

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 630**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 27/04 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/KR2015/012678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17018613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15899756 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3329929**

54 Título: **Composición farmacéutica para prevenir o tratar los ojos secos**

30 Prioridad:

30.07.2015 KR 20150108069

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

13.10.2020

73 Titular/es:

**EYEBIO KOREA (100.0%)
75, Bokji-ro, Busanjin-gu
Busan 47392, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, JAE WOOK;
LEE, HYE SOOK;
KIM, CHAE EUN y
LEE, KUN MOO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 786 630 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

Composición farmacéutica para prevenir o tratar los ojos secos

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco, la composición farmacéutica incluye un péptido novedoso como componente activo.

Técnica antecedente

10 El ojo seco es una enfermedad que tiene una tasa de incidencia creciente con la edad, y más particularmente, se informa que aproximadamente el 6 % de la población de 40 años muestra síntomas de ojo seco, y que la incidencia del ojo seco aumenta a 15 % con una edad tal que aproximadamente el 25 % de la población de 65 años o más muestra síntomas de sequedad ocular.

15 El ojo seco causa daños en la superficie ocular debido a la falla del equilibrio de los componentes de las lágrimas causado por la falta de lágrimas o la evaporación excesiva de las lágrimas, y es una enfermedad asociada con síntomas tales como visión borrosa e irritación ocular causada por un material extraño o sensación de sequedad. Tales síntomas de ojo seco disminuyen la visión funcional y dificultan la realización de trabajos de rutina como conducir, leer y mirar televisión, y de este modo afectan la calidad de vida.

20 En la mayoría de los casos de ojo seco, los trastornos de la córnea/conjuntiva pueden ser causados por una anomalía de al menos una de una capa de aceite, una capa de agua y una capa mucosa que complementan una película lagrimal. En particular, la anormalidad de la capa mucosa causa un trastorno corneal severo. El ojo seco aumenta la penetrabilidad de las células epiteliales corneales marcadas con fluoresceína, las modificaciones conjuntivales y los daños a las células caliciformes, causando así cambios patológicos en las células epiteliales de la superficie corneal. De acuerdo con lo anterior, se pueden producir trastornos corneales o erosiones epiteliales corneales, úlceras corneales e incluso inflamación ocular, y en algunos casos, también se puede requerir trasplante corneal.

25 Una terapia de ojo seco que actualmente se usa más incluye la prescripción para la aplicación tópica de lágrimas artificiales que contienen, como sustituyente de mucina, un compuesto viscoelástico tal como metilcelulosa, sulfato de condroitina y ácido hialurónico. Sin embargo, dicho compuesto viscoelástico es física y fisiológicamente diferente de la mucina y, de este modo, su eficacia en la terapia es limitada.

Descripción detallada de la invenciónProblema técnico

30 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un péptido novedoso como componente activo para prevenir o tratar el ojo seco, en el que el ojo seco se puede prevenir o tratar suprimiendo o mejorando los cambios patológicos de las células epiteliales corneales, los cambios patológicos incluyendo una disminución en el volumen de lágrimas de los ojos, irregularidades en la superficie corneal y pérdida de células caliciformes conjuntivales.

Solución técnica

35 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco, comprendiendo la composición farmacéutica, como componente activo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

Efectos ventajosos de la invención.

40 Según la presente invención, se encuentra que un nuevo péptido tiene efectos sobre la mejora de la producción de lágrimas y la suavidad de la superficie corneal en ojos secos con estrés por desecación y sobre la supresión del desprendimiento de células epiteliales corneales, reducción de células caliciformes conjuntivales y producción de factores inflamatorios. De este modo, una composición que incluye el péptido novedoso como componente activo se puede aplicar a una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco.

Descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra resultados cuantitativos que confirman cambios en el volumen de lágrimas en ojos de ratones NOD.B10.H2^b en un grupo PBS, un grupo péptido I, un grupo péptido II y un grupo hyaluni (HA), en el que el estrés por desecación se elimina de los ratones NOD.B10.H2^b y el volumen de lágrimas en los ojos de los ratones NOD.B10.H2^b se midieron y cuantificaron en términos de la media ± desviación estándar después de administrar PBS, péptido I, péptido II y HA en los globos oculares de los ratones NOD.B10.H2^b durante 3, 5, 7 y 10 días (*p < 0,05 vs. grupo DS 10D. #p < 0,05 vs. grupo PBS. §P < 0,05 vs. grupo péptido I. ¶P < 0,05 vs. grupo péptido II. †p < 0,05 vs. grupo hyaluni);

La figura 2 muestra resultados que confirman los efectos de los péptidos GDRGD y GQDGLAGPK sobre la distorsión de la superficie corneal, en la que la figura 2A muestra resultados de imágenes oculares para cada grupo preparado tratando ratones NOD.B10.H2b con PBS, péptido I, péptido II y HA, en la que el estrés por desecación se elimina de los ratones NOD.B10.H2b (barra de escala = 1 mm), y la figura 2B muestra resultados cuantitativos que confirman cambios en los puntajes de suavidad corneal en ratones tratados cada uno con PBS, péptido I, péptido II y HA, en la que los puntajes de suavidad corneal se cuantifican en términos de media \pm desviación estándar (*p < 0,05 vs. grupo DS 10D);

La figura 3 muestra resultados que confirman los efectos de los péptidos GDRGD y GQDGLAGPK en el desprendimiento de células epiteliales corneales, en la que la figura 3A muestra los resultados de la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) confirmando el grado de desprendimiento de las células epiteliales corneales en las córneas de los ratones NOD.B10.H2b que son tratados mediante la administración de PBS, péptido I, péptido II e hyaluni durante 10 días a estos (barra de escala = 100 μ m), y la figura 3B muestra resultados cuantitativos que muestran el grado de desprendimiento de las células epiteliales corneales como cuantificadas en términos de media \pm desviación estándar (*p < 0,05 vs. grupo DS 10D);

La figura 4 muestra resultados que confirman los efectos del péptido I (esto es, GDRGD) y el péptido II (esto es, GQDGLAGPK) sobre la distribución de células calciformes conjuntivales, en la que la figura 4A muestra los resultados de la tinción periódica de ácido-Schiff (PAS) en la conjuntiva de ratones NOD.B10.H2b que se tratan mediante la administración de PBS, péptido I, péptido II, e hyaluni a esta (barra de escala = 200 μ m), y la figura 4B muestra resultados cuantitativos que muestran el grado de distribución de las células calciformes conjuntivales como cuantificadas en términos de media \pm desviación estándar (*p < 0,05 vs. grupo DS 10D); y

La figura 5 muestra resultados de análisis inmunohistoquímicos que confirman el grado de expresión de TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 y MMP-9 en conjuntiva de ratones NOD.B10.H2b, en la que los resultados muestran el grado de los factores inflamatorios anteriores en la conjuntiva de los ratones NOD.B10.H2b de los que se elimina el estrés por desecación después de administrar PBS, péptido I, péptido II, e hyaluni durante 10 días (barra de escala = 300 μ m).

Mejor modo

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco, la composición farmacéutica que incluye, como componente activo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.

El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se puede derivar del colágeno tipo I α 1, y el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se puede derivar del colágeno tipo II α 1.

En más detalle, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 puede ser un péptido aislado de una matriz extracelular derivada de condrocitos (CDEM), en el que la CDEM se puede aislar de una CDEM que se forma como secretada por un tejido de cartílago y/o un condrocito de un animal. El animal se puede seleccionar entre cerdos, caballos, ganado vacuno, ovejas, cabras, y monos, pero el animal no está limitado a los mismos.

El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 puede recuperar una producción de lágrimas que se ha reducido por estrés por desecación y un desequilibrio en una superficie corneal, y puede suprimir el desprendimiento de células epiteliales corneales y la producción de factores inflamatorios

En una realización ejemplar de la presente invención, como se muestra en la figura 1, el volumen de lágrimas de ratones NOD.B10.H2b en un grupo de prueba (por ejemplo, el grupo DS 10 D: $0,03 \pm 0,01 \mu$ l, p < 0,05) se reduce significativamente en aproximadamente un 86 % en comparación con el volumen de lágrimas de los ratones NOD.B10.H2b en un grupo de control (esto es, $0,16 \pm 0,02 \mu$ l), dependiendo del estrés por desecación. El volumen de lágrimas de los ratones NOD.B10.H2b en un grupo de prueba, en el que el estrés por desecación se elimina del modelo animal y el péptido I (esto es, GDRGD) y el péptido II (esto es, GQDGLAGPK) se tratan con él, aumenta con aproximadamente 2,52 veces (p < 0,05) tanto como la de un modelo animal de control tratado con PBS. A este respecto, se confirma que los resultados de la figura 1 muestran niveles similares con un caso en el que el modelo animal se trata con HA, que es un agente terapéutico para el síndrome del ojo seco.

En base a los resultados anteriores, se confirma que los péptidos I y II pueden tratar significativamente los volúmenes de lágrimas que disminuyen en los ojos secos, siendo así capaces de recuperar los volúmenes de lágrimas hasta los volúmenes de lágrimas normales.

El péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 se puede incluir en una cantidad que varía desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 partes en peso en base a un total de 100 partes en peso de la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular como una seleccionada del grupo que consiste en gotas para los ojos, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos, pero la formulación no está limitada a los mismos.

5 En otra realización ejemplar de la presente invención, la composición farmacéutica que incluye, como componente activo, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular puede incluir además al menos un aditivo apropiado seleccionado del grupo que consiste en portadores, excipientes, agentes desintegrantes, agentes edulcorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, deslizantes, agentes aromatizantes, antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes, y lubricantes que se usan por lo general en la preparación de una
10 composición en la técnica.

En más detalle, los ejemplos de los portadores, los excipientes y los diluyentes incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Los ejemplos de formulaciones
15 sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos y cápsulas. Tales formulaciones sólidas se pueden preparar mezclando la composición farmacéutica con al menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, sacarosa o lactosa, o gelatina. Además, se puede usar un lubricante tal como estearato de magnesio o talco además de un excipiente simple. Los ejemplos de los líquidos para administración oral incluyen suspensiones, soluciones materiales, emulsiones y jarabes, y los líquidos pueden incluir además
20 diversos tipos de excipientes, incluidos agentes humectantes, edulcorantes, agentes aromatizantes y conservantes, además de los simples y diluyentes de uso común, tal como agua o parafina líquida. Los ejemplos de formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas y supositorios. Los ejemplos de los disolventes no acuosos y las suspensiones incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal que incluye aceite de oliva y ésteres inyectables que incluyen oleato de etilo. Las bases para los supositorios pueden ser witepsol, macrogol,
25 tween 61, manteca de cacao, laurina o glicerogelatina.

En una realización ejemplar de la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto a través de una ruta convencional de administración seleccionada de intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, percutánea, intranasal, inhalación, administración tópica, rectal, oral,
30 intraocular o subcutánea.

Una dosis deseada del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 para el sujeto puede diferir según las condiciones y el peso del sujeto, los tipos y la gravedad de una enfermedad, una forma de fármaco, una ruta de administración, y un período de administración, y puede ser seleccionado apropiadamente por un experto en el arte. En una realización ejemplar de la presente invención, una dosis diaria del péptido que tiene la
35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg, pero la dosis diaria no está limitada a los mismos. La administración se puede realizar una vez al día o varias veces al día, pero el número de administración no está limitado a esto.

40 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se puede referir a mamíferos, incluidos los humanos, pero el "sujeto" no está limitado a ellos.

Modo de la invención

En lo que sigue, la presente divulgación se describe en detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, los ejemplos mostrados y descritos en el presente documento son ejemplos ilustrativos de la presente invención y no pretenden limitar el alcance del concepto inventivo de ninguna manera; más bien, estos ejemplos se proporcionan para que la presente divulgación sea exhaustiva y completa, y transmita completamente el concepto del concepto inventivo para los expertos en el arte.
45

<Ejemplo experimental 1> Síntesis de péptidos

Los péptidos usados en todos los experimentos fueron el péptido GDRGD en base a colágeno tipo I $\alpha 1$ (en lo que sigue denominado 'péptido I', SEQ ID NO: 1) y el péptido en base a colágeno tipo II $\alpha 1$ GQDGLAGPK (en lo que sigue, denominado 'péptido II', SEQ ID NO: 2), que se sintetizaron a partir de PEPTRon (Daejeon, Corea).
50

<Ejemplo experimental 2> Animales experimentales y preparación de modelos animales de ojo seco

Se compraron ratones NOD.B10.H2^b del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Los experimentos en animales se realizaron según las pautas para experimentos con animales del Inje University College of Medicine (No.: 2014-029) y la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión. Los ratones NOD.B10.H2^b de 12 a 16 semanas de edad sufrieron estrés por desecación al estar expuestos a una corriente de aire de un ventilador a una humedad ambiental de aproximadamente 40 % a 50 % durante 18 horas
55

por día, y luego fueron sometidos a la inyección subcutánea de 0,5 mg/0,2 mL de bloqueadores del receptor muscarínico. Además, los ratones fueron inyectados con bromhidrato de escopolamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alternativamente en los cuartos traseros 4 veces por día (9 AM, 12 PM, 3 PM y 6 PM) durante 10 días. Durante estos experimentos, el comportamiento y la ingesta de alimentos y agua de los ratones no se restringieron. 10 días después, los ratones fueron sacrificados.

10 días después de que los ratones sufrieran estrés por desecación, se detuvo la inyección de escopolamina, y luego, los ratones recientemente tuvieron entornos con humedad y temperatura normales. Después de eliminar el estrés por desecación, los ratones se dividieron en un grupo de péptido I o un grupo de péptido II, en el que se disolvieron 10 mg/ml de péptido I o 10 mg/ml de péptido II en PBS y se instilaron 5 µl de PBS en los globos oculares de los ratones 5 veces al día durante 10 días. Además, se instilaron 5 µl de PBS o 5 µl de HA al 0,1 % en los globos oculares de los ratones en un grupo de control, esto es, un grupo PBS o un grupo hyaluni (HA), 5 veces al día durante 10 días. En cada grupo, se usaron ambos ojos de cada uno de los 5 ratones para realizar los experimentos de manera repetitiva.

<Ejemplo 1> Efectos de los péptidos en la producción de lágrimas

El grado de la producción de lágrimas se midió con hilos de algodón impregnados con rojo de fenol (Zone-Quick; Oasis, Glendora, CA), como se describió previamente (Villareal AL, Farley W, Pflugfelder SC. Effect of topical ophthalmic epinastine and olopatadine on tear volume in mice. Eye Contact Lens. 2006;32(6):272-276). Los hilos se sostuvieron con pinzas médicas y se colocaron en el canto lateral durante 20 segundos. Los volúmenes de lágrimas se expresaron en milímetros (mm) de hilo húmedo que se había vuelto rojo por las lágrimas, medido bajo un microscopio (SZX7; Olympus corp, Tokio, Japón).

Las absorciones de fluido lagrimal medidas en milímetros se compararon con una curva estándar que se preparó a partir de hilos de algodón con volúmenes de absorción conocidos de una solución básica de reserva (1.500 ml de solución salina al 0,9 % y 5 ml de NaOH 5 N) durante 20 segundos estaban dentro del intervalo que se esperaría para las lágrimas de los ratones.

Por consiguiente, como se muestra en la figura 1, el estrés por desecación disminuyó significativamente la producción de lágrimas en aproximadamente un 86 % (grupo DS 10 D, $0,03 \pm 0,01 \mu\text{l}$, $p < 0,05$) en comparación con la producción de lágrimas en el grupo normal ($0,16 \pm 0,02 \mu\text{l}$). Después de la eliminación del estrés por desecación en los ratones con ojo seco, se confirmó que el grupo del péptido I y el grupo del péptido II mostraron una mayor producción de lágrimas hasta aproximadamente 2,52 veces ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control (esto es, el grupo PBS). Estos resultados fueron similares con un caso en el que el modelo animal fue tratado con HA, que es un agente terapéutico para el síndrome del ojo seco.

De este modo, se confirmó que los péptidos I y II pueden tratar significativamente los volúmenes de lágrimas que disminuyeron en los ojos secos, siendo así capaces de recuperar los volúmenes de lágrimas hasta los volúmenes de lágrimas normales.

<Ejemplo 2> Efectos de los péptidos sobre las irregularidades de la superficie corneal

1. Evaluación de la suavidad de la superficie corneal.

La suavidad de la superficie corneal en los grupos experimentales (esto es, el grupo péptido I y el grupo péptido II) se evaluó en comparación con la de los grupos de control (esto es, el grupo PBS y el grupo HA). Inmediatamente después de que los ratones en dos grupos experimentales fueron sacrificados, se obtuvieron imágenes reflejadas del anillo de color blanco de un iluminador de anillo de fibra óptica de un microscopio estereoscópico (SZX7; Olympus).

La suavidad corneal se evaluó clasificando las irregularidades del anillo de color blanco como se refleja en las células epiteliales corneales en las imágenes digitales. Los puntajes de severidad de irregularidad corneal se calcularon usando una escala de cinco puntos sobre la base del número de cuartos distorsionados en el anillo reflejado y se clasificaron de la siguiente manera: 0, sin distorsión; 1, distorsión en un cuarto; 2, distorsión en dos cuartos; 3, distorsión en tres cuartos; 4, distorsión en los cuatro cuartos; y 5, distorsión tan severa que no se reconoció ninguna sección del anillo.

2. Efectos de GDRGD y GQDGLAGPK en la mejora de las irregularidades corneales

Como resultado de cuantificar el grado de las irregularidades corneales de los ratones con ojo seco según el procedimiento de evaluación de la suavidad de la superficie corneal, como se muestra en la figura 2, se confirmó que el estrés por desecación aumentó a aproximadamente 9,02 veces la irregularidad de la superficie corneal de los ratones, que habían sufrido el estrés por desecación durante 10 días, en comparación con la irregularidad de la superficie corneal de las córneas normales. Sin embargo, no se encontró distorsión de la superficie corneal en el grupo PBS a los 3, 5, 7 y 10 días, en el que los grupos peptídicos mejoraron la irregularidad corneal con el tiempo en comparación con el PBS. Además, se confirmó que los grupos peptídicos mostraron mejores efectos en

la mejora de la distorsión de la superficie corneal en comparación con el grupo HA que usaba un agente terapéutico para el síndrome del ojo seco, HA.

<Ejemplo 3> Confirmación de los efectos de los péptidos en las células corneales

1. Inmunohistoquímica

- 5 Los ojos y anexos de los ratones en los grupos de control (esto es, el grupo PBS y el grupo HA) y los grupos experimentales (esto es, el grupo péptido I y el grupo péptido II) se extirparon quirúrgicamente, se fijaron en 10 % de formalina, y se incrustaron en parafina y un compuesto OCT.

Secciones de 6 μm de las muestras de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y reactivo ácido peryódico de Schiff (PAS).

- 10 Se sometieron a tinción a 5 animales de cada grupo como se describe anteriormente, y luego, se examinaron y se fotografiaron con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón).

2. Efectos de GDRGD y GQDGLAGPK en el desprendimiento de células epiteliales corneales

- 15 Como resultado de la tinción de las córneas de los ratones NOD.B10.H2^b, como se muestra en la figura 3, se confirmó que el estrés por desecación aumentó a un desprendimiento de aproximadamente 4,17 veces de las células epiteliales corneales ($2,29 \pm 0,61/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$). Esta alteración mediante estrés por desecación no disminuyó con PBS ($1,43 \pm 0,34/0,1 \text{ mm}^2$) o HA ($1,71 \pm 0,00/0,1 \text{ mm}^2$). Por el contrario, el número de células epiteliales corneales desprendidas disminuyó significativamente a aproximadamente $0,19 \pm 0,14/0,1 \text{ mm}^2$ por el péptido I. En particular, el grupo del péptido II disminuyó el desprendimiento de las células epiteliales corneales hasta aproximadamente 4 veces en comparación a los grupos de control, y se confirmó que los péptidos I y II exhibieron una reducción en el número de células epiteliales corneales desprendidas, similar a las córneas normales.
- 20

3. Efectos de GDRGD y GQDGLAGPK sobre la distribución de células caliciformes conjuntivales

La distribución de las células caliciformes conjuntivales en los ratones con ojo seco se observó después de la instilación del péptido I, el péptido II y la HA.

- 25 Por consiguiente, como se muestra en la figura 4, se confirmó que las células caliciformes conjuntivales se redujeron en aproximadamente 44,32 % ($7,43 \pm 1,52/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) en los grupos experimentales en comparación con las células caliciformes conjuntivales normales. No se encontró ningún efecto sobre la distribución de las células caliciformes conjuntivales en el grupo PBS o el grupo HA. Sin embargo, las células caliciformes conjuntivales que disminuyeron por el estrés por desecación aumentaron significativamente en el grupo del péptido I y el grupo del péptido II a aproximadamente 1,8 veces ($13,33 \pm 2,41/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) y aproximadamente 1,63 veces ($12,10 \pm 1,11/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$), respectivamente.
- 30

<Ejemplo 4> Efectos antiinflamatorios de los péptidos

- 35 Para evaluar los efectos de los péptidos sobre la expresión de marcadores inflamatorios en los ratones con ojo seco, la conjuntiva se inmunotizó con TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, y MMP-9, para realizar el análisis inmunohistoquímico.

- 40 Primero, el tejido (esto es, la conjuntiva) se cortó en secciones que tenían un grosor de 6 μm . Las secciones se fijaron en paraformaldehído al 3,5 %, se embebieron en Triton X-100 al 0,1 %, se inactivaron con una solución de suero bovino al 2 % (BSA; todos de sigma) y luego se les permitió reaccionar con anticuerpos primarios, tales como anti-TNF- α , anti-MMP-2 (1:1000; todos de Abcam Inc, Cambridge, MA), anti-MMP-9 (1:1000; Lifespan Biosciences Inc, Seattle, WA), anti-ICAM-1 y anti-VCAM-1 (1:1000; todos de Bioss Inc, Woburn, MA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario (DAKO Corp, Glostrup, Dinamarca) durante 20 minutos. Aquí, las inmunorreacciones se visualizaron con cromógeno de diaminobencidina (DAB), y las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 30 segundos a temperatura ambiente. Las imágenes de las secciones se fotografiaron con un microscopio Virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón).
- 45

- 50 Por consiguiente, como se muestra en la figura 5, se confirmó que el estrés por desecación aumentó significativamente la expresión de la citocina inflamatoria TNF- α y las moléculas de adhesión, incluidas ICAM-1 y VCAM-1 en la conjuntiva. Adicionalmente, la expresión de MMP2 y MMP9 también aumentó notablemente en la conjuntiva. Sin embargo, en los grupos experimentales (esto es, el grupo péptido I y el grupo péptido II), la expresión de estos marcadores inflamatorios en la conjuntiva disminuyó significativamente, y se confirmó que tales resultados son similares con un caso en el que el modelo animal se trató con HA.

Según una o más realizaciones de la presente invención, se encuentra que un péptido novedoso tiene efectos en la mejora de la producción de lágrimas y la suavidad de la superficie corneal en ojos secos que tienen estrés por

deseccación y en la supresión del desprendimiento de células epiteliales corneales, reducción de células caliciformes conjuntivales y producción de factores inflamatorios. De este modo, una composición que incluye el péptido novedoso como componente activo se puede aplicar a una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco.

5 <110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco

<130> ADP-2015-0249

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

10 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> péptido

<400> 1

Gly Asp Arg Gly Asp
1 5

<210> 2

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<400> 2

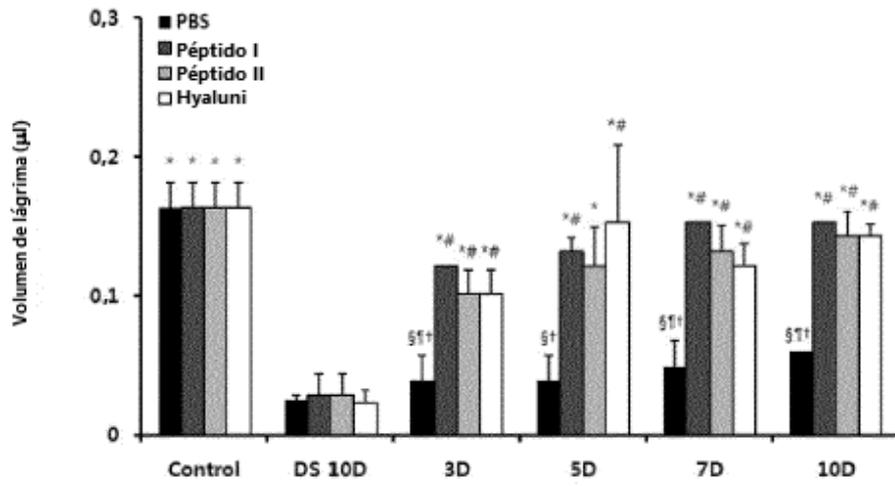
Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys
1 5

25

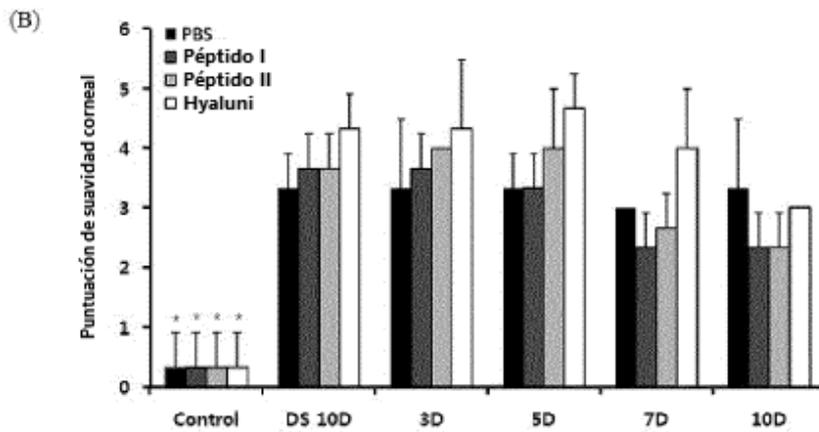
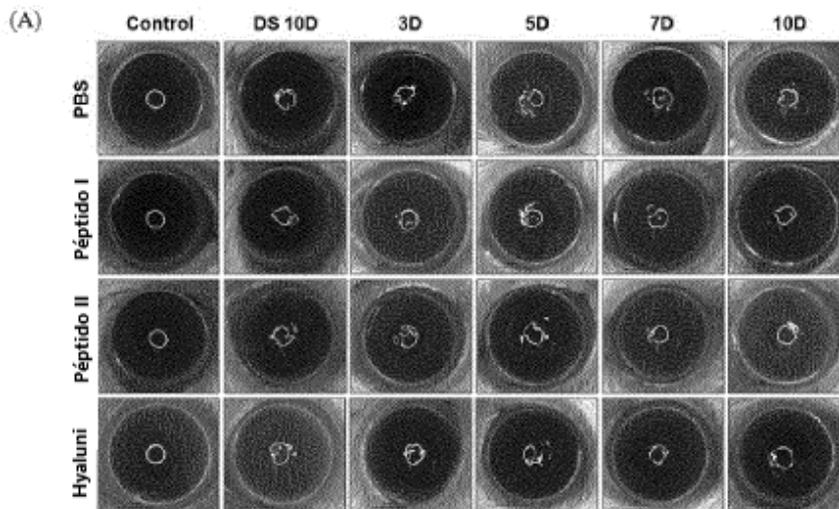
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento del ojo seco, la composición farmacéutica comprende, como componente activo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se deriva del colágeno tipo I α 1.
3. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se deriva del colágeno tipo II α 1.
- 10 4. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que una cantidad del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 está en un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 partes en peso en base a un total de 100 partes en peso de la composición farmacéutica.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 recupera una producción de lágrimas que se ha reducido por estrés por desecación y un desequilibrio en una superficie corneal, y suprime el desprendimiento de células epiteliales corneales y producción de factores inflamatorios.
6. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica es formulada como una seleccionada del grupo que consiste en gotas para los ojos, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.

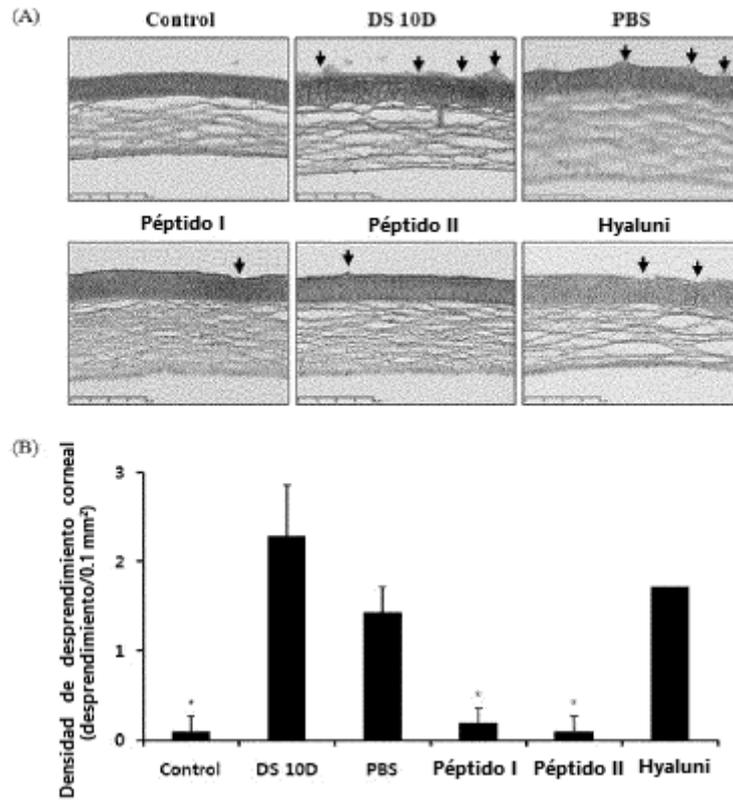
[FIGURA 1]



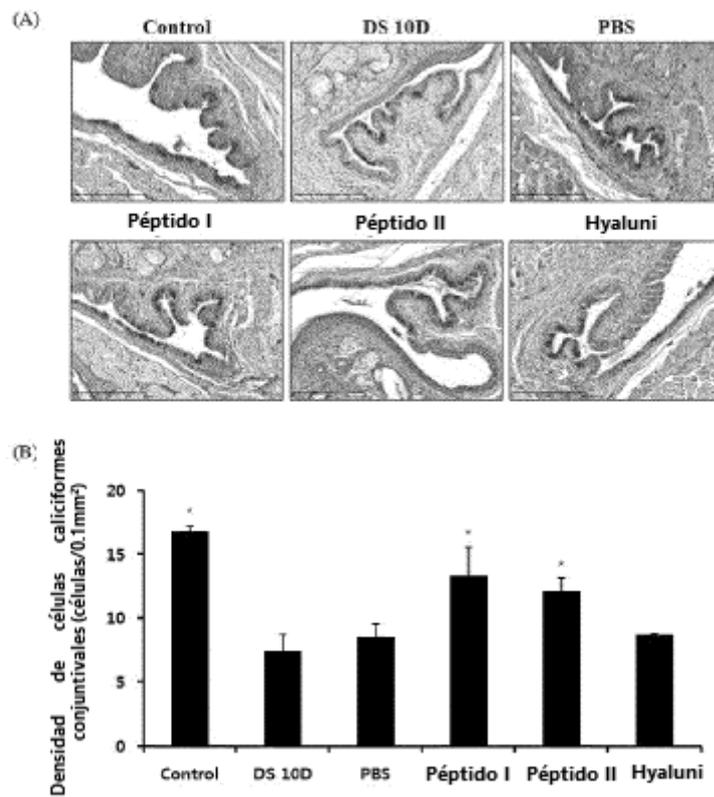
[FIGURA 2]



[FIGURA 3]



[FIGURA 4]



[FIGURA 5]

