer de la presente divulgación puede reducir significativamente las células apicales superficiales desprendidas, en comparación con la de los ratones de control tratados con CMC al 1 % o 7-mer (Δ S) ($2,1 \pm 0,37$ frente a $14 \pm 1,06$ y $13,8 \pm 1,03$; Fig. 4B).

Las células caliciformes son el tipo de célula primaria en el epitelio responsable de la secreción de mucinas, que es

uno de los componentes de la capa lagrimal que ayuda a mantener la córnea en un ambiente hidratado. La sección corneal teñida con PAS reveló una reducción significativa en el número de células caliciformes en ratones alojados en condiciones de desecación durante 14 días, así como en ratones estresados por desecación tratados con CMC al 1 % o 7-mer (ΔS) (Fig. 5A, paneles inferiores); mientras que el número de células caliciformes en ratones estresados por desecación tratados con el péptido sintético 7-mer es relativamente el mismo que el de los ratones sanos normales (Fig. 5A, panel superior). El péptido sintético de 7-mer de la presente divulgación puede inducir significativamente el crecimiento de las células caliciformes, en comparación con el de los ratones de control tratados con CMC al 1 % ($12,7 \pm 1,28$ frente a $7,5 \pm 0,96$, Fig. 5B).

Tomados conjuntamente, los resultados mencionados anteriormente confirman una nueva función del péptido sintético corto de la presente divulgación sobre el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad del ojo seco.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TSAO Yeou-Ping HO Tsung-Chuan

<120> USO DE PÉPTIDO SINTÉTICO CORTO PARA EL TRATAMIENTO Y/O PROFILAXIS DE LA ENFERMEDAD DEL OJO SECO

<130> P2861-PCT

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5..6

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 1

Asp Leu Tyr Arg Xaa Xaa Ser
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

Asp Leu Tyr Arg Val Arg Ser
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

ES 2 772 772 T3

		Asp Leu Tyr Arg Leu Arg Ser 1 5
5	<210> 4 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Construcción sintética <400> 4	
		Asp Leu Tyr Arg Gln Arg Ser 1 5
15	<210> 5 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética <400> 5	
25		Asp Leu Tyr Arg Gln Lys Ser 1 5
30	<210> 6 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Construcción sintética <400> 6	
		Leu Tyr Arg Val Arg Ser 1 5
40	<210> 7 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Construcción sintética <400> 7	
50		Asp Leu Tyr Arg Val Arg 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético corto consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina (SEQ ID NO: 2) o leucina y arginina (SEQ ID NO: 3) o glutamina y arginina (SEQ ID NO: 4) o glutamina y lisina (SEQ ID NO: 5).
2. El péptido sintético para su uso en el tratamiento y prevención de una enfermedad del ojo seco (DED), en donde el péptido sintético corto consiste en 7 restos de aminoácidos consecutivos establecidos como DLYRX₁X₂S (SEQ ID NO: 1), en donde X₁ y X₂ son respectivamente valina y arginina (SEQ ID NO: 2) o leucina y arginina (SEQ ID NO: 3) o glutamina y arginina (SEQ ID NO: 4) o glutamina y lisina (SEQ ID NO: 5).

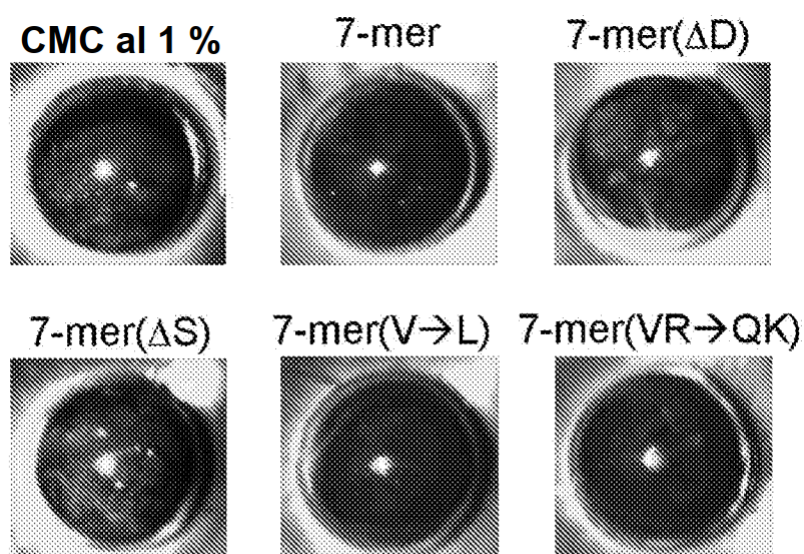


Fig. 1A

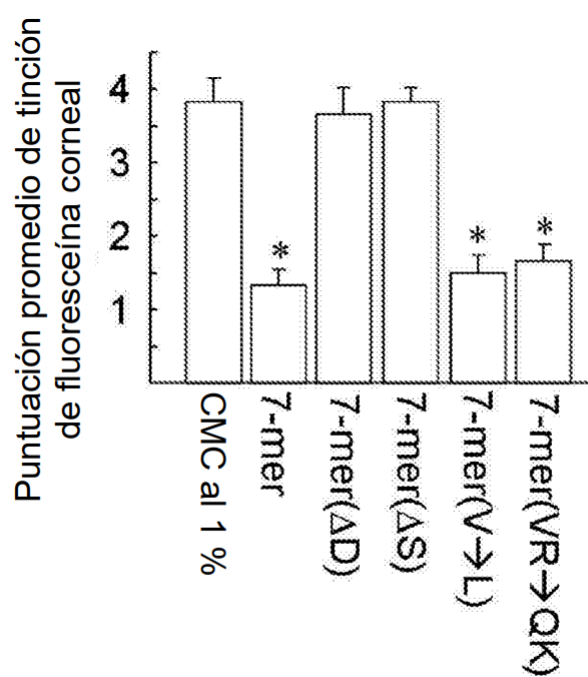


Fig. 1B

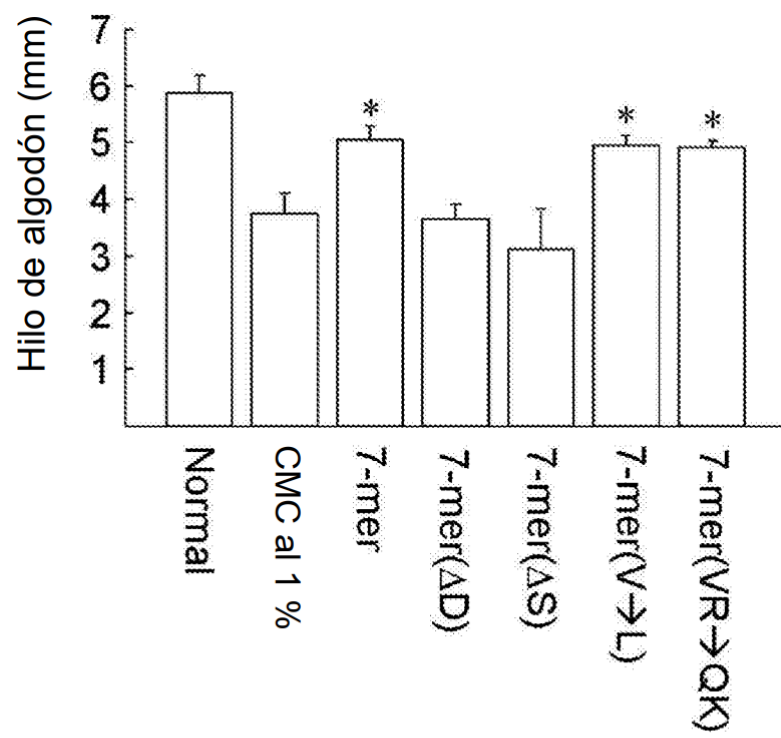


Fig. 2

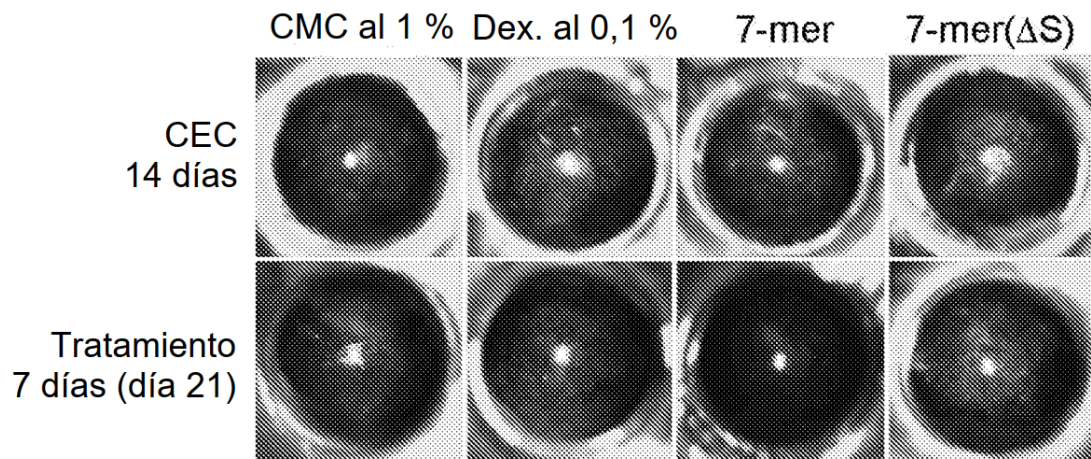


Fig. 3A

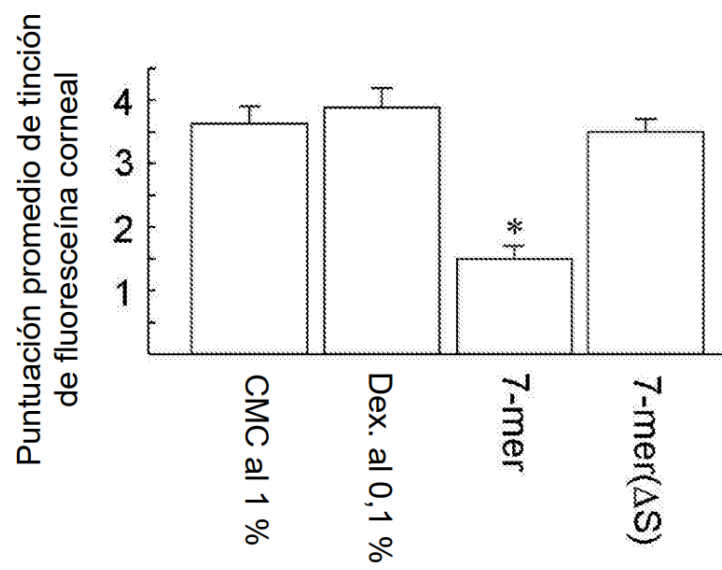


Fig. 3B

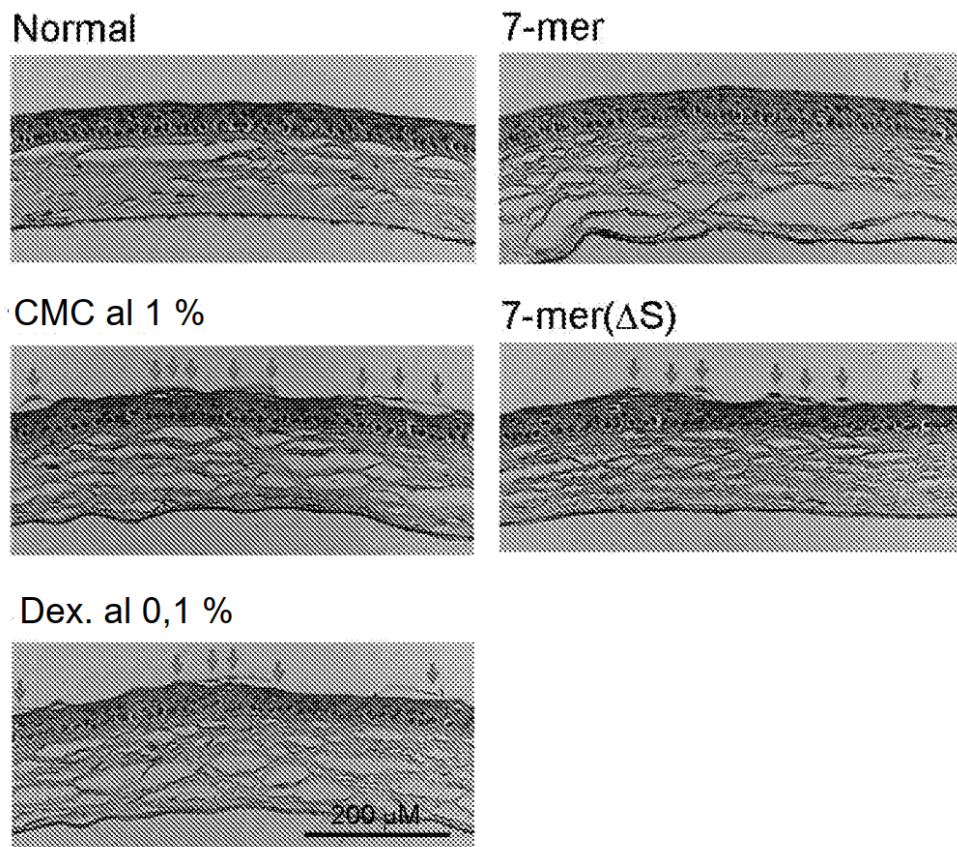


Fig. 4A

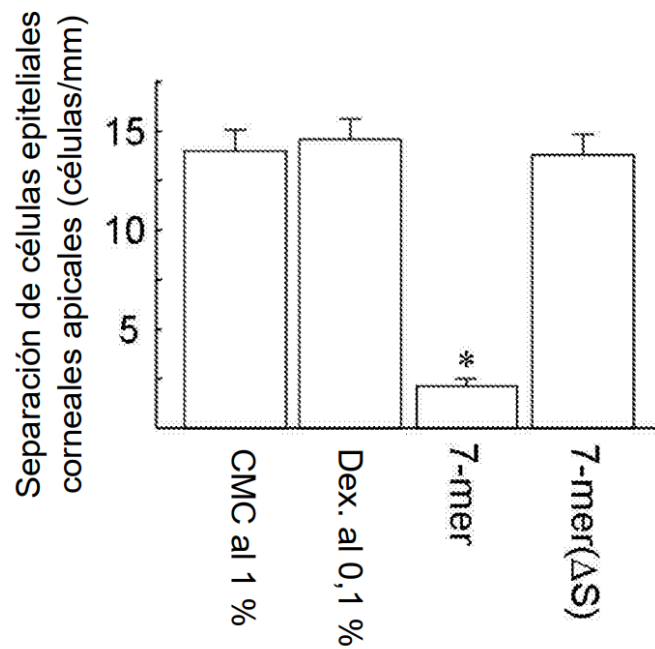


Fig. 4B

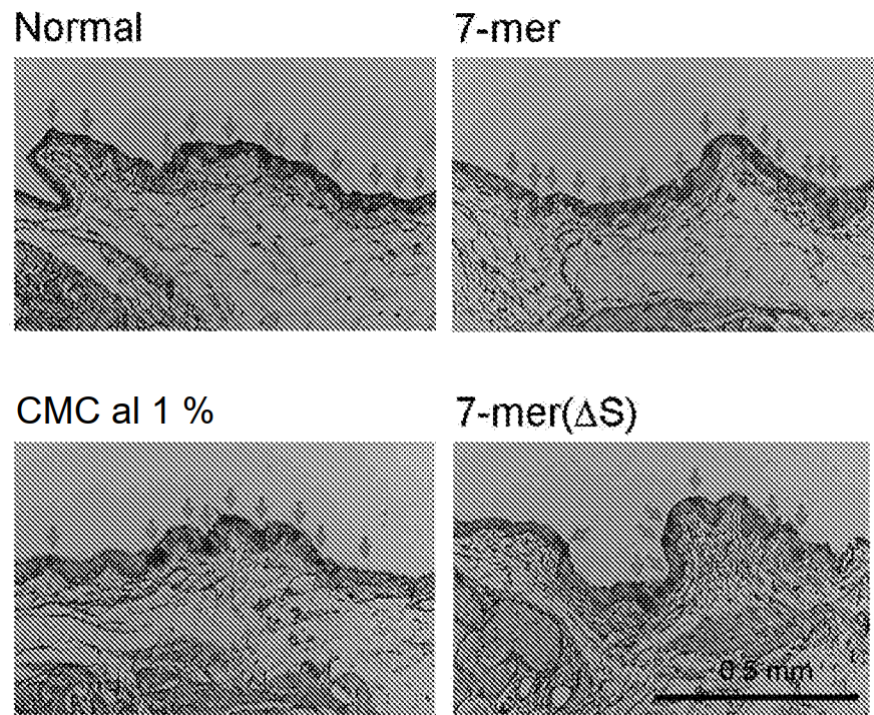


Fig. 5A

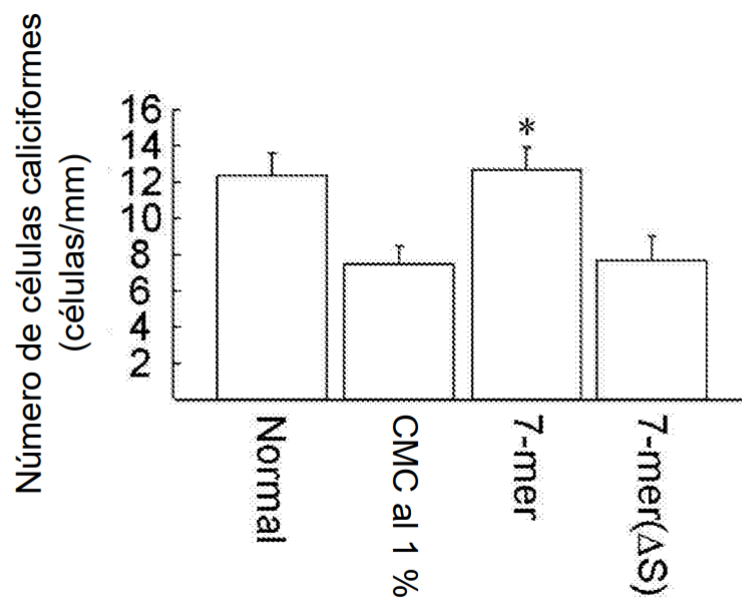


Fig. 5B