

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 319**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/09</b>	(2006.01) <b>C07K 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/55</b>	(2006.01) <b>C12N 1/15</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/00</b>	(2006.01) <b>C12N 1/19</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01) <b>C12N 1/21</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01) <b>C12N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/02</b>	(2006.01) <b>C12P 21/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 27/02</b>	(2006.01) <b>C12Q 1/37</b>	(2006.01)
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)	
<b>C07K 16/38</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2017 PCT/JP2017/046044**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18117244**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2017 E 17884396 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3561056**

54 Título: **Péptido para el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad**

30 Prioridad:

**22.12.2016 JP 2016249020**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.04.2024**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)  
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku  
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIMIYA, DAISUKE;  
HASHIMOTO, RYUJI;  
SATO, TOSHIYUKI;  
KIMURA, TAKAKO;  
YAMASAKI, ATSUSHI y  
INOUE, TATSUYA**

74 Agente/Representante:

**BALLESTER INTELLECTUAL PROPERTY S.L.P.U**

**Observaciones:**

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

ES 2 966 319 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

Péptido para el tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad

## Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un péptido, un polinucleótido, un vector, una célula, un método de producción del péptido, un péptido obtenido por el método, una composición que comprende el péptido, una composición farmacéutica que comprende el péptido, la composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades que comprenden el péptido, uso del péptido para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades, un método para tratar diversas enfermedades que comprenden la etapa de administrar el péptido, etc.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 **[0002]** La serina peptidasa A1 que requiere temperaturas altas (HTRA1, por sus siglas en inglés) es una serina proteasa similar a la tripsina (PRSS11; Clan PA, familia S1) y está constituida por un dominio N-terminal compuesto de un módulo similar a IGFBP y un módulo similar a Kazal, un dominio proteasa y un dominio PDZ C-terminal. HTRA1 pertenece a la familia de HTRA, que incluye HTRA2, HTRA3 y HTRA4, y exhibe de forma reversible  
20 estructuras activas e inactivas, de la misma manera que las otras moléculas HTRA (Literatura distinta de la de patentes 1 y 2). Su expresión está mal distribuida en el cuerpo humano y se encuentra en niveles relativamente altos en el cartílago, la membrana sinovial, la placenta y similares. Se sabe que la HTRA1 escinde muchos constituyentes de la matriz extracelular, tales como proteína precursora amiloide, fibromodulina, clusterina, ADAM9 y vitronectina como sustratos y está relacionada con enfermedades tipificadas por la artritis y la calcificación ósea  
(Literatura distinta de la de patentes 3, 4, 5 y 6). Se sabe además que si una región promotora de HTRA1 tiene un polimorfismo genético (rs11200638), se eleva el nivel de transcripción de HTRA1. El análisis de asociación del genoma completo también ha revelado que el polimorfismo se correlaciona estrechamente con la degeneración macular relacionada con la edad (de ahora en adelante, denominada DMAE) (Literatura distinta de la de patentes 7 y 8).

25 **[0003]** La AMD es una enfermedad degenerativa crónica con el envejecimiento y se caracteriza por la pérdida de visión central. Esta enfermedad es la causa principal de la ceguera adquirida en Estados Unidos y es la cuarta causa más común de ceguera adquirida después del glaucoma, retinopatía diabética y la retinitis pigmentosa en Japón (Literatura distinta de la de patentes 12). El ARNm y los niveles de proteína de HTRA1 se elevan en los linfocitos o en las células del epitelio pigmentario de la retina de los pacientes de DMAE (Literatura distinta de la  
30 de patentes 13). También se ha notificado que la expresión de la proteína de HTRA1 se eleva en células degeneradas o drusas del epitelio pigmentario de la retina que son lesiones precursoras de DMAE o membranas neovasculares (Literatura distinta de la de patentes 11, y de la 14 a la 16). También se ha notificado que la proteína de HTRA1 se detecta en el humor vítreo en asociación con el desprendimiento de la retina, oclusión venosa retiniana, hemorragia vítrea, agujero macular y similares, y su valor se sincroniza con un marcador de angiogénesis  
35 VEGF, por sus siglas en inglés (Literatura distinta de la de patentes 17). Además, la descomposición de proteínas que constituyen la membrana basal, tal como fibulina 5 o tropoelastina, y la fragmentación de la capa elástica de la membrana de Bruch se han observado en ratones transgénicos HTRA1 (Literatura distinta de la de patentes 9). Sin embargo, no se ha demostrado directamente que la inhibición de la actividad de proteasa de HTRA1 es eficaz o no es eficaz para el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente y para proteger la retina.

40 **[0004]** SPINK2 (inhibidor de serina proteasa Kazal tipo 2) es un dominio similar a Kazal que tiene tres enlaces de disulfuro y funciones como inhibidor de tripsina/acrosina (Literatura distinta de la de patentes 10). Sin embargo, todavía no se ha esclarecido su relación con DMAE.

45 **[0005]** Los modelos de ratones y conejos se conocen como modelos de animales para evaluar la DMAE (Literatura distinta de la de patentes 18, 19 y 20). Con respecto a los conejos, que son modelos más preferidos que pueden extrapolarse a enfermedades oculares humanas (Literatura distinta de la de patentes 21), los modelos convencionales se utilizan únicamente para observar hallazgos anómalos en la retina y la coroides y tienen la dificultad de evaluar las funciones anómalas de las células del epitelio pigmentario de la retina (células RPE, por sus siglas en inglés), etc. Un problema adicional del mismo es un periodo de hasta 8 meses necesario para la formación del modelo (Literatura distinta de la de patentes 20).

50

**Listado de referencias**

**Literatura distinta de la de patentes**

**[0006]**

- Literatura distinta de la de patentes 1: Truebestein L, et al., 2011, Nat Struct Mol Biol., Vol. 18 (núm. 3): p. 386-8
- Literatura distinta de la de patentes 2: Eigenbrot C, et al., 2012, Structure, Vol. 20 (núm. 6): p. 1040-50
- Literatura distinta de la de patentes 3: Grau S, et al., 2005, Proc Natl Acad Sci U S A., Vol. 102 (núm. 17): p. 6021-26
- 5 Literatura distinta de la de patentes 4: Grau S, et al., 2006, J Biol Chem., Vol. 281 (núm. 10): p. 6124-29
- Literatura distinta de la de patentes 5: Hadfield KD, et al., 2008, J Biol Chem., Vol. 283, (núm. 9): p. 5928-38
- Literatura distinta de la de patentes 6: An E, et al., 2010, Invest Ophthalmol Vis Sci., Vol. 51 (núm. 7): p. 3379-86
- Literatura distinta de la de patentes 7: Yang Z, et al., 2006, Science, Vol. 314 (núm. 5801): p. 992-93
- Literatura distinta de la de patentes 8: Tang NP, et al., 2009, Ann Epidemiol., Vol. 19 (núm. 10): p. 740-45
- 10 Literatura distinta de la de patentes 9: Vierkotten S, et al., 2011, PLoS One, Vol. 6 (núm. 8): p. e22959
- Literatura distinta de la de patentes 10: Chen T, et al., 2009, Proteins, Vol. 77 (núm. 1): p. 209-19
- Literatura distinta de la de patentes 11: Yang Z et al., Science, 2006, Vol. 314, núm. 5801: p. 992-93
- Literatura distinta de la de patentes 12: Kimihiro Nakae, et al., 2007 Annual report of the Research Committee on Chorioretinal Degenerations and Optic Atrophy, Research on Measures for Intractable Diseases, the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan (2007)
- 15 Literatura distinta de la de patentes 13: Black JR y Clark SJ, Genet. Med., 2016, Vol. 18, núm. 4: p. 283-89
- Literatura distinta de la de patentes 14: Cameron DJ, et al., Cell Cycle, 2007, Vol. 6, núm. 9: p. 1122-25
- Literatura distinta de la de patentes 15: Chan CC et al., Trans. Am. Soc., 2007, Vol. 105: p. 92-97
- Literatura distinta de la de patentes 16: Tuo J et al., 2008, Vol. 115, núm. 11: p. 1891-98
- 20 Literatura distinta de la de patentes 17: Ng TK et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2011, Vol. 52, núm. 6: p. 3706-12
- Literatura distinta de la de patentes 18: Espinosa-Haidemann D.G, et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006, Vol. 47 (núm. 2): p. 729-37
- Literatura distinta de la de patentes 19: Pons M, et al., American Journal of Pathology, 2010, Vol. 177: p. 1198-1213
- 25 Literatura distinta de la de patentes 20: Trivino A, et al., Experimental Eye Research, 2006, Vol. 83: p. 357-366
- Literatura distinta de la de patentes 21: Zernii E.Y, et al., CNS & Neurological Disorders-Drug Targets, 2016, Vol. 15: p. 267-291

**Resumen de la invención**

**Problema técnico**

- 30 **[0007]** Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo inhibidor de serina peptidasa A1 que requiere temperaturas altas (HTRA1).

**Solución al problema**

**[0008]** La presente invención se define como se recita en las reivindicaciones.

**Efectos ventajosos de la invención**

- 35 **[0009]** El péptido proporcionado por la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el péptido tienen actividad inhibidora de HTRA1 y son útiles en el tratamiento o prevención, etc. de la degeneración macular relacionada con la edad.

**Breve descripción de los dibujos**

**[0010]**

5 [Figura 1(A)] La Figura 1(A) es un diagrama que muestra los resultados de comparación de la similitud de secuencias entre HTRA1 humano, de ratón, de rata y de mono. La línea discontinua representa un dominio enzimáticamente activo (204Gly a 364Leu).

[Figura 1(B)] La Figura 1(B) es un diagrama que muestra los resultados de comparación de la similitud de secuencias entre HTRA1 humano, de ratón, de rata y de mono (Cont.)

10 [Figura 2] La Figura 2 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como indicador la velocidad de descomposición de un sustrato peptídico. Los paneles de la A a la C muestran, cada uno, los resultados de evaluación para cada péptido inhibidor, y el panel D muestra los resultados de evaluación para el control de SPINK 2 de tipo silvestre.

[Figura 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora (completa) de HTRA1 de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como un indicador la velocidad de descomposición de un sustrato peptídico (paneles de la A a la C).

15 [Figura 4(A)] La Figura 4 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como un indicador la descomposición de vitronectina humana. El análisis se realizó mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos contra la vitronectina humana (R&D Systems, Inc.; MAB2349).

20 [Figura 4(B)] La Figura 4(B) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como un indicador la descomposición de vitronectina humana (Cont.)

[Figura 5(A)] La Figura 5(A) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 1). Para el nombre de cada proteasa utilizada y su concentración y el nombre del sustrato y su concentración, etc., véase el Ejemplo 3.

[Figura 5(B)] La Figura 5(B) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 2).

30 [Figura 5(C)] La Figura 5(C) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 3).

[Figura 5(D)] La Figura 5(D) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 4).

35 [Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra un compuesto de péptido inhibidor de HTRA1 (cat)/HTRA1 obtenido por cristalografía de rayos X. El péptido inhibidor se une a cada molécula de un trímero HTRA1 formado por HTRA1 (cat).

40 [Figura 7] La Figura 7 es un diagrama que muestra un compuesto de péptido inhibidor de HTRA1 (cat)/HTRA1 obtenido por cristalografía de rayos X como un monómero. El péptido inhibidor se une a una región que contiene el centro activo de HTRA1 (cat).

[Figura 8] La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 54) de H2-Opt. N-terminal "Mca-I" significa N-(4-metilcumaril-7-amida)-isoleucina, y C-terminal "(Dnp)K" significa N épsilon-(2,4-dinitrofenil)-lisina.

45 [Figura 9] La Figura 9 es un diagrama que muestra que la expresión de HTRA1 se ha aumentado en el humor vítreo de un modelo de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz. El análisis se realizó mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo HTRA1/ PRSS11 humano (R&D Systems, Inc.; AF2916).

[Figura 10] La Figura 10 es un diagrama que muestra que un grupo de administración de péptidos inhibidores de HTRA1 de modelos de rata de daño retiniano inducidos por exposición a la luz suprimió una disminución del recuento de núcleos en una capa nuclear externa en un corte transversal de la retina. N=4 para un grupo de administración de solución salina normal y n=5 para los otros grupos.

- [Figura 11] La Figura 11 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de cinco derivados de péptidos inhibidores de HTRA1 utilizando como un indicador la velocidad de descomposición de un sustrato peptídico.
- 5 [Figura 12] La Figura 12 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la unión de tres péptidos inhibidores de HTRA1 a HTRA1 (cat) mediante un método de inmunoprecipitación.
- [Figura 13] La Figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de SPINK2 humana.
- [Figura 14] La Figura 14 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) que codifica la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana.
- [Figura 15] La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) del péptido H218.
- 10 [Figura 16] La Figura 16 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H218.
- [Figura 17] La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) del péptido H223.
- [Figura 18] La Figura 18 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H223.
- 15 [Figura 19] La Figura 19 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) del péptido H228.
- [Figura 20] La Figura 20 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H228.
- [Figura 21] La Figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) del péptido H308.
- [Figura 22] La Figura 22 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 10) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H308.
- 20 [Figura 23] La Figura 23 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11) del péptido H321.
- [Figura 24] La Figura 24 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 12) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H321.
- [Figura 25] La Figura 25 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) del péptido H322.
- 25 [Figura 26] La Figura 26 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 14) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido H322.
- [Figura 27] La Figura 27 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) del derivado peptídico H308AT.
- [Figura 28] La Figura 28 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 16) que codifica la secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308AT.
- 30 [Figura 29] La Figura 29 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) del derivado peptídico H321AT.
- [Figura 30] La Figura 30 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 18) que codifica la secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H321AT.
- [Figura 31] La Figura 31 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) del derivado peptídico H322AT.
- [Figura 32] La Figura 32 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 20) que codifica la secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H322AT.
- 35 [Figura 33] La Figura 33 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) del péptido M7.
- [Figura 34] La Figura 34 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 22) que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido M7.
- [Figura 35] La Figura 35 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) del derivado peptídico H308\_S16A.
- 40 [Figura 36] La Figura 36 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) del derivado peptídico H308\_D1G\_S16A.

- [Figura 37] La Figura 37 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) del derivado peptídico H308\_D1S\_S16A.
- [Figura 38] La Figura 38 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) del derivado peptídico H308\_D1E\_S16A.
- 5 [Figura 39] La Figura 39 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) del derivado peptídico H308\_D1SLI\_S16A.
- [Figura 40] La Figura 40 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) del derivado peptídico H321AT\_D1S\_S16A.
- 10 [Figura 41] La Figura 41 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) del derivado peptídico H322AT\_D1S\_S16A.
- [Figura 42] La Figura 42 muestra la fórmula general (SEQ ID NO: 30) de un péptido inhibidor de HTRA1.  $X_1$  a  $X_{11}$  representan cada uno un aminoácido arbitrario.
- [Figura 43] La Figura 43 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 31) que consiste en un *S-tag* y un enlazador.
- 15 [Figura 44] La Figura 44 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) de un hexámero de C-terminal.
- [Figura 45] La Figura 45 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) del cebador 1.
- [Figura 46] La Figura 46 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 34) del cebador 2.
- [Figura 47] La Figura 47 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 35) del cebador 3.
- [Figura 48] La Figura 48 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) del cebador 4.
- 20 [Figura 49] La Figura 49 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37) del cebador 5.
- [Figura 50] La Figura 50 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 38) del cebador 6.
- [Figura 51] La Figura 51 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 39) del cebador 7.
- [Figura 52] La Figura 52 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 40) del cebador 8.
- [Figura 53] La Figura 53 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41) del cebador 9.
- 25 [Figura 54] La Figura 54 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 42) del cebador 10.
- [Figura 55] La Figura 55 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 43) del cebador 11.
- [Figura 56] La Figura 56 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 44) del cebador 12.
- [Figura 57] La Figura 57 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 45) del cebador 13.
- [Figura 58] La Figura 58 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 46) del cebador 14.
- 30 [Figura 59] La Figura 59 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 47) del cebador 15.
- [Figura 60] La Figura 60 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 48) del cebador 16.
- [Figura 61] La Figura 61 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 49) del cebador 17.
- [Figura 62] La Figura 62 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 50) del cebador 18.
- [Figura 63] La Figura 63 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 51) del cebador 19.
- 35 [Figura 64] La Figura 64 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 52) del cebador 20.
- [Figura 65] La Figura 65 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 53) de HTRA1 humana (completa).
- [Figura 66(A)] La Figura 66(A) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de péptidos inhibidores de HTRA1 utilizando como indicador la velocidad de descomposición de un sustrato peptídico.

- [Figura 66(B)] La Figura 66(B) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (completa) de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como un indicador la velocidad de descomposición de un sustrato peptídico.
- 5 [Figura 67] La Figura 67 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de un péptido inhibidor de HTRA1 utilizando como un indicador la descomposición de vitronectina humana. El análisis se realizó mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos contra la vitronectina humana (R&D Systems, Inc.; MAB2349).
- 10 [Figura 68(A)] La Figura 68(A) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de péptidos inhibidores de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 1).
- [Figura 68(B)] La Figura 68(B) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 2).
- 15 [Figura 68(C)] La Figura 68(C) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 3).
- [Figura 68(D)] La Figura 68(D) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 4).
- 20 [Figura 68(E)] La Figura 68(E) es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la reactividad cruzada de un péptido inhibidor de HTRA1 con cada proteasa utilizando como un indicador la descomposición de un sustrato peptídico (parte 5).
- [Figura 69] La Figura 69 es un diagrama que muestra los resultados de evaluación de la unión de tres péptidos inhibidores de HTRA1 a HTRA1 (cat) mediante un método de inmunoprecipitación.
- 25 [Figura 70(A) a] La Figura 70(A) es un diagrama que muestra que un grupo de administración del péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A de modelos de rata de daño retiniano inducidos por exposición la luz suprimió una disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear externa en un corte transversal de la retina. n=6 para todos los grupos. La dosis del péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A fue de 0,2 y 1 µg/ojo.
- 30 [Figura 70(B) a] La Figura 70(B) es un diagrama que muestra que un grupo de administración del péptido inhibidor de HTRA1 H321AT\_D1G\_S16A de modelos de rata de daño retiniano inducidos por exposición la luz suprimió una disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear externa en un corte transversal de la retina. n=6 para todos los grupos. La dosis del péptido inhibidor de HTRA1 H321AT\_D1G\_S16A fue de 0,2 y 1 µg/ojo.
- [Figura 70(C) a] La Figura 70(C) es un diagrama que muestra que un grupo de administración del péptido inhibidor de HTRA1 H322AT\_D1G\_S16A de modelos de rata de daño retiniano inducidos por exposición la luz suprimió una disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear externa en un corte transversal de la retina. n=6 para todos los grupos. La dosis del péptido inhibidor de HTRA1 H322AT\_D1G\_S16A fue de 0,2 y 1 µg/ojo.
- 35 [Figura 71(A)] La Figura 71(A) es un diagrama que muestra los resultados de la inmunotinción de las células del RPE en un conejo de 12 semanas de edad, un conejo de 3 años de edad y un conejo de 3 años de edad cargado con HFD-HQ con un anticuerpo ZO-1 (Thermo Fisher Scientific Inc.).
- 40 [Figura 71(B)] La Figura 71(B) muestra las áreas medias de células del RPE en un conejo de 12 semanas de edad, un conejo de 3 años de edad y un conejo de 3 años de edad cargado con HFD-HQ.
- [Figura 71(C)] La Figura 71(C) es un diagrama que muestra el aumento de la expresión del ARNm del componente del complemento 3 «C3», que es un factor relacionado con la DMAE, en el tejido retiniano de un conejo de 3 años de edad cargado con HFD-HQ.
- 45 [Figura 71(D)] La Figura 71(D) es un diagrama que muestra el aumento de la expresión del ARNm del componente del complemento 3 «C3», que es un factor relacionado con la DMAE, en el tejido de la EPR/coroides de un conejo de 3 años de edad cargado con HFD-HQ.

[Figura 71(E)] La Figura 71(E) es un diagrama que muestra los resultados de la medición de una concentración de HTRA1 en el humor vítreo de un conejo de 12 semanas de edad, un conejo de 3 años de edad y un conejo de 3 años de edad cargado con HFD-HQ por LC-MS/MS.

5 [Figura 72(A)] La Figura 72(A) es un diagrama que muestra que un grupo de administración de un péptido inhibidor de HTRA1 H308 de conejos de 3 años cargados con HFD-HQ mostró un efecto supresor en la hipertrofia de las células del EPR. n= 5 para todos los grupos. Se utilizó un área media como un indicador.

10 [Figura 72(B)] La Figura 72(B) es un diagrama que muestra que un grupo de administración de un péptido inhibidor de HTRA1 H308 de conejos de 3 años cargados con HFD-HQ mostró un efecto supresor en la hipertrofia de las células del RPE. n= 5 para todos los grupos. Se utilizó como indicador el número de células del RPE con un área celular de o superior a 1500  $\mu\text{m}^2$ .

[Figura 73] La Figura 73 es un diagrama que muestra los resultados de comparación de la similitud de secuencias entre HTRA1 humano, de mono, de conejo, de ratón y de rata. La línea discontinua representa un dominio enzimáticamente activo (204Gly a 364Leu).

15 [Figura 74] La Figura 74 es un diagrama que muestra que un péptido inhibidor de HTRA1 mostró un efecto supresor en ARNm VEGF inducido en una línea de células del epitelio pigmentario de la retina humana ARPE-19 mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, complemento sérico humano normal y HTRA1.

[Figura 75] La Figura 75 es un diagrama que muestra que un péptido inhibidor de HTRA1 mostró un efecto supresor en la migración de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, por sus siglas en inglés) inducidas por suero.

20 [Figura 76] La Figura 76 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador 21.

[Figura 77] La Figura 77 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador 22.

**[0011]** En la presente invención, la frase «SEQ ID NO: X (Figura Y)» o «Figura Y (SEQ ID NO: X)» significa que la secuencia se muestra en SEQ ID NO: X o se muestra en la Figura Y.

### Descripción de las formas de realización

#### 25 1. Definición

**[0012]** En la presente invención, el término «gen» se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en una proteína o una hebra complementaria de la misma. El gen está formado por una única hebra, una hebra doble, una hebra triple o más. Una asociación de una cadena de ADN y una cadena de ARN, ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos que coexisten en una hebra o más, y una molécula de ácido nucleico de doble hebra o de triple hebra o más, que incluye dicha hebra también se incluyen en el significado del «gen».

**[0013]** En la presente invención, el término «gen», «polinucleótido» y «molécula de ácido nucleico» son sinónimos entre sí y no están limitados por el número de sus unidades constituyentes, tales como ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos y nucleósidos por cualquier medio. Por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, ADNc, ARNc, una sonda, un oligonucleótido, un cebador y similares también se incluyen dentro del alcance de la misma. El término «molécula de ácido nucleico» también se abrevia como «ácido nucleico».

**[0014]** En la presente invención, los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» son sinónimos entre sí. Un péptido que inhibe o suprime una o dos o más actividades o funciones de una molécula X objetivo (de ahora en adelante, estos efectos supresores o inhibidores se denominarán colectivamente «actividad inhibidora X») puede referirse a un «péptido inhibidor X».

**[0015]** El término «SPINK2» se utiliza para referirse a un inhibidor de serina proteasa Kazal tipo 2. Esta proteína de 7 kDa consiste en un dominio de tipo Kazal que tiene tres enlaces de disulfuro. SPINK2 es preferiblemente de origen humano. En la presente invención, SPINK2 humana se denomina simplemente «SPINK2», a menos que se especifique lo contrario.

45 **[0016]** El término «HTRA1» se utiliza para referirse a una serina peptidasa A1 que requiere temperaturas altas. Esta proteína está formada por un dominio N-terminal que consta de un módulo similar a IGFBP y un módulo similar a Kazal, un dominio proteasa y un dominio PDZ C-terminal y pertenece a la familia HTRA. HTRA1 es preferiblemente de origen humano. En la presente invención, HTRA1 humana se denomina simplemente «HTRA1», a menos que se especifique lo contrario.

5 [0017] El término «péptido inhibidor de HTRA1» se utiliza para referirse a un péptido que inhibe o suprime una o dos o más actividades o funciones de HTRA1. Un fragmento del péptido, un aducto del péptido con una fracción adicional, o un conjugado del péptido que mantiene la actividad inhibidora de HTRA1 se incluye dentro del alcance del término «péptido inhibidor de HTRA1». Concretamente, un fragmento, un aducto y una forma modificada del péptido que mantiene la actividad inhibidora de HTRA1 también se incluyen dentro del término «péptido inhibidor de HTRA1».

[0018] En la presente invención, el término «célula» se utiliza para incluir varias células derivadas de individuos animales, células subcultivadas, células de cultivos primarios, líneas celulares, células recombinantes, levaduras, microbios y similares.

10 [0019] En la presente invención, el término «sitio» al que se une un péptido, es decir, el «sitio» que es reconocido por un péptido, se utiliza para referirse a una secuencia parcial de aminoácidos consecutiva o intermitente o a una conformación parcial en una molécula objetivo que debe unirse o ser reconocida por un péptido. En la presente invención, dicho sitio puede denominarse un epítipo o un sitio de unión en la molécula objetivo.

15 [0020] El término «mutante SPINK2» se utiliza para referirse a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre SPINK2 mediante la sustitución de uno o dos o más aminoácidos por aminoácidos diferentes a los de tipo silvestre, la delección de uno o dos o más aminoácidos ausentes en el tipo silvestre, y/o la adición de aminoácido(s) ausentes en el tipo silvestre al amino terminal (N terminal) y/o carboxilo terminal (C terminal) del tipo silvestre (de ahora en adelante, denominado colectivamente «mutación»). Un «mutante SPINK2» que tiene actividad inhibidora de HTRA1 se incluye en el péptido inhibidor de HTRA1. En la presente invención, la «inserción» también puede incluirse en la «adición».

20

[0021] En la presente invención, el término «varios» en la frase «uno o varios» se refiere a 3 a 10.

25 [0022] En la presente invención, la frase «hibridizar bajo condiciones estrictas» se utiliza para referirse a que la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones en las que la hibridación se lleva a cabo a 65°C en una solución que contiene 5 x SSC y el resultante se lava a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 2 x SSC y 0,1% SDS a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0,5 x SSC y 0,1% SDS y a 65°C durante 20 minutos en una solución acuosa que contiene 0,2 x SSC y 0,1% SDS o condiciones equivalentes a estas. SSC se refiere a una solución acuosa de 150 mM NaCl y 15 mM citrato sódico, y n x SSC se refiere a una concentración n veces mayor de SSC.

30 [0023] En la presente invención, el término «específico» y «especificidad» son sinónimos y son intercambiables con los términos «selectivo» y «selectividad», respectivamente. Por ejemplo, un péptido inhibidor de HTRA1 es sinónimo con un péptido inhibidor selectivo de HTRA1.

## 2. Péptido

### 2-1. Aminoácido

35 [0024] El término «aminoácido» se utiliza para referirse a un compuesto orgánico que contiene un grupo amino y un grupo carboxilo y para referirse a un  $\alpha$ -aminoácido contenido como una unidad constituyente preferiblemente en una proteína y más preferiblemente en una proteína natural. En la presente invención, el aminoácido es más preferiblemente Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr and Val. El término «aminoácido» se utiliza para referirse a estos 20 aminoácidos en total, a menos que se especifique lo contrario. Estos 20 aminoácidos en total pueden denominarse «aminoácidos naturales». El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención preferiblemente contiene aminoácidos naturales.

40

[0025] En la presente invención, «aminoácido» también se refiere al término «residuo de aminoácidos».

[0026] En la presente invención, el aminoácido también puede ser un L-aminoácido, un D-aminoácido o una mezcla de estos (DL-aminoácido) y significa L-aminoácido, a menos que se especifique lo contrario.

45 [0027] Los aminoácidos naturales pueden dividirse en, por ejemplo, los siguientes grupos, basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

1. (1) grupo de aminoácidos hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu y Ile;
2. (2) grupo de aminoácido hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln;
3. (3) grupo de aminoácidos ácidos: Asp y Glu;

4. (4) grupo de aminoácido básicos: His, Lys y Arg;
5. (5) grupo de aminoácidos que influyen la dirección de la cadena principal: Gly y Pro; y
6. (6) grupo de aminoácido aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

**[0028]** Sin embargo, la clasificación de aminoácidos naturales no se limita a ellos.

- 5 **[0029]** En la presente invención, cada aminoácido natural puede recibir una sustitución conservadora de aminoácidos.

10 **[0030]** La «sustitución conservadora de aminoácidos» significa una sustitución por un aminoácido funcionalmente equivalente o similar. La sustitución conservadora de aminoácidos en un péptido provoca un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. Por ejemplo, uno o dos o más sustituciones de aminoácidos que tienen una polaridad similar actúan de forma funcionalmente equivalente y provocan un cambio estático en la secuencia de aminoácidos del péptido. En general, una sustitución dentro de un cierto grupo puede considerarse como que es conservadora en términos de estructuras y funciones. Sin embargo, como es obvio para un experto en la técnica, el papel de un residuo de aminoácidos específico puede determinarse por su posición en la estructura tridimensional de una molécula que contiene el aminoácido. Por ejemplo, un residuo de cisteína puede adoptar una forma oxidada (disulfuro) de polaridad inferior a la de una forma reducida (tio). La fracción alifática larga de una cadena lateral de arginina es capaz de constituir características estructural y funcionalmente importantes. De forma alternativa, una cadena lateral que contiene un anillo aromático (triptófano, tirosina y fenilalanina) es capaz de contribuir a la interacción ion-aromático o a la interacción catión-pi. En dicho caso, incluso la sustitución de aminoácidos que tienen dichas cadenas laterales con aminoácidos que pertenecen a un grupo ácido o no polar puede ser conservadora estructural y funcionalmente. Los residuos, tales como prolina, glicina y cisteína (forma de disulfuro), pueden tener un efecto directo en la estructura tridimensional de la cadena principal y, a menudo, no pueden sustituirse sin una distorsión estructural.

25 **[0031]** La sustitución conservadora de aminoácidos incluye, tal como se muestra a continuación, una sustitución específica basándose en la similitud de la cadena lateral (L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp. 73-75, Worth Publisher, New York (1975)) y una sustitución típica.

- 30 1. (1) Grupo de aminoácidos no polares: alanina (de ahora en adelante, denominada «Ala» o simplemente «A»), valina (de ahora en adelante, denominada «Val» o simplemente «V»), leucina (de ahora en adelante, denominada «Leu» o simplemente «L»), isoleucina (de ahora en adelante, denominada «Ile» o simplemente «I»), prolina (de ahora en adelante, denominada «Pro» o simplemente «P»), fenilalanina (de ahora en adelante, denominada «Phe» o simplemente «F»), triptófano (de ahora en adelante, denominada «Trp» o simplemente «W»), y metionina (de ahora en adelante, denominada «Met» o simplemente «M»),
- 35 2. (2) Grupo de aminoácidos polares sin carga: glicina (de ahora en adelante, denominada «Gly» o simplemente «G»), serina (de ahora en adelante, denominada «Ser» o simplemente «S»), treonina (de ahora en adelante, denominada «Thr» o simplemente «T»), cisteína (de ahora en adelante, denominada «Cys» o simplemente «C»), tirosina (de ahora en adelante, denominada «Tyr» o simplemente «Y»), asparagina (de ahora en adelante, denominada «Asn» o simplemente «N»), y glutamina (de ahora en adelante, denominada «Gln» o simplemente «Q»),
- 40 3. (3) grupo de aminoácidos ácidos: ácido aspártico (de ahora en adelante, denominado «Asp» o simplemente «D») y ácido glutámico (de ahora en adelante, denominado «Glu» o simplemente «E»)
4. (4) Grupo de aminoácidos básicos: lisina (de ahora en adelante, denominada «Lys» o simplemente «K»), arginina (de ahora en adelante, denominada «Arg» o simplemente «R») e histidina (de ahora en adelante, denominada «His» o simplemente «H»)

45 **[0032]** En la presente invención, los aminoácidos pueden ser aminoácidos distintos de los aminoácidos naturales. Los ejemplos de los mismos pueden incluir selenocisteína, N-formilmetionina, pirrolisina, ácido piroglutámico, cistina, hidroxiprolina, hidroxilisina, tiroxina, O-fosfoserina, desmosina, β-alanina, sarcosina, omitina, creatina, ácido γ-aminobutírico, opina, teanina, ácido tricolómico, ácido cainico, ácido domoico y ácido acromélico, que se encuentran en péptidos o proteínas naturales, y que pueden incluir: Aminoácidos protegidos N-terminalmente tales como la norleucina, el Ac-aminoácido, el Boc-aminoácido, el Fmoc-aminoácido, el Trt-aminoácido y el Z-aminoácido; aminoácidos C-terminalmente protegidos como el t-butil éster, el bencil éster, el ciclohexil éster y el fluorenil éster de aminoácidos; y otros aminoácidos que no se encuentran en el mundo natural, como la diamina, el ω aminoácido, el β aminoácido, el γ aminoácido, los derivados Tic de los aminoácidos y el ácido aminofosfónico.

Los aminoácidos diferentes de los 20 «aminoácidos naturales» no se limitan a ellos y se denominan colectivamente «aminoácidos no naturales» en la presente invención por conveniencia.

## 2-2. Péptido inhibidor de HTRA1

5 [0033] El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención de un mutante SPINK2 que al menos parcialmente mantiene el marco de SPINK2 (de ahora en adelante, denominado «mutante SPINK2») e inhibe o suprime la actividad de proteasa de HTRA1 o un fragmento que retiene su actividad enzimática (de ahora en adelante, denominado «fragmento funcional») (de ahora en adelante, dicha inhibición y supresión se denominan colectivamente «actividad inhibidora de HTRA1»).

10 [0034] HTRA1, que es un objetivo del péptido inhibidor de la presente invención, es preferiblemente HTRA1 de mamíferos, más preferiblemente HTRA1 de primates, y aún más preferiblemente HTRA1 de humanos. La secuencia de aminoácidos de HTRA1 humano maduro de longitud completa (de ahora en adelante, denominado «HTRA1 (completa)») tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 53 (Figura 65). Esta secuencia de aminoácidos consta de las posiciones de la 23 hasta la 480 y no consta de la secuencia de señales que consta de las posiciones de la 1 a la 22. La secuencia de aminoácidos del fragmento funcional de HTRA1 humano (de ahora en adelante, denominada «HTRA1 (cat)») no se limita particularmente, siempre y cuando el fragmento funcional retenga la actividad de proteasa. Los ejemplos de la misma pueden incluir un fragmento funcional que consiste en 158Gly a 373Lys de SEQ ID NO: 53 (Figura 65) y un fragmento funcional que comprende 158Gly a 373Lys de la misma. HTRA1 o el fragmento funcional de la misma que es un objetivo del péptido inhibidor de la presente invención también se denomina proteasa HTRA1. La proteasa HTRA1 proviene preferiblemente de los vertebrados, más preferiblemente de los mamíferos, aún más preferiblemente de los primates y lo más preferible de humanos, y se puede preparar mediante la purificación de los tejidos o células de cualquiera de estos animales, o mediante un método conocido por un experto en la técnica, como el método de preparación de proteínas, tal como la recombinación genética, la traducción *in vitro* o la síntesis de péptidos. HTRA1 o el fragmento funcional de la misma puede estar unida a una secuencia señal, una región Fc de inmunoglobulina, una etiqueta, un rótulo o similar.

25 [0035] La actividad inhibidora de HTRA1 se puede evaluar utilizando la actividad de proteasa de HTRA1 como un indicador. Por ejemplo, HTRA1 o el fragmento funcional de la misma, un sustrato y el péptido inhibidor de la presente invención o un candidato de los mismos pueden coexistir entre sí. En este caso, cuando la actividad de proteasa de HTRA1 es 70% o menos, 50% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 30 1% o menos o 0% en comparación con aquella en presencia de un control o en ausencia del inhibidor o del candidato del mismo, la inhibición de HTRA1 ocurre con actividad inhibidora de 30% o más, 50% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, 99% o más o 100%, respectivamente. La actividad inhibidora de HTRA1 puede diferir dependiendo de las condiciones de reacción, el tipo de sustrato, concentración, etc. Los ejemplos de las condiciones de reacción pueden incluir, pero no se limitan a, aquellos descritos en los Ejemplos. Se puede evaluar la actividad enzimática añadiendo un péptido de sustrato o una proteína de sustrato a una concentración determinada de HTRA1, y reaccionando la mezcla durante un tiempo determinado, seguido de la detección de la fluorescencia del péptido de sustrato o detección de la proteína de sustrato por SDS-PAGE, *Western Blot*, cromatografía líquida o similares. Por ejemplo, el tampón fosfato salino (de ahora en adelante, denominado «PBS»), tampón de borato (50 mM borato, ph de 7 a 9, por ejemplo, pH 8,5) o tampón Tris (50 mM Tris, ph de 6 a 40 9, por ejemplo, pH 8,0) se puede utilizar como una solución tampón. Se puede añadir NaCl (50 a 300 mM, por ejemplo, 150 mM) o un surfactante, tal como CHAPS o octil  $\beta$ -D-glucopiranosido, al sistema de reacción, aunque el aditivo no se limita a ello.

45 [0036] Los ejemplos del sustrato de la proteasa HTRA1 incluyen, pero no se limitan particularmente a, sustratos endógenos, sustratos exógenos y sustratos sintéticos. Los ejemplos de los sustratos endógenos humanos pueden incluir vitronectina. Los ejemplos del sustrato sintético pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, H2-Opt (Mca-IRRVSYSFK(Dnp)K),  $\beta$ -caseína y otros sustratos de HTRA1. La actividad inhibidora de HTRA1 ( $IC_{50}$  o  $K_i$ ) del péptido de la presente invención es 1  $\mu$ M o inferior, más preferiblemente 100 nM o inferior.

50 [0037] Se prefiere que el péptido inhibidor de la presente invención no debería inhibir o suprimir la actividad de una proteasa distinta de la de HTRA1 o debería tener un grado relativamente débil de inhibición o supresión de dicha actividad. En otras palabras, el péptido inhibidor de la presente invención preferiblemente tiene una alta especificidad de HTRA1. Preferiblemente, el péptido inhibidor de la presente invención no inhibe o suprime las actividades de proteasas tales como tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, triptasa, plasmina, trombina, matriptasa, proteína C, activador tisular del plasminogema (tPA, por sus siglas en inglés), uroquinasa (uPA, por sus siglas en inglés), plasmina y caliceína plasmática o tiene un grado relativamente débil de inhibición o supresión de dichas actividades. Dicho péptido preferido de la presente invención no exhibe una reacción adversa causada por la

inhibición o supresión de las actividades de otras proteasas y, preferiblemente, se puede utilizar como un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico para una enfermedad relacionada con HTRA1 (mencionada más adelante).

**[0038]** Como se ha mencionado anteriormente, HTRA1, que es un objetivo del péptido de la presente invención, proviene preferiblemente de vertebrados; más preferiblemente, proviene de mamíferos; aún más preferiblemente proviene de primates y lo más preferible, proviene de humanos. Como alternativa, HTRA1, que es un objetivo del péptido de la presente invención, puede provenir de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, tal como una rata o un ratón, o de un primate, tal como un mono cinomólogo, un tití común o un mono rhesus. Un péptido que tiene actividad inhibidora contra HTRA1 proveniente de animales no humanos se puede utilizar en el diagnóstico, examen, tratamiento o prevención, etc. de una enfermedad relacionada con HTRA1 en el animal no humano. Cuando dicho péptido también inhibe HTRA1 humana, se puede utilizar el animal no humano: en la investigación y desarrollo no clínicos del péptido como un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico para una enfermedad relacionada con HTRA1 humana; o para realizar un test farmacológico o una prueba farmacocinética que utiliza animales no humanos como un modelo animal de la enfermedad; o para realizar una prueba de seguridad, un test de toxicidad o similares utilizando el animal no humano como un animal saludable.

**[0039]** El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención presenta una serie de ventajas, tales como: un peso molecular menor que el de otras biomoléculas, tales como anticuerpos para su uso como medicamentos y fármacos diagnósticos en la técnica; una producción relativamente fácil (mencionada más adelante) del mismo; propiedades físicas excelentes en términos de penetración tisular, estabilidad de almacenamiento, estabilidad térmica y similares; y un rango amplio de elección para la vía de administración, el método de administración, la preparación y similares para su uso como una composición farmacéutica (mencionada más adelante): Se puede ajustar la semivida en sangre del péptido de la presente invención utilizada como una composición farmacéutica para que sea más larga aplicando un método conocido, tal como la adición de una biomolécula o un polímero y aumentando así el peso molecular del péptido. El peso molecular de dicho péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención es menor que 10.000; preferiblemente, menos que 8.000 y más preferiblemente, de alrededor de 7.000 a 7.200. Una fracción de bucle variable que consiste en de 15Cys a 31Cys de la SEQ ID NO: 23 (Figura 29) o una fracción que consiste en de 15Cys a 63Cys de la misma (de ahora en adelante, denominada «fracción que contiene seis residuos de Cys») y que tiene actividad inhibidora de HTRA1 también se incluye en el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención. El peso molecular de la fracción de bucle variable es inferior a 2.500 y preferiblemente de alrededor de 1.800 a 2.000. El peso molecular de la fracción que contiene seis residuos de Cys es inferior a 6.000 y preferiblemente de alrededor de 5.300 a 5.500.

**[0040]** El mutante SPINK2 que mantiene al menos parcialmente el marco de SPINK2 (de ahora en adelante, denominado «mutante SPINK2»), incluido dentro del alcance del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención, se puede unir a HTRA1 y es capaz de unirse a, preferiblemente, HTRA1 de mamíferos, más preferiblemente HTRA1 de primates y aún más preferiblemente a HTRA1 de humanos. Dicho péptido, que se une a HTRA1, reconoce o se une a un péptido parcial, una conformación parcial o similares de HTRA1 (de ahora en adelante, dichos efectos de reconocimiento y de unión se denominan colectivamente «actividad de unión objetivo»).

**[0041]** En un aspecto, el péptido inhibidor de la presente invención es capaz de unirse a un fragmento inmunogénico de HTRA1. El fragmento inmunogénico de HTRA1 tiene uno o dos o más epítomos, mimotopos y otros determinantes antigénicos y, por consiguiente, es capaz de inducir una respuesta inmunológica o es capaz de hacer que se produzca un anticuerpo contra el fragmento.

**[0042]** Se puede evaluar, medir o determinar la unión del mutante SPINK2 de acuerdo con la presente invención a HTRA1 o el fragmento inmunogénico del mismo mediante el uso de un método conocido por un experto en la materia, tal como la medición de una afinidad de unión detectable (ELISA, análisis de resonancia de plasmón superficial, (de ahora en adelante, denominado «SPR, por sus siglas en inglés»)) (también denominado «método BIAcore»), calorimetría de valoración isotérmica (de ahora en adelante, denominada «ITC, por sus siglas en inglés»), citometría de flujo, un método de inmunoprecipitación, etc.).

**[0043]** Los ejemplos del ELISA incluyen un método que implica la detección de un péptido inhibidor de HTRA1 que ha reconocido y se ha unido a HTRA1 inmovilizado en una placa. La inmovilización de HTRA1 puede emplear biotina estreptavidina al igual que, por ejemplo, un anticuerpo para la inmovilización que reconoce una etiqueta fusionada con HTRA1. La detección del péptido inhibidor de HTRA1 puede emplear biotina estreptavidina marcada al igual que, por ejemplo, un anticuerpo marcado para la detección que reconoce una etiqueta fusionada con el péptido inhibidor de HTRA1. El etiquetado puede emplear biotina al igual que un método factible en el análisis bioquímico, tal como HRP, fosfatasa alcalina o FITC. La detección utilizando etiquetado enzimático puede emplear un sustrato cromogénico, tal como TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), p-

5 NPP (p-nitrofenil fosfato), OPD (o-fenilendiamina), ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Thermo Fisher Scientific Inc. ), un sustrato fluorescente como QuantaBlu(TM) Sustrato fluorogénico para peroxidasa (Thermo Fisher Scientific Inc.), y un sustrato quimioluminiscente. La medición de una señal de detección puede utilizar un lector de placas absorbente, un lector de placas fluorescente, un lector de placas luminiscente,

[0044] Algunos ejemplos de instrumentos para el análisis SPR son BIAcore(TM) (GE Healthcare), ProteOn(TM) (Bio-Rad Laboratories, Inc.), SPR-Navi(TM) (Oy BioNavis Ltd.), Spreeta (TM) (Texas Instruments Inc.), SPRI-PlexII (TM) (HORIBA, Ltd.) y Autolab SPR(TM) (Metrohm AG). Algunos ejemplos de un instrumento para el uso en BLI pueden incluir Octet(TM) (Pall Corp.).

10 [0045] Los ejemplos del método de inmunoprecipitación incluyen un método que implica la detección de HTRA1 que ha reconocido y se ha unido a un péptido inhibidor de HTRA1 inmovilizado en perlas. Las perlas magnéticas, las perlas de agarosa o similares pueden utilizarse como las perlas. La inmovilización del péptido inhibidor de HTRA1 puede emplear estreptavidina-biotina al igual que un anticuerpo que reconoce el péptido o una etiqueta fusionada con el péptido, proteína A o proteína G, etc. Las perlas se separan utilizando un imán, centrifugación o  
15 similares, y la HTRA1 precipitada con las perlas se detecta por SDS-PAGE o *Western Blot*. La detección de HTRA1 puede emplear estreptavidina marcada al igual que, por ejemplo, un anticuerpo marcado para la detección que reconoce una etiqueta fusionada con HTRA1. El etiquetado puede emplear biotina al igual que un método factible en el análisis bioquímico, tal como HRP, fosfatasa alcalina o FITC. La detección que utiliza etiquetado enzimático puede emplear el mismo sustrato que en ELISA. La medición de una señal de detección puede emplear ChemiDoc  
20 (TM) (Bio-Rad Laboratories, Inc.), LuminoGraph (ATTO Corp.), o similares.

[0046] En la presente invención, el término «reconocimiento específico», es decir, «unión específica», se utiliza para referirse a una unión que no es adsorción inespecífica. Los ejemplos de un criterio para determinar si la unión es específica o no pueden incluir actividad de unión  $EC_{50}$  en ELISA. Otros ejemplos de criterios de determinación pueden incluir la constante de disociación (de ahora en adelante, denominada « $K_D$ »). El valor  $K_D$  del péptido  
25 inhibidor de HTRA1 de acuerdo con la presente invención para HTRA1 es  $1 \times 10^{-4}$  M o menos,  $1 \times 10^{-5}$  M o menos,  $5 \times 10^{-6}$  M o menos,  $2 \times 10^{-6}$  M o menos o  $1 \times 10^{-6}$  M o menos, más preferiblemente  $5 \times 10^{-7}$  M o menos,  $2 \times 10^{-7}$  M o menos o  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, aún más preferiblemente  $5 \times 10^{-8}$  M o menos,  $2 \times 10^{-8}$  M o menos o  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, más preferiblemente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos,  $2 \times 10^{-9}$  M o menos o  $1 \times 10^{-9}$  M o menos. Otros ejemplos de los criterios de determinación pueden incluir resultados del análisis de un método de inmunoprecipitación. El péptido inhibidor de HTRA1 preferido de acuerdo con la presente invención se inmoviliza en perlas y se añade HTRA1 a las mismas. A continuación, se separan las perlas y se detecta la HTRA1 precipitada con las perlas. En este caso, se detecta la señal de HTRA1.

[0047] A pesar de la descripción anterior, la habilidad de unirse a HTRA1 o al fragmento inmunogénico del mismo no es esencial para el mutante SPINK2 que sirve como el péptido inhibidor de la presente invención, siempre y  
35 cuando el mutante SPINK2 tenga actividad inhibidora de HTRA1.

[0048] El péptido inhibidor de la presente invención puede ser competitivo en la unión de un sustrato de proteasa a HTRA1.

[0049] En algunos aspectos preferidos, el péptido inhibidor de la presente invención tiene un efecto protector de la retina. Por ejemplo, el inhibidor preferido de la presente invención puede suprimir la disminución del recuento de núcleos inducida por la exposición a la luz en una capa nuclear exterior en un modelo de daño retiniano inducido por exposición a la luz, el cual se describe detalladamente en los Ejemplos. Se ha detectado una mayor cantidad de la proteína de HTRA1 en el humor vítreo del grupo de exposición a la luz de este modelo en comparación con un grupo de no exposición. Por consiguiente, la presente invención divulga que: HTRA1 está involucrada en el daño retiniano y que la actividad inhibidora de HTRA1 provoca un efecto protector de la retina.

[0050] El mutante SPINK2 que sirve como el péptido inhibidor de la presente invención puede tener las actividades, propiedades, funciones, características, etc., tal como se ha descrito anteriormente, mientras que su secuencia de aminoácidos de longitud completa tiene una alta identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana de tipo silvestre. El mutante SPINK2 de la presente invención tiene 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, 95% o más, 98% o más o 99% o una alta identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1: Figura 13) de SPINK2 humana.

[0051] El término «identidad» se utiliza para referirse a una propiedad que indica el grado de similitud o relación entre dos secuencias. La identidad (%) de las secuencias de aminoácidos se calcula dividiendo el número de aminoácidos idénticos o residuos de aminoácidos entre el número total de aminoácidos o residuos de aminoácidos y multiplicado el valor numérico resultante por 100.

[0052] El término «espacio» se utiliza para referirse a un espacio en la alineación entre dos o más secuencias como resultado de la delección y/o adición en al menos una de las dos o más secuencias.

[0053] La identidad entre las dos secuencias de aminoácidos que tienen secuencias de aminoácidos completamente idénticas es de 100%. Siempre y cuando una de las secuencias de aminoácidos tenga la sustitución, delección o adición de uno o dos o más aminoácidos o residuos de aminoácidos en comparación con la otra secuencia de aminoácidos, la identidad entre estas dos secuencias de aminoácidos es inferior a 100%. Algunos ejemplos de un algoritmo o un programa para determinar la identidad entre las dos secuencias teniendo en cuenta un espacio pueden incluir aquellos que son conocidos por un experto en la técnica, tales como BLAST (Altschul, et al., Nucleic Acids Res., Vol. 25, pág. 3389-3402, 1997), BLAST2 (Altschul, et al., J. Mol. Biol., Vol. 215, pág. 403-410, 1990), y Smith-Waterman (Smith, et al., J. Mol. Biol., Vol. 147, pág. 195-197, 1981).

[0054] En la presente invención, el término «mutado» se utiliza para referirse a que uno o dos o más nucleótidos o residuos de nucleótidos o aminoácidos o residuos de aminoácidos se sustituyen, delecionan o insertan en una secuencia de nucleótidos o en una secuencia de aminoácidos en comparación con una molécula de ácido nucleico o péptido naturales. La secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 de la presente invención tiene uno o dos o más aminoácidos mutados o residuos de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana.

[0055] En un aspecto de la presente invención, la secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 puede tener cualquiera de entre:

la sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos de 16Ser a 22Gly por otros aminoácidos o residuos de aminoácidos;

la sustitución de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de 24Pro a 28Asn por otros aminoácidos o residuos de aminoácidos;

la sustitución de 1 o 2 aminoácidos de 39Ala y 43Thr por otros aminoácidos o residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1: Figura 13) de SPINK2 humana,

o puede tener estos aminoácidos como los de tipo salvaje (los 2 aminoácidos o residuos de aminoácidos están incluidos en una hélice  $\alpha$ ), siempre y cuando la estructura terciaria de la cadena principal de un bucle constituido por residuos de aminoácidos en las posiciones de la 16 a la 30, etc., sea capaz de al menos ejercer parcialmente una actividad inhibidora de HTRA1; cada uno de 15Cys, 23Cys, 31Cys, 42Cys, 45Cys y 63Cys es preferiblemente Cys, como en el tipo silvestre, para mantener los enlaces de disulfuro naturales. 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de la misma puede sustituirse con otros aminoácidos para deleccionar los enlaces de disulfuro naturales o generar un enlace de disulfuro no natural. Algunos péptidos inhibidores de HTRA1 preferidos de entre los mutantes SPINK2 de la presente invención mantienen la Cys en estas 6 posiciones, como en una SPINK2 natural, y retienen los enlaces de disulfuro. En algunas formas más preferidas de dicho péptido inhibidor 15Cys-45Cys, 23Cys-42Cys y 31Cys-63Cys forman respectivamente enlaces de disulfuro.

[0056] Cuando la secuencia de aminoácidos de dicho mutante SPINK2 está contenida en el péptido inhibidor de HTRA1, se prefiere que una estructura tridimensional constituida por, por ejemplo, una estructura de bucle que consiste en de 16Ser a 30Val, lámina  $\beta$  constituida por una hebra  $\beta$  (1) que consiste en 31Cys y 32Gly, y una hebra  $\beta$  (2) que consiste en de 57Ile a 59Arg, un hélice  $\alpha$  que consiste en de 41Glu a 51Gly, o una estructura de bucle, lámina  $\beta$  o una hélice  $\alpha$  similar a los mismos o al menos parcialmente correspondiente a los mismos (o a estas posiciones), contenida en la secuencia de aminoácidos de SPINK 2 de tipo silvestre, debería mantenerse en la medida en que pueda ejercerse la actividad inhibidora de HTRA1.

[0057] A continuación, se mencionarán las secuencias de aminoácidos de algunos péptidos inhibidores de HTRA1 entre los mutantes SPINK2 de la presente invención. Como se ha mencionado anteriormente, en la presente invención, «residuo de aminoácido» se refiere simplemente a un «aminoácido».

[0058] Cada uno del primero al undécimo Xaa (que son los mismos que X1 a X11, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 30 (Figura 42) es cualquier aminoácido arbitrario sin limitaciones particulares siempre y cuando el mutante resultante se una al HTRA1 e inhibe la actividad de HTRA1. De ahora en adelante, se describirán los aminoácidos preferidos de X1 a X11. Sin embargo, estos aminoácidos pueden incluir aminoácidos naturales, es decir, aminoácidos idénticos a aquellos de la secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana de tipo silvestre.

X1 en posición 1 es preferiblemente Asp, Glu, Gly, Ser o Ile, más preferiblemente Asp o Gly y aún más preferiblemente Gly;

X2 en posición 16 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Gln, Arg, Ser, Thr o Tyr, más preferiblemente Ala, Asp, Gly, His, Lys, Leu, Met, Gln, Arg, Ser o Thr, todavía más preferiblemente Ala, Gly, Lys, Leu, Ser o Thr, aún más preferiblemente Ala, Gly, Leu, Ser o Thr, y todavía aún más preferiblemente Ala o Ser;

5 X3 en posición 17 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Tyr, más preferiblemente Asp, Gly, His, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr o Tyr, todavía más preferiblemente Asp, His, Lys, Met o Gln, todavía aún más preferiblemente Asp or Gln.

X4 en posición 18 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr, más preferiblemente Asp, Phe, His, Met, Asn, Gln, Ser o todavía más preferiblemente Tyr, Asp, Phe, His, Ser or Tyr, todavía aún más preferiblemente Phe or His;

10 X5 en posición 19 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr, más preferiblemente Ala, Asp, Glu, Gly, His, Lys, Met, Asn, Gln, Arg, Ser o Val, todavía más preferiblemente Ala, Asp, Glu, Met o Asn, todavía aún más preferiblemente Ala, Asp o Glu;

15 X6 en posición 21 es preferiblemente Ala, Glu, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Ser, Trp o Tyr, más preferiblemente Glu, Phe, Ile, Leu, Met, Gln, Arg o Trp, todavía más preferiblemente Met o Trp, todavía aún más preferiblemente Met;

X7 en posición 24 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Met, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr, Más preferiblemente Asp, Glu, His, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr, todavía más preferiblemente Gln, Trp, Tyr or Val, y todavía aún más preferiblemente Tyr or Val;

20 X8 en posición 26 es preferiblemente Ala, Asp, Glu, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Val o Tyr, más preferiblemente Ala, Phe, His, Ile, Leu, Met, Gln, Arg, Ser, Val o Tyr, todavía más preferiblemente Phe, Leu or Tyr, todavía aún más preferiblemente Phe or Leu;

X9 en posición 27 es preferiblemente Glu, Phe, Leu, Ser, Thr o Tyr, más preferiblemente Phe, Leu, Ser, Thr o Tyr, todavía más preferiblemente Phe or Tyr, todavía aún más preferiblemente Tyr;

X10 en posición 39 es preferiblemente Ala, Glu, Met o Val y más preferiblemente Ala o Glu; y

25 X11 en posición 43 es preferiblemente Ala, Thr o Val, más preferiblemente Thr o Val.

**[0059]** X1 a X11 de tipo silvestre son Asp, Ser, Gln, Tyr, Arg, Pro, Pro, His, Phe, Ala y Thr, respectivamente. La posición 20 es Leu, la posición 22 es Gly, la posición 25 es Arg y la posición 28 es Asn.

30 **[0060]** En la presente invención, uno o varios aminoácidos pueden añadirse adicionalmente al lado N-terminal del primer aminoácido. Algunos ejemplos de dichos aminoácidos que pueden añadirse pueden incluir Ser-Leu y una secuencia de aminoácidos que consiste en un *S-tag* y un enlazador (SEQ ID NO: 31: Figura 43).

35 **[0061]** Se pueden añadir uno o varios aminoácidos a 63Cys posicionado en el C-terminal. Algunos ejemplos de dicha secuencia de aminoácidos pueden incluir una secuencia de aminoácidos que tiene 64Gly en el C-terminal y una secuencia de aminoácidos que tiene 65Gly en el C-terminal por la adición de Gly-Gly. Algunos ejemplos de dicho aminoácido que puede añadirse pueden incluir Gly-Gly y un hexámero de C-terminal (SEQ ID NO: 32: Figura 44).

40 **[0062]** Una forma preferida de una secuencia de aminoácidos preparada por la adición de otros aminoácidos a N-terminal y/o C-terminal de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 30 (Figura 42) o una secuencia de aminoácidos provenientes de SEQ ID NO: 30 incluye una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de entre las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y de la 23 a la 29 (Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 de la 35 a la 41) y una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es muestra en cualquiera de entre las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 (Figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34). Una forma todavía más preferida de la misma incluye una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de entre las SEQ ID NO: 24, 28 y 29 (Figuras 36, 40 y 41).

45 **[0063]** En la presente invención, un péptido preparado por la sustitución, adición y/o delección de uno o dos o más aminoácidos en, a o del péptido mutante SPINK2 o el aducto N-terminal y/o C-terminal del péptido mutante SPINK2 (de ahora en adelante, denominado «péptido padre») se refiere a un «derivado del péptido padre» o a un «derivado peptídico padre», (p. Ej., Ejemplo 6). Dicho «derivado» también se incluye dentro del alcance del «péptido» de la presente invención.

**[0064]** La secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 incluido dentro del alcance del péptido inhibidor de la presente invención puede comprender un aminoácido natural o un aminoácido mutado una secuencia de aminoácidos en fracciones distintas de X1 a X11, es decir, las posiciones de 2Pro a 15Cys, 20Pro, 22Gly, 23Cys, 25Arg, 28Asn a 38Tyr, 41Glu, 42Cys y 44Thr a 63Cys, en la secuencia de aminoácidos 1: Figura 13) de SPINK2 humana de tipo silvestre. Por ejemplo, el mutante SPINK2 puede tener una mutación en una o dos o más posiciones, siempre que la actividad inhibidora o el plegamiento de HTRA1 no se vean obstaculizados ni interferidos, al menos parcialmente. Dicha mutación se consigue mediante el uso de un método estándar conocido por un experto en la técnica. Algunos ejemplos típicos de la mutación en la secuencia de aminoácidos pueden incluir la sustitución, deleción o adición de una o dos o más aminoácidos. Los ejemplos de la sustitución pueden incluir sustitución conservadora. La sustitución conservadora sustituye un determinado residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido similar al mismo en características químicas, no sólo en cuanto a volumen, sino también en cuanto a polaridad. En otras partes de la presente especificación se describen ejemplos de sustitución conservadora. Por otro lado, las fracciones distintas de X1 a X11 puede aceptar la sustitución no conservadora de uno o dos o más aminoácidos siempre que la actividad inhibidora o el plegamiento de HTRA1 no se vean obstaculizados ni interferidos, al menos parcialmente.

**[0065]** En la secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 que sirve como el péptido inhibidor de la presente invención, de X1 a X11 son preferiblemente aminoácidos de X1 a X11, respectivamente en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y de la 23 a la 29 (Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 y de la 35 a la 41), y más preferiblemente SEQ ID NO: 24, 28 y 29 (Figuras 36, 40 y 41) y las fracciones distintas de X1 a X11 pueden tener un aminoácido o una secuencia de aminoácidos que al menos parcialmente no obstaculice ni interfiera con la actividad inhibidora o el plegamiento de HTRA1.

**[0066]** Ejemplos de la secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 que sirven como el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención pueden incluir una cualquiera de entre las siguientes secuencias de aminoácidos de (a) a (e):

1. (a) una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y de la 23 a la 29 (Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 25, 29, 31, 33 y de la 35 a la 41);
2. (b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibridiza, bajo condiciones estrictas, a una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos (a) y codifica una secuencia de aminoácidos comprendida en un péptido que presenta actividad inhibidora de HTRA1;
3. (c) una secuencia de aminoácidos que proviene de secuencias de aminoácidos (a) mediante la sustitución, deleción, adición y/o inserción de 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1 aminoácido y comprendida en un péptido que presenta actividad inhibidora de HTRA1;
4. (d) una secuencia de aminoácidos que tiene 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos (a) y está comprendida en un péptido que presenta actividad inhibidora de HTRA1; y
5. (e) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 (Figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34).

**[0067]** Sin embargo, la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1 no se limita a de (a) a (e). Cada molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en un mutante SPINK2 que tiene actividad inhibidora de HTRA1, y preferiblemente la secuencia de aminoácidos en la SEQ ID NO: 30 (Figura 42) se incluye dentro del alcance de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1.

**[0068]** Se puede introducir una mutación en el péptido inhibidor de la presente invención con el fin de mejorar su estabilidad de plegamiento, estabilidad térmica, estabilidad de almacenamiento, semivida en sangre, solubilidad en agua, actividad biológica, actividad farmacológica, efecto secundario, etc. Por ejemplo, se puede introducir un nuevo grupo reactivo, tal como Cys, a la misma mediante una mutación para conjugar el péptido inhibidor a una sustancia adicional, tal como polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), biotina, un péptido o una proteína. En la presente invención, se puede añadir, enlazar o unir el péptido inhibidor de HTRA1 a una fracción adicional. Se denomina colectivamente a dichos conjugados «conjugado del péptido inhibidor de HTRA1». En la presente invención, el término «conjugado» se utiliza para referirse a una molécula del péptido de la presente invención o a un fragmento del mismo que se ha añadido, enlazado o unido a una fracción adicional. El término «conjugado» o

«conjugación» incluye una forma a la que se une o enlaza una molécula determinada, mediante un agente o similares aptos para enlazar una molécula determinada a la cadena lateral de un aminoácido, que incluye una sustancia química, tal como un agente reticulante, a la N-terminal y/o C-terminal del péptido de la presente invención mediante un enfoque químico sintético, un enfoque de ingeniería genética o similares. Algunos ejemplos de dicha «fracción» para mejorar la mediavida en sangre pueden incluir moléculas de polialquilenglicol como el polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón, moléculas de ácidos grasos como el ácido palmítico, regiones Fc de inmunoglobulina, dominios CH3 de inmunoglobulina, dominios CH4 de inmunoglobulina, albúmina o fragmentos de la misma, péptidos de unión a albúmina, proteínas de unión a albúmina como la proteína G estreptocócica y transferrina. Como alternativa, la «fracción» puede unirse al péptido de la presente invención mediante un enlazador, tal como un enlazador peptídico.

**[0069]** El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención puede conjugarse con un fármaco adicional para ejercer o mejorar la actividad farmacológica. En el ámbito de anticuerpos, una técnica o una forma conocida por un experto en la técnica como conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) constituye algunos aspectos de la presente invención por la sustitución del anticuerpo con el péptido de la presente invención.

**[0070]** El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención puede además comprender una o dos o más fracciones que ejercen afinidad de unión, actividad inhibidora, actividad antagonista, actividad agonista o similares contra una molécula objetivo distinta de HTRA1, o puede conjugarse con dichas fracciones. Algunos ejemplos de la «fracción» pueden incluir anticuerpos o fragmentos de la misma, y proteínas que tienen un marco no anticuerpo, tal como mutantes SPINK2 o fragmentos de los mismos. En el ámbito de anticuerpos, una técnica o una forma conocida por un experto en la técnica como anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos biespecíficos constituye algunos aspectos del conjugado de la presente invención por la sustitución de al menos uno o dos o más «anticuerpos» comprendidos en la misma con el péptido de la presente invención.

**[0071]** El péptido de la presente invención o un precursor del mismo puede comprender una señal de secuencia. Una señal de secuencia presente en o añadida a N-terminal de un polipéptido determinado o un precursor del mismo es útil para entregar el polipéptido a un compartimento específico de una célula, por ejemplo, el periplasma de *E. coli* o el retículo endoplásmico de una célula eucariota. Muchas secuencias de señal son conocidas por un experto en la técnica y la secuencia de señal puede seleccionarse según las células hospedadoras. Ejemplos de la secuencia señal para secretar el péptido deseado en el periplasma de *E. coli* pueden incluir OmpA. La forma que comprende la secuencia de señal también puede incluirse en algunos aspectos del conjugado de la presente invención.

**[0072]** El péptido de la presente invención también puede etiquetarse por adelantado y, de este modo, purificado por cromatografía de afinidad. El péptido de la presente invención puede comprender, por ejemplo, biotina, Strep tag(TM), Strep tag II(TM), oligohistidina como His6, polihistidina, un dominio de inmunoglobulina, una proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa (GST), un péptido de unión a calmodulina (CBP), un hapteno como digoxigenina o dinitrofenol, una etiqueta epitópica como FLAG(TM), etiqueta myc o etiqueta HA (de ahora en adelante, denominado colectivamente como una «etiqueta de afinidad») en su C-terminal. La forma etiquetada también puede incluirse en algunos aspectos del conjugado de la presente invención. El conjugado de la presente invención puede ser un péptido (polipéptido) en su conjunto.

**[0073]** El péptido de la presente invención puede comprender una fracción para etiquetado. Concretamente, el péptido de la presente invención puede conjugarse con una fracción de etiqueta, como una etiqueta enzimática, una radiomarcación, una etiqueta coloreada, una etiqueta fluorescente, una etiqueta colorante, una etiqueta luminiscente, un hapteno, digoxigenina, biotina, un compuesto metálico, un metal u oro coloidal. La forma que comprende la fracción para etiquetado también puede incluirse en algunos aspectos del conjugado de la presente invención.

**[0074]** El péptido inhibidor de la presente invención puede comprender cualquiera de los aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales en su fracción peptídica y puede comprender un L-aminoácido y un D-aminoácido como un aminoácido natural.

**[0075]** La secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de la presente invención puede comprender cualquiera de los aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales y puede comprender un L-aminoácido y un D-aminoácido como un aminoácido natural.

**[0076]** El péptido inhibidor de la presente invención puede estar presente como un monómero, un dímero o un trímero u oligómero o multímero superior. El dímero o el trímero o el oligómero o multímero superior puede ser cualquiera de una forma homo constituida por monómeros simples, y una forma hetero constituida por dos o más monómeros diferentes. El monómero puede difundirse rápidamente y ser excelente en la permeación en los tejidos,

por ejemplo. El dímero, el oligómero y el multímero pueden tener un aspecto excelente, por ejemplo, alta afinidad local o actividad de unión para una molécula objetivo, una tasa de disociación lenta o alta actividad inhibidora de HTRA1. Además de la dimerización, oligomerización y multimerización espontáneas, la dimerización, oligomerización y multimerización intencionadas se consiguen introduciendo un dominio jun-fos, una cremallera de leucina o similar en el péptido inhibidor de la presente invención.

**[0077]** El péptido inhibidor de la presente invención puede unirse a una o dos o más moléculas objetivo o inhibir la actividad de las moléculas objetivo, en forma de un monómero, un dímero o un trímero u oligómero o multímero superior.

**[0078]** Algunos ejemplos de la forma que el péptido inhibidor de la presente invención puede tomar pueden incluir, pero no se limitan a, formas aisladas (preparaciones liofilizadas, soluciones, etc.), los conjugados mencionados anteriormente, y formas unidas a otras moléculas (formas inmovilizadas, asociados con una molécula diferente, formas unidas a una molécula objetivo, etc.). Se puede seleccionar de forma arbitraria una forma compatible con la expresión, purificación, uso, almacenamiento o similares.

### 3. Identificación de un péptido inhibidor de HTRA1

**[0079]** Se puede identificar el péptido inhibidor de HTRA1 mediante un método bien conocido por un experto en la técnica utilizando un material de partida, tal como la secuencia de aminoácidos de SPINK2 o la secuencia de aminoácidos (p. ej., una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y de 23 a 29 o el grupo que consiste en las Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 y de la 35 a la 41) del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos o una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos. Como un ejemplo preferido, el péptido inhibidor de HTRA1 puede identificarse de una biblioteca de mutantes SPINK2 humana utilizando la actividad inhibidora de HTRA1 como un indicador que puede combinarse con la actividad de unión de HTRA1 como otro indicador.

**[0080]** Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que sirve como un material de partida puede mutagenizarse y transferirse a un huésped bacteriano o eucariota apropiados mediante el uso de una técnica de ADN recombinante. La biblioteca de mutantes de SPINK2 se conoce como una técnica para identificar un aglutinante o inhibidor de una molécula objetivo. Por ejemplo, la divulgación del documento WO2012/105616. Después de la expresión de la secuencia de nucleótidos mutagenizada en el huésped apropiado, puede enriquecerse y/o seleccionarse de la biblioteca e identificarse un clon en el que un mutante de SPINK2 que tenga las propiedades, actividad, función, etc. deseadas esté vinculado a su genotipo. El enriquecimiento y/o selección del clon emplea un método conocido para un experto en la técnica, tal como un método de visualización bacteriana (Francisco, J.A., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 90, pág. 10444-10448), un método de visualización en levaduras (Boder, E.T., et al., (1997), Nat. Biotechnol., Vol. 15, pág. 553-557), un método de visualización en células de mamíferos (Ho M, et al., (2009), Métodos de Biol Mol., Vol. 525: pág. 337-52), un método de visualización de fagos (Smith, G.P. (1985), Science., Vol. 228, pág. 1315-1317), un método de visualización de ribosomas (Mattheakis LC, et al., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 91, núm. 19, pág. 9022-9029), un método de visualización de ácidos nucleicos, como la visualización de ARNm (Nemoto N, et al., (1997), FEES Lett., Vol. 414, núm. 2, pág. 405-408), o un método de detección de colonias (Pini, A. et al., (2002), Comb. Chem. La detección de alto rendimiento., Vol. 5, pág. 503-510). Se puede determinar la secuencia de nucleótidos de un mutante SPINK2 contenido en el clon seleccionado e identificado para determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos, tal como la secuencia de aminoácidos del mutante SPINK2 contenido en el clon, es decir, el péptido inhibidor de HTRA1.

**[0081]** Se puede obtener el mutante SPINK2 de la presente invención, por ejemplo, mutagenizando SPINK2 natural. El término «mutagénesis» se utiliza para referirse que uno o dos o más aminoácidos en sus respectivas posiciones de una secuencia de aminoácidos específica puede sustituirse por otros aminoácidos o delecionarse, o puede añadirse o insertarse un aminoácido ausente de la secuencia de aminoácidos. Una delección de este tipo o una adición o inserción de este tipo pueden cambiar la longitud de la secuencia. En el mutante SPINK2 de la presente invención, la mutagénesis puede ocurrir preferiblemente en una o dos o más posiciones de X1 a X11 en la secuencia de aminoácidos que se muestra EN SEQ ID NO: 30 (Figura 42).

**[0082]** Sin embargo, una forma que mantiene, después de dicha mutagénesis preferida, aminoácidos naturales en una o dos o más posiciones de X1 a X11, es decir, el mismo aminoácido que el presente en la posición específica en la secuencia de aminoácidos naturales también se incluye dentro del alcance del mutante siempre y cuando al menos un aminoácido esté mutado en el conjunto. Igualmente, en un aspecto de la presente invención, una forma que mantiene, después de la mutagénesis en una o más posiciones de fracciones distintas a de X1 a X11, los aminoácidos naturales en estas posiciones, es decir, el mismo aminoácido que el presente en la posición específica

en la secuencia de aminoácidos naturales también se incluye dentro del alcance del mutante siempre y cuando al menos un aminoácido esté mutado en el conjunto.

5 **[0083]** El término «mutagénesis aleatoria» se utiliza para referirse a que en una posición específica en una secuencia, se introducen uno o dos o más aminoácidos diferentes con una probabilidad determinada en la posición por mutagénesis. Las probabilidades de introducción de al menos dos aminoácidos diferentes pueden no ser siempre las mismas. La presente invención no excluye dichos al menos dos aminoácidos diferentes que incluye el aminoácido de origen natural (como uno de los aminoácidos). Dicho caso también se incluye dentro del alcance del término «mutagénesis aleatoria».

10 **[0084]** Se puede utilizar un método estándar conocido por un experto en la técnica como un método para mutagénesis aleatoria en una posición específica. Se puede conseguir la mutagénesis mediante, por ejemplo, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando una mezcla de oligonucleótidos sintéticos que incluyen una composición de nucleótidos degenerada en una posición específica en una secuencia. Por ejemplo, el uso del codón NNK o NNS (N = adenina, guanina, citosina o timina; K = guanina o timina; y S = guanina o citosina) provoca mutagénesis para introducir cualquiera de los 20 aminoácidos naturales, así como un codón de terminación, mientras que el uso del codón VVS (V = adenina, guanina o citosina) elimina la posibilidad de introducir Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr y Val y provoca mutagénesis para introducir cualquiera de los 12 aminoácidos naturales restantes. Por ejemplo, el uso del codón NMS (M = adenina o citosina) elimina la posibilidad de introducir Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp y Val y provoca mutagénesis para introducir cualquiera de los 11 aminoácidos naturales restantes. Se puede utilizar un codón específico, un codón artificial o similares para mutagénesis para introducir un aminoácido no natural.

25 **[0085]** También se puede realizar la mutagénesis de sitio dirigido a través del uso de información estructural sobre un objetivo que contiene una conformación y/o un péptido contra el objetivo o un péptido de tipo silvestre del cual proviene el péptido. En la presente invención, se puede introducir una mutación de sitio dirigido a través del uso de información estructural que incluya información de nivel superior sobre un HTRA1 objetivo y/o un mutante SPINK2 contra el objetivo o SPINK2 de tipo silvestre o un compuesto entre estos. En un ejemplo, se identifica un mutante SPINK2 que tiene actividad inhibidora HTRA1. Posteriormente, se obtiene un compuesto cristalino de HTRA1 y del mutante SPINK2 y se somete a una cristalografía de rayos X. Según los resultados del análisis, se identifica un sitio en la molécula de HTRA1 a la cual se une el mutante SPINK2 y un residuo de aminoácido en el mutante SPINK2 en interacción con el sitio. Se puede encontrar la correlación de la información estructural obtenida mediante dichos procedimientos con actividad inhibidora de HTRA1. Según la correlación de dicha estructura-actividad, se puede diseñar la sustitución de un aminoácido en una posición específica por un aminoácido específico, la inserción o deleción de un aminoácido a una posición específica o similares para confirmar realmente la actividad de HTRA1.

35 **[0086]** También puede lograrse la mutagénesis utilizando, por ejemplo, una unidad constitutiva de nucleótidos con especificidad de par de bases modificada, como la inosina.

**[0087]** Además, se consigue la mutagénesis en una posición aleatoria mediante, por ejemplo, PCR propensa a errores utilizando ADN polimerasa, como la ADN polimerasa Taq, que carece de una función de corrección de errores y produce una alta tasa de errores, o mutagénesis química.

40 **[0088]** Se puede enriquecer y/o seleccionar el péptido inhibidor de HTRA1 de una biblioteca, como una biblioteca de fagos o una biblioteca de colonias, que sea adecuada para el método de selección respectivo y conocida por un experto en la materia, mediante el uso de visualización bacteriana, visualización de levaduras, visualización de células de mamífero, visualización de fagos, visualización de ribosomas, visualización de ácidos nucleicos, selección de colonias o similares. Estas bibliotecas pueden construirse utilizando un vector y un método, como un fagémido para la biblioteca de fagos o un cósmido para la selección de colonias, que sean adecuados para cada biblioteca y conocidos por un experto en la técnica. Dicho vector puede ser un virus o un vector viral que infecte las células procariontas o las células eucariotas. Estos vectores recombinantes pueden prepararse mediante un método conocido por un experto en la técnica, tal como manipulación genética.

50 **[0089]** La visualización bacteriana es una técnica de fusión de una proteína deseada con, por ejemplo, una porción de la lipoproteína de membrana externa (Lpp) de *E. coli* y la proteína de membrana externa OmpA, y la visualización de la proteína deseada en la superficie de *E. coli*. Un grupo de ADN obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada se inserta en vectores adecuados para la visualización bacteriana, y las células bacterianas pueden transformarse con los vectores para obtener una biblioteca que visualice un grupo de proteínas mutagenizadas aleatoriamente en una superficie celular bacteriana transformada (Francisco, J.A., et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 90, pág. 10444- 10448).

**[0090]** La visualización de levaduras es una técnica de fusión de una proteína deseada con una proteína de cubierta, como la  $\alpha$ -aglutinina que está en la superficie celular de la levadura, y de visualización de la proteína deseada en la superficie de la levadura. La  $\alpha$ -aglutinina comprende una región hidrofóbica C-terminal con una señal putativa de fijación del anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), una señal de secuencia, un dominio activo, un dominio de pared celular y similares. La proteína deseada puede visualizarse en la superficie celular de la levadura mediante la manipulación de la misma. Un grupo de ADN obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada se inserta en vectores adecuados para la visualización de levaduras, y las células de levadura pueden transformarse con los vectores para obtener una biblioteca que visualice un grupo de proteínas mutagenizado aleatoriamente en la superficie celular de levadura transformada (Ueda, M.& Tanaka, A., *Biotechnol. Adv.*, Vol. 18, pág. 121-, 2000; Ueda, M.& Tanaka, A., *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 90, pág. 125-, 2000;).

**[0091]** La visualización de células animales es una técnica de fusión de una proteína deseada con, por ejemplo, la región transmembrana de una proteína de membrana tipificada por el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR, por sus siglas en inglés), y la visualización de la proteína deseada en la superficie de las células de mamíferos (p. ej., HEK293 y células de ovario de hámsteres chinos (CHO, por sus siglas en inglés), Un grupo de ADN obtenido por mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada se inserta en vectores adecuados para la visualización de células animales, y las células animales pueden transfectarse con los vectores para obtener una biblioteca que visualice un grupo de proteínas mutagenizado aleatoriamente en la superficie de células animales transfectadas (Ho M, et al., (2009), *Methods Mol Biol.* Vol. 525: pág. 337- 52).

**[0092]** La biblioteca deseada visualizada en células, tales como células de levadura, células bacterianas o células animales, puede incubarse en presencia de una molécula objetivo o ponerse en contacto con una molécula objetivo. Por ejemplo, las células de la biblioteca se incuban durante un período de tiempo determinado con HTRA1 modificada con biotina o similares. A continuación, se añade un soporte, tal como perlas magnéticas, a la misma y las células se separan del soporte. Por consiguiente, el soporte puede lavarse para efectuar la eliminación de la materia absorbida no específica y la materia de unión para recuperar un grupo celular que muestra un péptido, una colección de péptidos o una colección de péptidos enriquecida unida al soporte (que tenga HTRA1 unido al mismo). Igualmente, el grupo celular que muestra un péptido, una colección de péptidos o una colección de péptidos enriquecida unida al soporte (que tiene HTRA1 unida al mismo), o el grupo celular que muestra un péptido, una colección de péptidos o una colección de péptidos enriquecida unida a HTRA1, pueden recuperarse por clasificación de células activadas magnéticamente (MACS, por sus siglas en inglés) después de añadir las perlas magnéticas, o por FACS después de la tinción celular utilizando un anticuerpo antiHTRA1, respectivamente. Por ejemplo, pueden bloquearse (saturarse) un sitio de absorción no específico y/o un sitio de unión. La etapa de bloqueo puede incorporarse en el presente documento, siempre y cuando el bloqueo se realice mediante un método apropiado. Se recupera el vector del péptido expresado, la colección de péptidos o la colección de péptidos enriquecida obtenidos de esta manera, y se puede determinar la secuencia de nucleótidos del polinucleótido insertado en el vector para determinar la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Además, se puede transferir el vector otra vez a las células hospedadoras, y se puede repetir un ciclo del funcionamiento mencionado anteriormente de una vez a varias veces para enriquecer enormemente una colección de péptidos que se une a la molécula objetivo.

**[0093]** En el caso de la visualización de fagos, por ejemplo, el fagémido es un plásmido bacteriano que contiene un origen de replicación del plásmido, así como el segundo origen de replicación derivado de un bacteriófago monocatenario. Una célula que tiene el fagémido puede replicar el fagémido mediante un modo de replicación monocatenario por coinfección con M13 o un bacteriófago ayudante similar al mismo. Concretamente, el ADN fagémido monocatenario se empaqueta en una partícula infecciosa recubierta con una proteína de cubierta bacteriófaga. De esta manera, se puede formar el ADN fagémido como un plásmido clonado de ADN de doble cadena en una bacteria infectada, mientras que se puede formar el fagémido como una partícula similar a un bacteriófago a partir de un sobrenadante de cultivo de células coinfectadas. La partícula similar a un bacteriófago se inyecta en una bacteria que tiene F-pilus para la infección de la bacteria con el ADN, de manera que la partícula en sí misma pueda volver a formarse como un plásmido.

**[0094]** Un gen de fusión que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un péptido de prueba y un gen de proteína de cubierta bacteriófago se inserta en el fagémido, y se infecta una bacteria con el fagémido resultante. Las células se cultivan de manera que se pueda expresar el péptido o mostrar en las bacterias o en una partícula similar a un fago, o se puede producir como una proteína de fusión con la proteína de cubierta en una partícula de fago o en un sobrenadante del cultivo de la bacteria.

**[0095]** Por ejemplo, un gen de fusión que comprende el polinucleótido y el gen de la proteína de cubierta del bacteriófago gpIII se inserta en el fagémido, y *E.coli* se coinfecta con el fagémido resultante y M13 o un fago auxiliar al mismo, de manera que se pueden producir una proteína de fusión que comprende el péptido y la proteína de cubierta y liberar en el sobrenadante del cultivo de *E.coli*.

5 **[0096]** En el caso de utilizar varios vectores circulares y no circulares, por ejemplo, un vector de virus en vez del fagémido, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos del polinucleótido insertado en el vector puede expresarse o mostrarse en células o partículas similares a los virus que albergan el vector, o pueden producirse o liberarse en el sobrenadante del cultivo de las células, de acuerdo con un método conocido por un experto en la técnica.

10 **[0097]** Se puede incubar la biblioteca de expresión de péptidos obtenida de esta manera en presencia de una molécula objetivo o puede ponerse en contacto con una molécula objetivo. Por ejemplo, se incuba un soporte inmovilizado con HTRA1 durante un periodo determinado de tiempo con una fase móvil que contiene la biblioteca. A continuación, la fase móvil se separa del soporte. Por consiguiente, el soporte se lava para efectuar la eliminación de la materia absorbida no específica y la materia de unión. Un péptido, una colección de péptidos o una colección de péptidos enriquecida unida al soporte (que tiene HTRA1 unida al mismo) se puede recuperar por elución. La elución puede llevarse a cabo de manera no selectiva, por ejemplo, en presencia de una fuerza iónica relativamente alta, un pH bajo, unas condiciones de desnaturalización moderadas o una sal caotrópica, o puede llevarse a cabo de manera selectiva añadiendo una molécula objetivo soluble, tal como HTRA1, un anticuerpo que se une a la molécula objetivo, un ligando natural, un sustrato o similares y compitiendo con una molécula objetivo inmovilizada. Por ejemplo, pueden bloquearse un sitio de absorción no específico y/o un sitio de unión. La etapa de bloqueo puede incorporarse en el presente documento, siempre y cuando el bloqueo se realice mediante un método apropiado.

25 **[0098]** Se recupera el vector del péptido expresado, la colección de péptidos o la colección de péptidos enriquecida obtenidos de esta manera, y se puede determinar la secuencia de nucleótidos del polinucleótido insertado en el vector para determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Además, se puede transferir el vector otra vez a las células hospedadoras, y se puede repetir un ciclo del funcionamiento mencionado anteriormente de una vez a varias veces para enriquecer enormemente una colección de péptidos que se une a la molécula objetivo.

30 **[0099]** La visualización de ribosomas es una técnica de utilizar, por ejemplo, ARNm que codifica una proteína deseada y carece de codón de terminación, y un sistema de síntesis de proteínas sin células, y sintetizando así *in vitro* una molécula de la proteína deseada, su ARNm correspondiente y un ribosoma enlazado entre sí. Se puede obtener una biblioteca que muestra un grupo de proteínas mutagenizadas aleatoriamente en ribosomas por el uso de un grupo de ARNm obtenido por la mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada y un sistema de síntesis de proteínas sin células (Mattheakis LC, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 91, núm. 19, pág. 9022-9029).

40 **[0100]** La visualización de ácido nucleico, también llamada visualización de ARN es una técnica de utilizar, por ejemplo, un enlazador tal la puromicina estructuralmente similar al extremo 3' del ARNt tirosil, y sintetizar así una molécula de una proteína deseada, su ARNm codificante y un ribosoma unidos entre sí. Esta técnica emplea un sistema de síntesis de proteínas sin células, no células vivas, y permite por tanto la síntesis *in vitro*. Se puede obtener una biblioteca que muestra un grupo de proteínas mutagenizadas aleatoriamente en ribosomas por el uso de un grupo de ARNm obtenido por la mutagénesis aleatoria de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína determinada, un enlazador, tal como la puromicina, y un sistema de síntesis de proteínas sin células (Nemoto N, et al., (1997), FEES Lett., Vol. 414, núm. 2, pág. 405-408) .

45 **[0101]** La biblioteca de visualización de péptidos obtenida mediante un sistema de síntesis de proteínas sin células, tal como una visualización de ribosomas o una visualización de ácido nucleico, se puede incubar en presencia de una molécula objetivo o puede entrar en contacto con una molécula objetivo. Por ejemplo, se incuba un soporte inmovilizado con HTRA1 durante un periodo determinado de tiempo con una fase móvil que contiene la biblioteca. A continuación, la fase móvil se separa del soporte. Por consiguiente, el soporte se lava para efectuar la eliminación de la materia absorbida no específica y la materia de unión. Un péptido, una colección de péptidos o una colección de péptidos enriquecida unida al soporte (que tiene HTRA1 unida al mismo) se puede recuperar por elución. La elución puede llevarse a cabo de manera no selectiva, por ejemplo, en presencia de una fuerza iónica relativamente alta, un pH bajo, unas condiciones de desnaturalización moderadas o una sal caotrópica, o puede llevarse a cabo de manera selectiva añadiendo una molécula objetivo soluble, tal como HTRA1, un anticuerpo que se une a la molécula objetivo, un ligando natural, un sustrato o similares y compitiendo con una molécula objetivo inmovilizada. Por ejemplo, pueden bloquearse un sitio de absorción no específico y/o un sitio de unión. La etapa de bloqueo

puede incorporarse en el presente documento, siempre y cuando el bloqueo se realice mediante un método apropiado.

5 **[0102]** Se recupera el ácido nucleico del péptido expresado, la colección de péptidos o la colección de péptidos enriquecidos obtenidos de esta manera. En el caso de ARNm, la secuencia de nucleótidos puede determinarse después de una reacción de transcripción inversa en ADN para determinar una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. Además, el ácido nucleico recuperado se transcribe en ARNm y un ciclo del funcionamiento mencionado anteriormente puede repetirse de una vez a varias veces para enriquecer enormemente una colección de péptidos que se une a la molécula objetivo.

10 **[0103]** Siempre que el péptido, la colección de péptidos o la colección enriquecida de péptidos se conjuga previamente con una etiqueta de afinidad, el péptido o la colección pueden purificarse eficazmente. Por ejemplo, la colección de péptidos se conjuga previamente con un sustrato de proteasa como una etiqueta, de manera que el péptido pueda eluirse por escisión mediante la actividad de la proteasa.

15 **[0104]** De acuerdo con la información de secuencia obtenida y la función del péptido, etc., el clon obtenido o la biblioteca pueden además mutagenizarse, y un péptido mejorado en su función (p. ej., actividad inhibidora de HTRA1) propiedades físicas (estabilidad térmica, estabilidad de almacenamiento, etc.), cinética *in vivo* (distribución y semivida en sangre), etc., puede obtenerse de la biblioteca mutada.

**[0105]** El péptido inhibidor de HTRA1 puede identificarse al determinar si el péptido obtenido tiene o no tiene actividad inhibidora de HTRA1.

20 **[0106]** El péptido inhibidor de HTRA1 es preferiblemente capaz de mantener una estructura tridimensional constituida por, por ejemplo, una estructura de bucle que consiste en de 16Ser a 30Val, lámina  $\beta$  constituida por una hebra  $\beta$  (1) que consiste en 31Cys y 32Gly, y una hebra  $\beta$  (2) que consiste en de 57Ile a 59Arg, un hélice  $\alpha$  que consiste en de 41Glu a 51Gly, o una estructura de bucle, lámina  $\beta$  o una hélice  $\alpha$  similar a los mismos o al menos parcialmente correspondiente a los mismos (o a estas posiciones), contenida en la secuencia de aminoácidos de SPINK 2 de tipo silvestre, en la medida en que la actividad inhibidora de HTRA1 pueda ejercerse.  
25 Un péptido inhibidor de HTRA1 más preferido puede identificarse utilizando dicha estructura tridimensional (estructura entera o estructura parcial) como una parte de un indicador.

**4. Molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1, vector que comprende la molécula de ácido nucleico, célula que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector, y método para producir un péptido inhibidor de HTRA1 recombinante**

30 **[0107]** La presente invención también proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en el péptido inhibidor de HTRA1 (de ahora en adelante, denominada «molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1»), un vector recombinante que tiene una inserción del gen, una célula que alberga el gen o el vector, (de ahora en adelante, denominada «célula que contiene la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1») o una célula que produce el péptido inhibidor de HTRA1 (de ahora en adelante, denominada «célula productora de péptidos inhibidores de HTRA1»).

40 **[0108]** Algunos ejemplos preferidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención pueden incluir una molécula de ácido nucleico que comprende una cualquiera de entre las siguientes secuencias de nucleótidos de (a) a (e) (de ahora en adelante, denominada «secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de HTRA1»), una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de genes de anticuerpos y una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de genes de anticuerpos:

- 45 1. (a) una secuencia de aminoácidos que codifica una secuencia de aminoácidos que se muestra en una cualquiera de entre las SEQ ID NO: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, y de la 23 a la 29 (Figuras 15, 17, 19, 21, 23, 25, 25, 29, 31, 33, y de la 35 a la 41);
2. (b) una secuencia de nucleótidos que se muestra en una cualquiera de entre las SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 (Figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34);
- 50 3. (c) una secuencia de nucleótidos que se hibridiza, bajo condiciones estrictas, a una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos (a) o (b) y codifica una secuencia de aminoácidos comprendida en un péptido que presenta actividad inhibidora de HTRA1;

4. (d) una secuencia de nucleótidos que proviene de una secuencia de nucleótidos (a) o (b) mediante la sustitución, delección, adición y/o inserción de 1 a 15, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2, o 1 nucleótido o residuo de nucleótido y codifica una secuencia de aminoácidos comprendida en un péptido que presenta actividad inhibitora de HTRA1;
5. (e) una secuencia de nucleótidos que tiene 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad con una secuencia de nucleótidos (a) o (b) y codifica una secuencia de aminoácidos está comprendida en un péptido que presenta actividad inhibitora de HTRA1.

**[0109]** Sin embargo, la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibitor de HTRA1 no se limita a las secuencias de nucleótidos de (a) a (e). Cada molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos contenida en un mutante SPINK2 que tiene actividad inhibitora de HTRA1, y preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 30 (Figura 42) se incluye dentro del alcance de la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibitor de HTRA1.

**[0110]** Uno o dos o más codones correspondientes a cada aminoácido pueden utilizarse para diseñar la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos. Por tanto, una secuencia de nucleótidos que codifica una sola secuencia de aminoácidos de un péptido determinado puede tener una pluralidad de variaciones. Para la selección de dichos codones, los codones pueden seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el uso del codón de las células hospedadoras para la expresión para albergar un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos o un vector que comprende el polinucleótido, o puede ajustarse adecuadamente la frecuencia o índice de una pluralidad de codones utilizados. Por ejemplo, en el caso de utilizar células *Escherichia coli* como células hospedadoras, la secuencia de nucleótidos puede diseñarse utilizando codones con alta frecuencia de uso en *Escherichia coli*.

**[0111]** La molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibitor de HTRA1 puede enlazarse funcionalmente a una o dos o más secuencias reguladoras. La frase «enlazada funcionalmente» se utiliza para referirse a que se puede expresar la molécula de ácido nucleico enlazada o a que una secuencia de nucleótidos contenida en la molécula es expresable. La secuencia reguladora incluye un elemento de secuencia que incluye información sobre la regulación transcripcional y/o la regulación traslacional. Aunque la secuencia reguladora varía dependiendo de las especies, la secuencia reguladora incluye generalmente un promotor e incluye secuencias no codificantes 5' implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, por ejemplo, una caja -35/-10 procarionta y una secuencia Shine-Dalgarno o una caja TATA eucariota, una secuencia CAAT y una secuencia de cierre 5'. Esta secuencia puede incluir un elemento potenciador y/o un elemento represor, así como una secuencia de señalización traducible, una secuencia líder o similares para transportar un péptido natural o maduro a un compartimento específico dentro o fuera de una célula hospedadora. La secuencia reguladora puede incluir además una secuencia 3' no codificante, y esta secuencia puede comprender un elemento relacionado con la terminación de la transcripción o la poliadenilación, etc. Sin embargo, la secuencia relacionada con la terminación de la transcripción, cuando funciona insuficientemente en células hospedadoras específicas, puede sustituirse por una secuencia adecuada para las células.

**[0112]** Algunos ejemplos de la secuencia del promotor pueden incluir un promotor tet procarionta, un promotor lacUV5 y un promotor T7, y un promotor SV40 y un promotor CMV para células eucariotas.

**[0113]** La molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibitor de HTRA1 puede estar en una forma aislada o en una forma contenida en un vector u otro vehículo de clonación (de ahora en adelante, denominado simplemente "vector"; plásmido, fagémido, fago, baculovirus, cósmido, etc.) o en un cromosoma, aunque la forma no está limitada a ello. El vector puede comprender, además de la secuencia de nucleotídica del péptido inhibitor de HTRA1 y la secuencia reguladora, una secuencia replicante y una secuencia de control adecuadas para las células hospedadoras para su uso en la expresión, y un marcador selectivo que confiere un fenotipo que permite la selección de células que albergan la molécula de ácido nucleico por transformación o similar.

**[0114]** La molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibitor de HTRA1 o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos del péptido inhibitor de HTRA1 puede transferirse a células hospedadoras capaces de expresar el péptido o la secuencia de nucleótidos mediante un método conocido por un experto en la técnica, como la transformación. Las células hospedadoras que albergan la molécula de ácido nucleico o el vector pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para la expresión del péptido o de la secuencia de nucleótidos. Las células hospedadoras pueden ser cualquiera de entre células procariontas y eucariotas. Algunos ejemplos de las procariontas pueden incluir *E.coli* y *Bacillus subtilis*. Algunos ejemplos de las células eucariotas pueden incluir células de levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, células de insectos, tales como SF9 y High 5, y células animales, tales como células HeLa, células CHO, células COS y NS0. El péptido de la presente invención expresado al utilizar células hospedadoras, tales como células eucariotas, puede experimentar una modificación

5 postraduccional deseada. algunos ejemplos de la modificación postraduccional pueden incluir la adición de un grupo funcional, tal como una cadena de azúcar, la adición de un péptido o de una proteína y la conversión de las propiedades químicas de un aminoácido. Como alternativa, el péptido de la presente invención puede modificarse artificialmente como se desee. Dicha forma modificada del péptido también se incluye dentro del alcance del «péptido» de la presente invención.

10 **[0115]** La presente invención también incluye un método para producir el péptido inhibidor de HTRA1. El método comprende: etapa 1 de cultivo de una célula hospedadora que alberga la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor de HTRA1 o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos del péptido inhibidor de HTRA1. O una célula que expresa el péptido inhibidor de HTRA1; y/o etapa 2 de recuperación del péptido inhibidor de HTRA1 de los cultivos obtenidos en la etapa 1. En la etapa 2, se puede aplicar una operación, tal como fraccionamiento, cromatografía o purificación, conocida por un experto en la técnica. Por ejemplo, la purificación por afinidad utilizando el anticuerpo de la presente invención mencionada más adelante es aplicable a la misma.

15 **[0116]** En algunos aspectos de la presente invención, el péptido inhibidor de HTRA1 tiene un enlace de disulfuro intramolecular. Puede preferirse que el péptido que tiene un enlace de disulfuro intramolecular se entregue a un compartimento celular que tenga un entorno redox oxidante, utilizando una secuencia señal o similar. El entorno oxidante se puede proporcionar por el periplasma de una bacteria gramnegativa, como *E. coli*, el entorno extracelular de una bacteria grampositiva, el lumen del retículo endoplásmico de una célula eucariota, o similares. Dicho entorno es capaz de promover la formación de un enlace de disulfuro estructural. Como alternativa, el péptido que tiene un enlace de disulfuro intramolecular puede prepararse en el citoplasma de una célula hospedadora, tal como una célula *E.coli*. En este caso, el péptido puede adquirirse directamente en un estado plegado soluble o recuperarse en forma de un cuerpo de inclusión y posteriormente reconstruirse *in vitro*. Además, se selecciona una célula hospedadora que tiene un entorno intracelular oxidante y el péptido que tiene un enlace de disulfuro intramolecular también puede prepararse en el citoplasma del mismo. Por otro lado, cuando el péptido inhibidor de HTRA1 no tiene un enlace de disulfuro intramolecular, el péptido puede prepararse en un compartimento celular que tiene un entorno redox reductor, por ejemplo, el citoplasma de una bacteria gramnegativa.

20 **[0117]** El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención también puede producirse por otros métodos conocidos por un experto en la técnica, tal como síntesis química, por ejemplo, el método de síntesis de un péptido en fase sólida de Merrifield, et al. y un método de síntesis de péptidos químicos sintéticos orgánicos utilizando t-butoxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), y traducción *in vitro*.

30 **[0118]** En algunos aspectos, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a un péptido mutante SPINK2 que tiene actividad inhibitoria de HTRA1 y un fragmento funcional del mismo. El anticuerpo puede ser cualquiera de entre un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal no está limitado particularmente siempre y cuando el anticuerpo monoclonal sea inmunoglobulina o provenga de la misma. El fragmento funcional del anticuerpo no está limitado siempre y cuando el fragmento funcional tenga actividad de unión de antígenos, es decir, actividad de unión contra el péptido mutante SPINK2. Algunos ejemplos del mismo incluyen ambas o una de las cadenas pesadas y ligeras o un fragmento de la misma, un fragmento de anticuerpo que carece de una región constante o una región Fc, y un conjugado con una proteína adicional o una sustancia para etiquetado. Dicho anticuerpo y fragmento funcional del mismo pueden prepararse por un método conocido por un experto en la técnica y son útiles en, por ejemplo, la purificación del péptido mutante SPINK2 por cromatografía de afinidad, examen clínico relacionado con una composición farmacéutica que comprende el péptido o el uso del mismo, la detección del péptido en un diagnóstico o similares, e inmunoensayo. El anticuerpo de la presente invención puede purificarse por cromatografía de afinidad utilizando el péptido de la presente invención al cual se une el anticuerpo.

### 5. Composición farmacéutica

45 **[0119]** La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 o un conjugado del mismo.

50 **[0120]** La composición farmacéutica que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo es útil en el tratamiento y/o prevención de varias enfermedades inducidas o exacerbadas por HTRA1 y permiten la supresión de la inducción o exacerbación, cura, mantenimiento o mejora de un síntoma, evitar una enfermedad secundaria, etc. al inhibir o suprimir la expresión o función de HTRA1 (de ahora en adelante, estas enfermedades se denominan «enfermedades relacionadas con HTRA1».) Las enfermedades relacionadas con HTRA1 también incluyen varias enfermedades que permiten la supresión de la inducción o exacerbación, cura, mantenimiento o mejora de un síntoma, evitar una enfermedad secundaria, etc. a través de un efecto protector de la retina. El péptido inhibidor de HTRA1 tiene un efecto protector de la retina y es útil en el tratamiento y/o prevención de estas enfermedades relacionadas con HTRA1.

**[0121]** Algunos ejemplos de la enfermedad relacionada con HTRA1 pueden incluir, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad, vasculopatía coroidea polipoidea, artritis reumatoide y osteoartritis. Algunos ejemplos de la degeneración macular relacionada con la edad pueden incluir, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad húmeda, degeneración macular relacionada con la edad seca y atrofia geográfica. También, la composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar como un agente protector de las células fotorreceptoras, un agente protector de la retina y similares (denominados colectivamente «agente protector de la retina»).

**[0122]** La degeneración macular relacionada con la edad se divide en de tipo húmedo y de tipo seco. El tipo húmedo se clasifica además en degeneración macular relacionada con la edad típica (DMAE típica), vasculopatía coroidea polipoidea (VCP) y proliferación angiomasosa retiniana (PAR). Para el tipo húmedo, existen métodos de tratamiento tales como fármacos anti-VEGF y la terapia fotodinámica (TFD), que, sin embargo, no siempre son suficientes. Para el tipo seco, solamente se practican modificaciones en la dieta o la ingesta de suplementos basados en el estudio de enfermedades oculares relacionadas con la edad (AREDS).

**[0123]** La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en el tratamiento o prevención de la degeneración macular relacionada con la edad, por ejemplo, como se observa en los resultados que muestran que: el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior ha disminuido en un grupo de control de modelos de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz, mientras que la administración del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención, antes o después de la luz, suprimió la disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior en un grupo de administración de modelos de ratas (Ejemplos 5, 10 y 14); y el área de las células del epitelio pigmentario de la retina (células RPE) o el número de células RPE que tienen un área celular igual a o mayor que un valor determinado aumentó en un grupo de control de modelos de daño retiniano del conejos (mencionado más adelante) preparado con una dieta rica en grasas e hidroquinona, mientras que la administración del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención suprimió este aumento en un grupo de administración de los modelos de conejos (Ejemplo 11). El modelo de daño retiniano en conejos tiene en cuenta los factores de riesgo de la degeneración macular relacionada con la edad seca humana y, por lo tanto, es excelente como modelo de la degeneración macular relacionada con la edad seca en particular.

**[0124]** En una prueba de inducción de VEGF de ARNm que utiliza células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), la administración del péptido inhibidor de HTRA1 se confirmó para suprimir la expresión de ARNm VEGF (Ejemplo 12). La inducción de VEGF de las células del epitelio pigmentario de la retina está involucrada en la patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda (Klettner A. et al., (2009), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., Vol. 247: pág. 1487-1492). Además, se considera que dicha inducción mórbida de VEGF también está involucrada en el mantenimiento de la condición patológica, lo que indica que el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención es útil en el tratamiento y prevención de la degeneración macular relacionada con la edad seca y la degeneración macular relacionada con la edad húmeda.

**[0125]** En una prueba de migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), la administración del péptido inhibidor de HTRA1 se confirmó para suprimir la migración (Ejemplo 13), lo que indica que el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención es útil en el tratamiento y prevención de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda caracterizada por angiogénesis.

**[0126]** La degeneración macular relacionada con la edad húmeda es progresiva. Aunque la administración de un fármaco antiVEGF pueda suprimir temporalmente el estado de enfermedad, la recurrencia repetida con una alta frecuencia es problemática (Yand S, et al., Drug Des Devel Ther., Vol. 2, núm. 10: pág. 1857-67, 2016.) Los problemas de los fármacos descubiertos recientemente en los últimos años son el desarrollo de atrofia y una disminución de la agudeza visual en los pacientes con degeneración macular relacionada con la edad húmeda (Berg K, et al., Acta Ophthalmologica, Vol. 95, núm. 8: pág. 796-802, 2017). La administración del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención sola o mediante el uso combinado con un fármaco antiVEGF puede ejercer un efecto terapéutico en la degeneración macular relacionada con la edad húmeda (incluyendo vasculopatía coroidea polipoidea y proliferación angiomasosa retiniana). Además, la administración profiláctica del péptido puede prevenir o retrasar la recurrencia del estado de enfermedad y retrasar el inicio o reinicio del tratamiento con un fármaco antiVEGF, por ejemplo. Además, el péptido trabaja de manera supresora en el desarrollo de la atrofia en los pacientes con degeneración macular relacionada con la edad húmeda y, por lo tanto, es capaz de generar beneficios a largo plazo en términos de agudeza visual.

**[0127]** El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención es excelente en términos de penetración en el tejido (Ejemplo 11) y también excelente en términos de sus propiedades físicas, estabilidad, seguridad, cinética después de la administración, productividad, etc. y, por lo tanto, puede contenerse preferiblemente como un ingrediente activo en una composición farmacéutica.

**[0128]** La composición farmacéutica de la presente invención puede contener una cantidad efectiva terapéutica o profilácticamente del péptido inhibidor de HTRA1 o del conjugado del mismo y un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 **[0129]** El término «cantidad efectiva terapéutica o profilácticamente» se utiliza para referirse a una cantidad que ejerce un efecto terapéutico o profiláctico en una enfermedad específica a través de una forma farmacéutica y una vía de administración, y es sinónimo de "cantidad farmacológicamente eficaz".

10 **[0130]** La composición farmacéutica de la presente invención puede contener una sustancia para alterar, mantener o retener pH, presión osmótica, la viscosidad, la transparencia, el color, la isotonicidad, la esterilidad, o la estabilidad, la solubilidad, la velocidad de liberación sostenida, la absortividad, la penetración, forma farmacéutica, la resistencia, las propiedades, la forma, etc. de la composición o del péptido de la presente invención o del conjugado del mismo contenido en él. La sustancia farmacéutica no se limita particularmente siempre y cuando la sustancia sea aceptable farmacológicamente. Por ejemplo, a toxicidad nula o baja es una propiedad que posee preferentemente la sustancia farmacéutica.

15 **[0131]** Algunos ejemplos de la sustancia farmacéutica pueden incluir las siguientes sustancias, pero no se limitan a la misma: aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, histidina, arginina y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato sódico y bisulfito sódico; tampones como los tampones de fosfato, citrato o borato, el bicarbonato de sodio y las soluciones Tris-HCl; rellenos tales como manitol y la glicina; agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés); agentes complejantes tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β-ciclodextrina e hidroxipropil-β-ciclodextrina; agentes de carga como glucosa, manosa y dextrina; otros hidrocarburos tales como monosacáridos, disacáridos, glucosa, manosa y dextrina; colorantes; aromatizantes; diluyentes; emulsionantes; polímeros hidrófilos tal como la polivinilpirrolidina; polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal; antisépticos como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno; disolventes como glicerina, propilenglicol y polietilenglicol; 20 alcoholes de azúcar como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; surfactantes como PEG, éster de sorbitán, polisorbatos como polisorbato 20 y polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina y colesterol; potenciadores de la estabilidad como la sacarosa y el sorbitol; potenciadores de la elasticidad, como cloruro de sodio, cloruro potásico, manitol y sorbitol; agentes transportadores; diluyentes: excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos.

30 **[0132]** Dicha sustancia farmacéutica se añade al péptido inhibidor de HTRA1 en una cantidad de 0,001 a 1000 veces, preferiblemente 0,01 a 100 veces, y más preferiblemente 0,1 a 10 veces más que el peso del péptido inhibidor de HTRA1.

**[0133]** Un liposoma que contiene el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo, o una composición farmacéutica que contiene una forma modificada que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo conjugado con un liposoma también está incluido en la composición farmacéutica de la presente invención.

35 **[0134]** Un excipiente o un portador no se limita particularmente siempre y cuando el excipiente o portador sea normalmente un líquido o un sólido y es agua para inyección, salina normal, fluido cerebroespinal artificial u otras sustancias para su uso en preparaciones para administración oral o administración parenteral. Algunos ejemplos de la salina normal pueden incluir salina normal neutra o salina normal que contiene seroalbúmina.

40 **[0135]** Algunos ejemplos del tampón pueden incluir un tampón Tris preparado para llevar el pH final de la composición farmacéutica a de 7,0 a 8,5, una solución amortiguadora de acetato preparada para que el pH final de la misma sea de 4,0 a 5,5, una solución amortiguadora de citrato preparada para que pH final de la misma sea de 5,0 a 8,0, y una solución amortiguadora de histidina preparada para que el pH final de la misma sea de 5,0 a 8,0.

45 **[0136]** La composición farmacéutica de la presente invención es un sólido, un líquido, una suspensión o similares. Otro ejemplo de la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir preparaciones liofilizadas. Las preparaciones liofilizadas pueden formarse utilizando un excipiente tal como sacarosa.

50 **[0137]** La vía de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser cualquiera de entre instilación ocular, administración enteral, administración local y administración parenteral. Algunos ejemplos de la misma pueden incluir instilación conjuntival, administración intravítrea, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración transdérmica, administración intraósea y administración intraarticular.

5 **[0138]** La receta de la composición farmacéutica puede determinarse de acuerdo con un método de administración, la afinidad de unión de HTRA1 del péptido inhibidor de HTRA1, etc. el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención que tiene una actividad inhibidora más fuerte (valor  $IC_{50}$  más pequeño) contra la HTRA1 objetivo o que tiene una mayor afinidad (valor  $K_D$  menor) para la proteína HTRA1 es capaz de ejercer sus efectos medicinales en una dosis menor.

10 **[0139]** La dosis del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo no está limitado siempre y cuando la dosis sea una cantidad farmacológicamente efectiva. La dosis puede determinarse apropiadamente de acuerdo con las especies de un individuo, del tipo de enfermedad, síntomas, sexo, edad, condiciones preexistentes, la afinidad de unión del péptido para la proteína HTRA1 o su actividad biológica y otros factores. La dosis es normalmente de 0,01 a 1000 mg/kg y preferiblemente de 0,1 a 100 mg/kg que puede administrarse una vez al día a cada 180 días o dos veces o tres o más veces al día.

15 **[0140]** Algunos ejemplos de la forma de la composición farmacéutica puede incluir inyecciones (incluidos los preparados liofilizados y las infusiones por goteo), supositorios, preparados de absorción transnasal, preparados de absorción transdérmica, agentes sublinguales, cápsulas, comprimidos, pomadas, gránulos, aerosoles, píldoras, polvos, suspensiones, emulsiones, colirios y formulaciones de implantes biológicos

20 **[0141]** La composición farmacéutica que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo como un ingrediente activo puede administrarse simultáneamente o por separado de un medicamento adicional. Por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo como un ingrediente activo puede administrarse después de la administración del medicamento adicional, o el medicamento adicional puede administrarse después de la administración de la composición farmacéutica. Como alternativa, la composición farmacéutica y el medicamento adicional pueden administrarse simultáneamente. Para la administración simultánea, el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo y el medicamento adicional pueden estar contenidos en una única preparación o pueden contenerse en preparaciones separadas (una pluralidad de preparaciones).

25 **[0142]** Algunos ejemplos del medicamento adicional utilizando en combinación con la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir agentes antiVEGF, agentes antiinflamatorios, agentes neutralizadores de citoquinas inflamatorias e inhibidores de la vía de activación del complemento. Los agentes antiVEGF se clasifican en anticuerpos antiVEGF, inhibidores de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF y receptores solubles de VEGF, etc., e incluyen bevacizumab, ranibizumab, aflibercept, pegaptanib, brolucizumab y similares. El agente antiinflamatorio no está particularmente limitado siempre que el agente antiinflamatorio pueda administrarse localmente para suprimir la inflamación intraocular o intraarticular. Ejemplos del agente neutralizador de citoquinas inflamatorias incluyen anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos anti-interleucina-6 (de ahora en adelante, denominado "IL-6"), anticuerpos anti-receptores de IL-6 y receptores solubles de TNF, y pueden incluir específicamente infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab, tocilizumab y etanercept. Ejemplos del inhibidor de la vía de activación del complemento pueden incluir lampalizumab. Estos medicamentos son adecuados para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con HTRA1 y también pueden combinarse con la composición farmacéutica de la presente invención en el tratamiento o prevención de enfermedades distintas de las enfermedades relacionadas con HTRA1.

40 **[0143]** Se puede utilizar uno de estos medicamentos adicionales, o dos o tres o más del mismo pueden administrarse o recibirse. Estos enfoques se denominan colectivamente «uso combinado con el medicamento adicional» de o «combinación con el medicamento adicional» y la composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención que comprende el medicamento adicional además del anticuerpo de la presente invención, un fragmento de unión del mismo, o una forma modificada del anticuerpo o del fragmento, o utilizados en combinación con la terapia adicional también se incluye en la presente invención como un aspecto del «uso combinado con el medicamento adicional» o la «combinación con el medicamento adicional».

50 **[0144]** La presente invención también proporciona un péptido mutante SPINK2 o un conjugado del mismo, como se define en el presente documento, para su uso en un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con HTRA1, tal como la degeneración macular relacionada con la edad, uso del péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de la enfermedad, y uso del péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo para el tratamiento o prevención de la enfermedad. La presente invención también incluye un kit para el tratamiento o prevención que comprende el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo.

55 **[0145]** La presente invención proporciona además un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo, un vector que

comprende el polinucleótido, y una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido o el vector o que comprende una célula que expresa el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo. Por ejemplo, el polinucleótido y el vector pueden aplicarse a la terapia genética de enfermedades relacionadas con HTRA1 mediante un enfoque conocido. La célula puede aplicarse a la terapia celular de enfermedades relacionadas con HTRA1 mediante un enfoque conocido. También, el polinucleótido o el vector pueden transferirse, por ejemplo, a células autólogas o alogénicas (células homólogas) para preparar células para terapia celular. Dicho polinucleótido y vector también se incluyen como composiciones para la preparación de fármacos de terapia celular en la presente invención. Sin embargo, la forma de la composición farmacéutica de la presente invención que comprende el polinucleótido, el vector, la célula o similares no se limita a las descritas anteriormente

#### 6. Composición para diagnóstico y métodos de detección y separación de HTRA1

[0146] El péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención o el conjugado del mismo puede tener actividad de unión de HTRA1 además de actividad inhibidora de la proteasa HTRA1 y puede utilizarse en diversos estudios, como el uso como control positivo en estudios de búsqueda de inhibidores de HTRA1, la detección de HTRA1, el examen y diagnóstico mediante la detección, la separación de HTRA1, reactivos y otros fines. Para la detección o separación de HTRA1, se puede inmovilizar al menos uno de los péptidos de la presente invención y HTRA1.

[0147] La presente invención proporciona una composición para detección o para diagnóstico (de ahora en adelante, denominada colectivamente "composición para diagnóstico") que comprende el péptido de la presente invención que se une a HTRA1, o al conjugado del mismo.

[0148] La composición para el diagnóstico de la presente invención es útil en el examen o diagnóstico de enfermedades relacionadas con HTRA1, expresión de HTRA1, etc. En la presente invención, los ejemplos de examen o diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, la determinación o medición del riesgo de contraer una enfermedad, la determinación de la presencia o ausencia de una enfermedad, la medición del grado de progresión o exacerbación, la medición o determinación del efecto de la medicación con una composición farmacéutica que comprenda el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo, la medición o determinación del efecto de un tratamiento distinto de la medicación, la medición del riesgo de recurrencia y la determinación de la presencia o ausencia de recurrencia.

[0149] La composición para diagnóstico de la presente invención es útil en la identificación de un individuo receptor para el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo, una composición que comprende el péptido o el conjugado del mismo, o una composición farmacéutica que comprende el péptido o el conjugado del mismo.

[0150] La composición para el diagnóstico puede contener un tampón de pH, un ajustador de la presión osmótica, sales, un estabilizador, un antiséptico, un revelador, un sensibilizador, un agente de prevención de la agregación y similares.

[0151] La presente invención también proporciona un método in vitro para examinar o diagnosticar una enfermedad relacionada con HTRA1, uso del péptido de la presente invención para preparar una composición para el diagnóstico de la enfermedad y uso del péptido de la presente invención que se une a HTRA1, o el conjugado del mismo para examinar o diagnosticar la enfermedad. La presente invención también incluye un kit para el examen o diagnóstico que comprende el péptido de la presente invención o el conjugado del mismo.

[0152] El método de examen o diagnóstico que comprende el péptido de la presente invención que se une a HTRA1 es deseablemente ELISA sándwich. Como alternativa, se puede utilizar un método de detección habitual tales como ELISA, RIA, ELISPOT, *Dot Blot*, un método de Ouchterlony, CIE, CLIA o citometría de flujo. El examen o diagnóstico también se consiguen mediante un método basado en un método de inmunoprecipitación.

[0153] La presente invención también proporciona un método para detectar o medir HTRA1 en una muestra del ensayo. Dicha un método de detección o de medición puede emplear la composición para el diagnóstico de la presente invención. Se puede detectar HTRA1 en una muestra del ensayo al: entrar en contacto el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo con una muestra del ensayo (etapa 1); y, posteriormente, al medir la cantidad de HTRA1 unida al péptido (etapa 2). La etapa 1 puede incluir, por ejemplo, inmovilizar un conjugado del péptido inhibidor de HTRA1 con una región Fc de inmunoglobulina en perlas magnéticas mediante proteína G, y añadiendo la muestra del ensayo a las mismas. La etapa 2 puede incluir, por ejemplo, separar las perlas magnéticas y analizar una proteína soluble precipitada con las perlas mediante SDS-PAGE o *Western Blot* para detectar HTRA1. Además de una muestra derivada de un animal humano o no humano, incluso una muestra tratada de forma artificial, tal como una proteína recombinante, puede estar sujeta a esta medición. Algunos ejemplos de la muestra del ensayo derivada individualmente de un organismo pueden incluir, pero sin limitarse a, sangre, líquido sinovial, líquido

ascítico, linfa, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, saliva, esputo, sobrenadantes de homogeneizado de tejidos y sección de tejido.

5 **[0154]** La detección de HTRA1 puede realizarse no solamente *in vitro*, sino también *in vivo*. En el caso del diagnóstico por imagen, se puede utilizar el péptido inhibidor de HTRA1 o el conjugado del mismo marcado con un radionucleido o emisor de luz farmacéuticamente aceptable. La etapa 1 puede incluir, por ejemplo, administrar el péptido marcado o un conjugado del mismo a un sujeto de prueba. La etapa 2 puede incluir, por ejemplo, obtener una imagen mediante el uso de una técnica de diagnóstico por imagen, tal como PET/CT, y determinar o examinar la presencia de HTRA1.

10 **[0155]** El péptido o el conjugado del mismo contenido en la composición para el diagnóstico de la presente invención se une a HTRA1 y preferiblemente tiene actividad de unión específica de HTRA1.

15 **[0156]** La presente invención también incluye un método para identificar un receptor individual de la composición farmacéutica de la presente invención. En dicho método de identificación, se mide HTRA1 en una muestra derivada de un individuo utilizando el péptido inhibidor de HTRA1 de la presente invención, y el individuo puede determinarse o ser positivo cuando se detecta HTRA1 en una muestra o cuando una mayor cantidad de HTRA1 se detecta en la misma en comparación con la cantidad de HTRA1 detectada en una muestra derivada de un individuo sano. Este método puede emplear la composición para el diagnóstico de la presente invención.

**[0157]** En un aspecto preferido del método de identificación, el individuo tiene una enfermedad relacionada con HTRA1 o tiene un riesgo de adquirir la enfermedad.

20 **[0158]** La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse al individuo que se determine positivo en el método de identificación.

25 **[0159]** HTRA1 puede separarse concretamente de una muestra en la que HTRA1 coexista con otros componentes, utilizando el péptido de la presente invención que presenta actividad de unión específica de HTRA1, o el conjugado del mismo. La liberación de HTRA1 del péptido puede realizarse de forma no selectiva, por ejemplo, en presencia de una fuerza iónica relativamente alta, pH bajo, condiciones de desnaturalización moderada o sal caotrópica, y se realiza preferentemente sin atenuar la actividad proteasa de HTRA1.

**7. Método para identificar fármacos terapéuticos o fármacos profilácticos para enfermedades relacionadas con HTRA1**

30 **[0160]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico para una enfermedad relacionada con HTRA1 y, preferiblemente, la degeneración macular relacionada con la edad, o un candidato de la misma utilizando la actividad inhibidora de HTRA1 como un indicador. El método puede comprender: etapa 1 de incubación de la proteasa de HTRA1 y un sustrato en presencia o ausencia de una sustancia de prueba (o en presencia de un vehículo); etapa 2 de determinar la actividad de la proteasa de HTRA1 en presencia y ausencia de la sustancia de prueba; y/o etapa 3 de determinar la sustancia de prueba como un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico para la degeneración macular relacionada con la edad, o un candidato de la misma, cuando la actividad de la proteasa de HTRA1 en presencia de una sustancia de prueba es menor que la actividad de la proteasa de HTRA1 en ausencia de la sustancia de prueba. La sustancia de prueba puede ser peptídica o no peptídica. La sustancia de prueba peptídica no se limita a los mutantes SPINK2. Algunos ejemplos de la misma pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos, péptidos distintos de los mutantes SPINK2 que tienen un marco proteico no inmunoglobulínico, y análogos del sustrato HTRA1. Algunos ejemplos de la sustancia de prueba no peptídica pueden incluir, pero no se limitan a, compuestos sintéticos de bajo peso molecular y ácidos nucleicos. Una o dos o más etapas descritas anteriormente también pueden estar incluidas preferiblemente en un método para identificar una sustancia que tiene efecto protector de la retina o un candidato del mismo. La presente invención también se refiere a un método para identificar una sustancia que tiene efecto protector de la retina, o un candidato del mismo.

45 **8. El modelo de daño retiniano en conejo**

**[0161]** La presente invención también proporciona un modelo de conejos de daño retiniano producido por la carga con una dieta rica en grasas (de ahora en adelante, denominada «HFD») que contiene hidroquinona (de ahora en adelante, denominada «HQ»), un método para preparar el modelo, un método de prueba que utiliza el modelo, etc.

50 **[0162]** Este modelo puede emplear un conejo blanco arbitrario, tal como NZW o JW, de 2 años o más, independientemente del sexo.

5 **[0163]** La HFD puede contener una cantidad arbitraria de una grasa o un aceite arbitrario, por ejemplo, de 0,1 a 2% (p/v) de colesterol, de 1 a 10% (p/v) de aceite de coco, de 1 a 10% (p/v) de aceite de cacahuete, de 1 a 10% (p/v) de aceite de soja, de 10 a 20% (p/v) de sebo de vacuno, de 10 a 50% (p/v) de grasa de cerdo, o de 1 a 10% (p/v) de aceite de maíz, aunque el componente no se limita a los mismos siempre y cuando el componente sea adecuado para la preparación del modelo.

**[0164]** La cantidad de HQ contenida en HQ-HFD es de 0 a 4% (p/v), preferiblemente de 0,5 a 3,5% (p/v), más preferiblemente de 1,0 a 3,0% (p/v), aún más preferiblemente de 2,2 a 2,8% (p/v), y lo más preferible 2,4% (p/v).

**[0165]** El periodo de alimentación de HQ-HFD es de 3 a 6 meses, preferiblemente de 3,5 a 5 meses, y más preferiblemente, de 4 meses. Se debería evitar la continuación de la alimentación durante 8 meses o más.

10 **[0166]** Se prefiere el modelo de la presente invención porque el modelo es más similar a los humanos en el tamaño del globo ocular y en las funciones, en comparación con los modelos de ratones (Literatura distinta de la de patentes 18 y 19). Los modelos de conejos convencionales (Literatura distinta de la de patentes 20) requiere 8 meses para su preparación. En cambio, el modelo de la presente invención puede prepararse en un periodo de tiempo más corto y, además, es más preferido como un modelo de degeneración macular relacionada con la edad  
15 porque el modelo puede inducir la hipertrofia de las células RPE, algo que no está claro en los modelos convencionales.

20 **[0167]** Las células del epitelio pigmentario de la retina (células RPE) del modelo de la presente invención están hipertrofiadas en comparación con las células RPE de un conejo normal, lo que manifiesta la condición patológica temprana de la degeneración macular relacionada con la edad. Por otro lado, la hipertrofia de las células RPE no se pudo confirmar visualmente cuando se alimentó, durante 4 meses, a los conejos de 10 semanas de edad similares a los modelos de conejos convencionales (Literatura distinta de la de patentes 20).

25 **[0168]** Se pueden identificar un fármaco terapéutico y/o un fármaco profiláctico para la degeneración macular relacionada con la edad o un agente protector de la retina utilizando este modelo que manifiesta la condición patológica. El método de identificación puede comprender las etapas de: (i) medir la hipertrofia de las células del epitelio pigmentario de la retina en el conejo de este modelo con o sin la administración de una sustancia de prueba; y (ii) determinar si la sustancia de prueba es positiva cuando la hipertrofia de las células del epitelio pigmentario de la retina con la administración de la sustancia de prueba se suprime en comparación con la hipertrofia de las células del epitelio pigmentario de la retina sin la administración de las mismas. La medición en la etapa (i) es preferiblemente la medición de un área media de las células del epitelio pigmentario de la retina y/o el número de  
30 células del epitelio pigmentario de la retina hipertrofiadas.

### Ejemplos

**[0169]** De ahora en adelante, se describirán con más detalle algunos aspectos de la presente invención con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

35 **[0170]** En los siguientes ejemplos, a menos que se especifique lo contrario, las operaciones individuales de manipulación genética se han llevado a cabo de acuerdo con el método descrito en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.), publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1982 o 1989) u otros métodos descritos en los manuales experimentales utilizados por expertos en la técnica, o cuando están disponibles comercialmente, se han utilizado reagentes o kits, los ejemplos se han llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones incluidas en los productos disponibles comercialmente.

#### 40 **Ejemplo 1. Preparación de un péptido inhibidor de HTRA1**

##### **(1-1) Construcción de un vector de expresión del péptido inhibidor de HTRA1**

##### **(1-1-1) Construcción de un péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a (modificado)**

45 **[0171]** En primer lugar, se construyó un vector de expresión del péptido inhibidor de HTRA1 con un andamiaje SPINK2 como una columna vertebral. Un fragmento inhibidor se amplificó por PCR (94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 30 s) × 30 ciclos) con la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22) de cada péptido inhibidor y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) de SPINK2 como plantillas utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 1: 5'-AAAAGAATTCTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTAG-3'

Cebador 2: 5'-AAAAC TCGAGTTATGCGGCCGCAGACGCGCCGCACGGACC-3'

[0172] Cada fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se extrajo el fragmento de ADN deseado del gel y se preparó el ADN utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen N.V.). El fragmento de ADN preparado y pET 32a (modificado) se trataron cada uno con enzimas de restricción EcoRI (New England BioLabs Inc.) y XhoI (New England BioLabs Inc.) a 37°C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se extrajeron del gel y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen N.V.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C para una reacción de ligación utilizando ADN ligasa T4 (New England BioLabs Inc.). Se añadió la solución de ligación a *E. Coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, a continuación, se sometió a un tratamiento térmico a 42°C durante 45 segundos, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se inoculó en una placa 2YT que contenía 0,1 mg/ml de ampicilina, después se realizó un cultivo estático durante toda la noche a 37°C para transformar la *E. coli*. Al día siguiente, la *E. coli* transformada se inoculó en un medio Terrific Broth (Invitrogen Corp.) que contiene 0,1 mg/ml de ampicilina y se cultivó durante toda la noche a 37°C. A continuación, se recuperó el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep 96 Turbo Miniprep (Qiagen N.V.) (de ahora en adelante, este tratamiento se denomina «tratamiento de miniprep») y se somete a un análisis de secuencia para construir «un péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a (modificado)».

**(1-1-2) Construcción del péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a Kex2**

[0173] Igualmente, un fragmento inhibidor se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 30 s) × 30 ciclos) con la secuencia (Listado de Secuencias) de cada inhibidor y la secuencia de nucleótidos de SPINK2 como plantillas utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 3: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

Cebador 4: 5'-AAAAC TCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAATTTTA-3'

[0174] Cada fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se extrajo el fragmento de ADN deseado del gel y se preparó el ADN utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen N.V.). El fragmento de ADN preparado y pET 32a (Novagen) se trataron cada uno con enzimas de restricción BamHI (New England BioLabs Inc.) y XhoI (New England BioLabs Inc.) a 37°C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se extrajeron del gel y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen N.V.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C para una reacción de ligación utilizando ADN ligasa T4 (New England BioLabs Inc.). La solución de ligación de añadió a *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, a continuación, se sometió a un tratamiento térmico a 42°C durante 45 segundos, además, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se inoculó en una placa 2YT que contenía 0,1 mg/ml de ampicilina, después se realizó un cultivo estático durante toda la noche a 37°C para transformar la *E. coli*. La *E. coli* transformada se cultivó, y la miniprep y el análisis de secuencia se llevaron a cabo posteriormente para construir el «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a Kex2». La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en (1-1-1).

**(1-2) Expresión y purificación del péptido inhibidor de HTRA1**

[0175] *E. coli* Origami B (DE3) (Novagen) se transformó con el vector del péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a (modificado) construido en (1-1-1) y cultivado a 37°C que utiliza un medio 2YT que contiene 0,1 mg/ml ampicilina. A continuación IPTG (concentración final: 1mM) se añadió a la misma, y la *E. coli* se cultivó durante la noche a 16°C. Al día siguiente, después de la cosecha por centrifugación (3,000 g, 20 min, 4°C), se preparó un lisado utilizando BugBuster Master Mix (Novagen), y se purificó una proteína de fusión His-tag de interés utilizando una resina de afinidad metálica TALON (Clontech Laboratories, Inc.). Después, una etiqueta de tiorredoxina y la proteína deseada se escindieron utilizando un kit de captura de escindido de trombina (Novagen) y se purificaron utilizando TALON. El resultante se sometió a una cromatografía de filtración de gel (Superdex 75 10/300 GL) o cromatografía en fase inversa (YMC-Pack ODS-AM) para preparar un péptido inhibidor de HTRA1. El péptido obtenido se conjugó en su N-terminal con una fracción que consiste en S-tag y un enlazador (SEQ ID NO: 31: Figura 43) y en su C-terminal con un hexámero C-terminal (SEQ ID NO: 32: Figura 44) en vez de Gly-Gly.

[0176] Igualmente, *E. coli* Origami B (DE3) (Novagen) se transformó con el vector del péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a Kex2 construido en (1-1-2) y cultivado a 37°C que utiliza un medio 2YT que contiene 0,1 mg/ml ampicilina. A continuación IPTG (concentración final: 1mM) se añadió a la misma, y la *E. coli* se cultivó durante la noche a 16°C. Al día siguiente, después de la cosecha por centrifugación (3,000 g, 20 min, 4°C), se preparó un lisado utilizando BugBuster Master Mix (Novagen), y se purificó una proteína de fusión His-tag de interés utilizando una resina de afinidad metálica TALON (Clontech Laboratories, Inc.). Después, una etiqueta de tiorredoxina y la proteína deseada se escindieron utilizando Kex2 (*Saccharomyces cerevisiae*: Accession CAA96143) y se purificaron mediante TALON. El resultante se sometió a cromatografía de filtración de gel (Superdex 75 10/300 GL)

o cromatografía en fase inversa (YMC-Pack ODS-AM) para preparar un péptido inhibidor de HTRA1 (sin N-terminal ni C-terminal conjugados con una etiqueta, un enlazador o similar).

## Ejemplo 2. Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1

- [0177] La similitud de secuencia entre HTRA1 humano, de ratón, de rata y de mono se muestra en la Figura 1. Una secuencia primaria que constituye un dominio de proteasa de HTRA1 (de 204Gly a 364Leu), que es un dominio enzimáticamente activo, es completamente idéntica entre la humana y la de monos. Las secuencias del dominio de la proteasa HTRA1 humana y de ratón o rata difieren en 1 residuo. Sin embargo, este residuo está colocado estructuralmente en un lado opuesto al centro activo de la enzima y, por lo tanto, se presume que no tiene ninguna influencia en el centro activo de la enzima (Figura 1). Por ello el dominio de proteasa de HTRA1 tiene efectivamente la misma secuencia, independientemente de la especie (humano/ratón/rata/mono). Por consiguiente, no se hace ninguna mención particular acerca de las especies.

### (2-1) Preparación del dominio de proteasa de HTRA1 HTRA1 (cat)

#### (2-1-1) Construcción de pET 21B\_HTRA1 (cat)

- [0178] El dominio de proteasa (de 158Gly a 373Lys), excepto para el dominio N-terminal y el dominio PDZ, de HTRA1 humana (Q92743) se utilizó como HTRA1 (cat) para construir un vector de expresión de HTRA1 (cat). El fragmento de ADN deseado se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 45 s) × 30 ciclos) con un plásmido insertado en HTRA1 (GeneCopeia, Inc.; GC-M0558) como una plantilla utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 5: 5'-AAACATATGGGGCAGGAAGATCCCAACAGTTTGC-3'

- 20 Cebador 6: 5'-AAACTCGAGTTTGGCCTGTCGGTCATGGGACTC-3'

- [0179] El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se extrajo el fragmento de ADN deseado del gel y se preparó el ADN utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen N.V.). El fragmento de ADN preparado y pET 32a (Novagen) se trataron cada uno con enzimas de restricción NdeI (New England BioLabs Inc.) y XhoI (New England BioLabs Inc.) a 37°C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se extrajeron del gel y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen N.V.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C para una reacción de ligación utilizando ADN ligasa T4 (New England BioLabs Inc.). La solución de ligación de añadió a *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, a continuación, se sometió a un tratamiento térmico a 42°C durante 45 segundos, además, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se inoculó en una placa 2YT que contenía 0,1 mg/ml de ampicilina, después se realizó un cultivo estático durante toda la noche a 37°C para transformar la *E. coli*. La *E. coli* transformada se cultivó, y la miniprep y el análisis de secuencia se llevaron a cabo para construir «pET 21b\_HTRA1 (cat)». La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en (1-1-1).

#### (2-1-2) Preparación de HTRA1 (cat)

- [0180] *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) se transformó con pET 21b\_HTRA1 (cat) construido y se cultivó a 37°C utilizando un medio 2YT que contiene 0,1 mg/ml ampicilina. A continuación IPTG (concentración final: 1mM) se añadió a la misma, y se cultivó *E. coli* durante la noche a 28°C. Después de la cosecha, se preparó un lisado suspendiéndolo en un tampón fosfato (50 mM de fosfato sódico y 300 mM de NaCl) que contenía 1 mg/ml de lisozima y ultrasonidos, y se recuperó la proteína de fusión His-tag deseada utilizando TALON (Clontech Laboratories, Inc.). El resultante se sometió a una cromatografía de filtración de gel (Superdex 200 10/300 GL) para purificar HTRA1 (cat).

### (2-2) Preparación de HTRA1 de longitud completa (HTRA1 (completa))

#### (2-2-1) Construcción de pcADN3.1\_HTRA1 (completa)\_His

- [0181] El fragmento de ADN deseado se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 90 s) × 30 ciclos) con un con ADN HTRA1 humano sintetizado (Q92743) (GeneArt) como una plantilla utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 7: 5'-AAAAGAATTCCGCCACCATGCAGATTCCTAGAGCCG-3'

Cebador 8: 5'-AAACTCGAGTCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGCCGG-3'



(completa)\_FLAG\_His» construido en el Ejemplo (2-2-2) como una plantilla utilizando los siguientes cebadores y kits de mutagénesis de sitio dirigido QuickChange II (Agilent Technologies Japan, Ltd.).

Cebador 21: 5'-CCATCATCAACTACGGCAACGCGGGCGGACCCCTCGTGAACC-3' (SEQ ID NO: 55: Figura 76)

Cebador 22: 5'-GGTTCACGAGGGGTCCGCCCGCGTTGCCGTAGTTGATGATGG-3' (SEQ ID NO: 56: Figura 77)

- 5 **[0188]** Después de la reacción PCR, *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.) se transformó con la solución de reacción PCR tratada con DpnI de acuerdo con el protocolo adjunto en el kit. La *E. coli* transformada se cultivó, y la miniprep y el análisis de secuencia se llevaron a cabo para construir "pcADN3.3\_HTRA1(S328A)\_FLAG\_His". La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en (1-1-1).

**(2-3-2) Preparación de HTRA1 (S328A)**

- 10 **[0189]** Se expresó HTRA1 (S328A) utilizando FreeStyle 293F de acuerdo con el método descrito en (2-2-3), y HTRA1 (S328A) se preparó mediante purificación por afinidad.

**Ejemplo 3. Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1**

**(3- 1) Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1 utilizando sustrato peptídico**

- 15 **[0190]** Un sustrato peptídico H2-Opt (Mca-IRRVSYFK(Dnp)K) (Peptide Institute, Inc.: SEQ ID NO: 54, Figura 8) se disolvió a 10 mM en DMSO, diluyó con un tampón de ensayo (50 mM de borato y 150 mM NaCl, pH 8,5), y se utilizó en una concentración final de 10 µM. La HTRA1 (HTRA1 (cat) o HTRA1 (completa)) y cada péptido inhibidor de HTRA1 diluidos con un tampón de ensayo se mezclaron a 25 µL cada uno y reaccionaron a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50 µL del sustrato diluido con un tampón de ensayo a la misma. Se midió una señal fluorescente (excitación a 328 nm/emisión a 393 nm) utilizando Enspire (PerkinElmer, Inc.). La concentración final de HTRA1 fue de 100 nM, y la concentración final del péptido inhibidor de HTRA1 fue de 1,875 a 1,000 nM. La placa negra PROTEOSAVE(R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se utilizó en la reacción y en la medición.

- 25 **[0191]** Se calculó la velocidad de descomposición del sustrato peptídico del péptido inhibidor de HTRA1 en cada concentración. Cuando la velocidad de descomposición en una concentración inhibidora de 0 nM se definió como 100%, se evaluó la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) y HTRA1 (completa) de cada péptido inhibidor de HTRA1 (Figuras 2 y 3). Como resultado de calcular una concentración inhibidora de 50% (IC50) utilizando GraphPad Prism (versión 5.0; GraphPad Software Inc.), se descubrió que todos los péptidos inhibidores de HTRA1 inhibían la actividad enzimática de HTRA1 (cat) y HTRA1 (completa) a baja concentración (Figuras 2A a 2C y Figura 3). Por control, SPINK2 de tipo silvestre (peso) no mostró actividad inhibidora de HTRA1 (Figura 2D).

**Actividad inhibidora de HTRA1 del péptido inhibidor de HTRA1**

**[0192]**

[Tabla 1]

ID	IC50 (nM) para HTRA1 (cat)	IC50 (nM) para HTRA1 (completa)
H218	72	55
H223	41	66
H228	71	38
H308	37	15
H321	48	29
H322	50	17
H308AT	49	31

ID	IC50 (nM) para HTRA1 (cat)	IC50 (nM) para HTRA1 (completa)
H321AT	46	18
H322AT	45	25
M7	43	24

**(3- 2) Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1 utilizando un sustrato de proteína**

- 5 **[0193]** La actividad inhibidora de HTRA1 de un péptido inhibidor de HTRA1 se evaluó con vitronectina humana como un sustrato de proteína. HTRA1 (cat) y cada péptido inhibidor de HTRA1 diluidos con un tampón de ensayo (50 mM Tris y 150 mM NaCl, pH 8,0) se mezclaron y reaccionaron a 37°C durante 1 hora. A continuación, la vitronectina humana (BD Biosciences; 354238) diluida con un tampón de ensayo se añadió a la misma y reaccionó a 37°C durante 2 horas. Se añadió un tampón de muestra SDS a la misma, y la reacción enzimática se terminó mediante tratamiento a 99°C durante 5 minutos. Después, se evaluó la descomposición de la vitronectina humana por SDS-PAGE y análisis de *Western blot*. La concentración final del péptido inhibidor de HTRA1 era de 0 a 25 µM, la concentración final de HTRA1 (cat) era de 1 µM, y la concentración final de la vitronectina humana era de 1 µM. Para el análisis de *Western blot*, se utilizó el anticuerpo de vitronectina humana (R&D Systems, Inc.; MAB2349) como un anticuerpo primario, y como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpos de oveja completos unidos a HRP y anti-ratón IgG (GE Healthcare; NA931).
- 10
- 15 **[0194]** Como en (3-1), los péptidos inhibidores de HTRA1 exhibieron fuertemente la inhibición de HTRA1 (cat) cuando se utilizó vitronectina humana como un sustrato (Figura 4).

**(3-3) Evaluación de péptido inhibidor de HTRA1 para especificidad**

- 20 **[0195]** Se evaluó la especificidad para otras proteasas utilizando la escisión de un péptido sustrato como indicador. De la misma forma que el método descrito en (3-1), cada proteasa y cada muestra (concentración final: 1 µM) diluidas con un tampón de ensayo se mezclaron a 25 µM cada una y reaccionaron a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50 µL de cada sustrato diluido con un tampón de ensayo a la misma. Se midió una señal fluorescente (excitación a 380 nm/emisión a 460 nm) utilizando Enspire (PerkinElmer, Inc.). Se utilizó el mismo tampón de ensayo (50 mM de borato y 150 mM NaCl, pH 8,5) que en el Ejemplo 2 en la evaluación de la actividad de HTRA2. Se utilizó un tampón de ensayo (50 mM de Tris y 150 mM NaCl, pH 8,0) en la evaluación de la actividad de proteasa distinta de la actividad de HTRA2. La placa negra PROTEOSAVE(R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se utilizó en la reacción y en la medición. Las combinaciones de la proteasa y del sustrato utilizados en la evaluación de la especificidad fueron las siguientes.
- 25

30 Evaluación de la actividad inhibidora de la tripsina bovina; 5 nM (concentración final) de tripsina (Pierce; 20233) y 100 µM (concentración final) del sustrato peptídico Sustrato peptídico fluorogénico Boc-VPR-AMC (R&D Systems, Inc.; ES011), Evaluación de la actividad inhibidora de la α-quimotripsina bovina; 10 nM (concentración final) de quimotripsina (Worthington Biochemical Corporation; LS001434) y 100 µM (concentración final) del sustrato peptídico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA ((Peptide Institute, Inc.; 3120-v)

35 Evaluación de la actividad inhibidora de la triptasa humana; 1nM (concentración final) de triptasa (Sigma-Aldrich Co. LLC; T7063) y 100 µM (concentración final) de sustrato peptídico Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3107-v) Evaluación de la actividad inhibidora de la quimasa humana; 100 nM (concentración final) de quimasa (Sigma-Aldrich Co. LLC; C8118) y 100 µM (concentración final) de sustrato peptídico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3120-v) Evaluación de la actividad inhibidora de la plasmina humana; 50 nM (concentración final) de plasmina (Sigma-Aldrich Co. LLC; P1867) y 100 µM (concentración final) de sustrato peptídico Boc-Val-Leu-Lys-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3104-v) Evaluación de la actividad inhibidora de la trombina humana; 1 nM (concentración final) de trombina (Sigma-Aldrich Co. LLC; T6884) y 100 µM (concentración final) de sustrato peptídico Sustrato peptídico fluorogénico Boc-VPR-AMC (R&D Systems, Inc.; ES011)

40

45 Evaluación de la actividad inhibidora de matriptasa humana; 1 nM (concentración final) de matriptasa (R&D Systems, Inc.; E3946-SE) y 100 µM (concentración final) del sustrato peptídico Sustrato peptídico fluorogénico Boc-QAR-AMC (R&D Systems, Inc.; ES014)

5 Evaluación de la actividad inhibidora de la proteína C humana; 100 nM (concentración final) de proteína C (Sigma-Aldrich Co. LLC; P2200) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3112-v) Evaluación de la actividad inhibidora de tPA humana; 10 nM (concentración final) de tPA (Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v)

Evaluación de la actividad inhibidora de uPA humana; 10 nM (concentración final) de uPA (Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v)

10 Evaluación de la actividad inhibidora de calicreína plasmática humana; 0,125  $\mu$ g/ml (concentración final) de calicreína plasmática (Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Z-Phe-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3095-v)

Evaluación de la actividad inhibidora de HTRA2 humana; 200 nM (concentración final) de HTRA2 (R&D Systems, Inc.; 1458-HT) y 50  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico H2-Opt (Peptide Institute, Inc.).

15 **[0196]** Se evaluó la reactividad cruzada con proteasas diferente de HTRA1 utilizando la descomposición del sustrato peptídico como un indicador de la misma manera que en (3-2). Cada péptido inhibidor de HTRA1 no suprimió la actividad de ninguna de las proteasas en una concentración inhibidora final de 1 micro M, que indica que el péptido inhibidor de HTRA1 tiene un efecto inhibidor específico de HTRA1 (Figura 5).

#### **Ejemplo 4. Análisis del péptido inhibidor de HTRA1 utilizando la estructura cristalina de rayos X**

20 **(4-1) Preparación del compuesto de péptido inhibidor de HTRA1/HTRA1 (cat)**

**[0197]** El péptido inhibidor de HTRA1 y HTRA1 (cat) que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 se prepararon cada uno de acuerdo con los métodos descritos en (1-2) y (2-1). Ambos se mezclaron bajo condiciones de 20 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl, pH 7,6. A continuación, se aisló y se purificó un compuesto por cromatografía de filtración de gel (Superdex 200 10/300 GL).

25 **(4-2) Cristalografía de rayos X**

30 **[0198]** La solución del compuesto preparada en (4-1) se concentró en 18 mg/ml y, después, se mezcló con una solución de reserva (1,0 M LiCl, 7,5% PEG6000, y 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)) en una ratio de 1:1 y la mezcla se cristalizó por el método de difusión de vapor. Los monocristales cúbicos obtenidos se sumergieron en una solución de reserva que contenía un 20% de etilenglicol y, a continuación, se congelaron en nitrógeno líquido. Los cristales congelados se expusieron a rayos X bajo flujo de aire criogénico para obtener una imagen de difracción (fábrica de fotones BL5A: Organización de Investigación de Aceleradores de Alta Energía). Los datos de escala con una resolución máxima de 2,6 Angstrom se obtuvieron mediante análisis con HKL2000. La fase se determinó por el método de sustitución molecular utilizando serina proteasa HTRA1 (PDB ID: 3NZI) como una plantilla. Después del refinamiento de la estructura, se determinó un compuesto cristalino de HTRA1 (cat) y el péptido en una  
35 resolución de 2,6 Angstrom. Cada una de las moléculas de HTRA1 y SPINK2 estaba contenida en la célula unitaria. En lo que respecta a la molécula de SPINK2, un modelo molecular parcial que contiene un sitio de interacción con HTRA1 (cat) se construyó a partir de la información de la secuencia y la densidad electrónica observada. Se confirmó que el péptido inhibidor de HTRA1 se unía a una región que contenía el centro activo de la enzima HTRA1 (Figuras 6 y 7).

40 **[0199]** Ejemplo 5. El efecto protector de la retina provocado por la inhibición de HTRA1 en un modelo de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz

#### **(5-1) Preparación de un modelo de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz**

45 **[0200]** Los modelos de ratas de daño retiniano inducidos por exposición a la luz son modelos que inducen la muerte celular de las células fotorreceptoras de la retina por exposición a la luz y se utilizan universalmente como animales modelo de la degeneración de la retina (Daniel T. Organisciak et al., (1996) Invest Ophthalmol Vis Sci. Vol. 37 (No. 11): pág. 2243-2257). Se instiló por vía ocular una solución oftálmica de tropicamida al 0,5% (p/v) y clorhidrato de fenilefrina al 0,5% en ratas adaptadas a la oscuridad durante 72 horas. Después, se expusieron las ratas a luz blanca de 5500 Lux durante 3 horas. Las ratas así expuestas se adaptaron de nuevo a la oscuridad durante unas 24 horas y, a continuación, se criaron durante 2 días en condiciones de luz-oscuridad de crianza ordinaria. Después  
50 de la eutanasia, se extrajeron los globos oculares y se fijaron sumergiéndolos en un fijador de formaldehído al 3,7% (p/v) y metanol de 0,5 a 1% (p/v) y ácido pícrico al 0,2% (p/v) durante 24 horas o más. Tras la incrustación

en parafina, se prepararon cortes finos. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina, y se determinó un recuento de núcleos en una capa nuclear exterior de una sección transversal de la retina para evaluar el daño retiniano. Se descubrió que los modelos de rata de daño retiniano inducidos por exposición a la luz tienen una disminución marcada en el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior debido a la exposición a la luz.

5 **(5-2) Confirmación de expresión de HTRA1 extracelular en el momento de daño retiniano**

[0201] Para examinar la implicación de HTRA1 en modelos de ratas de daño retiniano inducidos por exposición a la luz, el humor vítreo se recogió de las ratas modelo preparado en (5-1) y se evaluó para un nivel de expresión de HTRA1 por análisis de *Western blot*. El humor vítreo se sometió a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La HTRA1 de ratas se detectó utilizando como un anticuerpo primario un anticuerpo HTRA1/PRSS11 humano (R&D Systems, Inc.; AF2916) y como un anticuerpo secundario, un anticuerpo IgG de oveja conjugado con peroxidasa de rábano (R&D Systems, Inc.; HAF016). La cantidad aumentada de HTRA1 en el humor vítreo se confirmó en el grupo de exposición a la luz en comparación con un grupo sin exposición a la luz, lo que sugiere que, en este modelo, HTRA1 está implicada en el proceso de daño retiniano causado por la exposición a la luz (Figura 9).

15 **(5-3) Efecto protector de la retina del péptido inhibidor de HTRA1 en un modelo de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz**

[0202] Inmediatamente antes de la exposición a la luz de las ratas, se administró 5 µL del péptido inhibidor de HTRA1 H308 que tiene una concentración de 0,04 mg/mL o 0,2 mg/mL por vía intravítrea bajo anestesia. N = 4 para un grupo de administración de salina normal y n = 5 para los otros grupos. La exposición a la luz disminuyó el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior en una sección transversal de la retina en el grupo de administración de salina normal, mientras que se confirmó el efecto de supresión de la disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior en el grupo de administración del péptido inhibidor de HTRA1 (Figura 10). Estos resultados demostraron que el péptido inhibidor de HTRA1 muestra efectos medicinales en el daño tisular causado por HTRA1.

**Ejemplo 6. Evaluación del derivado del péptido inhibidor de HTRA1**

25 **(6-1) Construcción del péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a H308\_S16A\_Kex2**

[0203] El derivado S16A que tiene una secuencia de aminoácidos en la que 16Ser en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SQ ID NO: 9 (Figura 21) se sustituyó con Ala, se preparó con el péptido inhibidor de HTRA1 H308 como una plantilla. El fragmento C se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 15 s) × 30 ciclos) utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

30 Cebador 12: 5'-CCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGT-3'

Cebador 13: 5'-GCCATACCAGCATGGTCCGCACAATTCGGGGTACGATATTTGC-3'

[0204] Después, el fragmento B se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 20 s) × 30 ciclos) con el péptido inhibidor de HTRA1 H308 como una plantilla utilizando los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.). Cebador 14: 5'-GCGGACCATGCTGGTATGGCATGTGTTGCTCTGTATGAAC-3'

35 cebador 15: 5'-AAAACCTCGAGTTAGCCGCGCACGGACCATTGCGAATAA-3'

[0205] El fragmento deseado de ADN se amplificó por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 20 s) × 30 ciclos) utilizando los fragmentos C y D, los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

Cebador 16: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

Cebador 15

40 [0206] El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se extrajo el fragmento de ADN deseado del gel y se preparó el ADN utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen N.V.). El fragmento de ADN preparado y pET 32a (Novagen) se trataron cada uno con enzimas de restricción BamHI (New England BioLabs Inc.) y XhoI (New England BioLabs Inc.) a 37°C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se extrajeron del gel y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen N.V.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C para una reacción de ligación utilizando ADN ligasa T4 (New England BioLabs Inc.). La solución de ligación de añadió a *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, a continuación, se sometió a un tratamiento térmico a 42°C durante 45 segundos, además, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se inoculó en una placa 2YT que contenía 0,1 mg/ml de ampicilina, después se realizó un cultivo estático durante toda la noche a 37°C para transformar la *E. coli*. La *E. coli* transformada se cultivó, y la

miniprep y el análisis de secuencia se llevaron a cabo posteriormente para construir «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a H308\_S16A\_Kex2». La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en (1-1-1).

**(6-2) Preparación del vector de expresión derivado del péptido inhibidor de HTRA1\_N-terminal**

5 **[0207]** Para preparar cuatro derivados de la secuencia N-Terminal (denominada D1G, D1S, D1E y D1SLI, respectivamente) del péptido inhibidor de HTRA1 que tiene una secuencia de aminoácidos en la que 1Asp en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 (Figura 21) se sustituyó por Gly, Ser, Glu o Ser-Leu-Ile, los vectores de expresión se construyeron mediante el mismo enfoque que en (6-1). Cuatro fragmentos de interés se amplificaron, cada uno, por PCR ((94°C durante 15 s, 60°C durante 30 s y 68°C durante 20 s) × 30 ciclos) utilizando los fragmentos C y D, los siguientes cebadores y KOD-plus-(Toyobo Co., Ltd.).

10 Cebadores de preparación de D1G

Cebador 17: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

Cebador 15

Cebadores de preparación de D1S

Cebador 18: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

15 Cebador 15

Cebadores de preparación de D1E

Cebador 19: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGAACCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

Cebador 15

Cebadores de preparación de D1SLI

20 Cebador 20: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCTGATTCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

Cebador 15

25 **[0208]** Cada uno de los fragmentos amplificados se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se extrajo el fragmento de ADN deseado del gel y se preparó el ADN utilizando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen N.V.). El fragmento de ADN preparado y pET 32a (Novagen) se trataron cada uno con enzimas de restricción BamHI (New England BioLabs Inc.) y XhoI (New England BioLabs Inc.) a 37°C durante 1 hora o más. Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN deseados se extrajeron del gel y se purificaron utilizando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen N.V.). Los fragmentos purificados se hicieron reaccionar durante la noche a 16 °C para una reacción de ligación utilizando ADN ligasa T4 (New England BioLabs Inc.). La solución de ligación se añadió a *E. coli* JM109 (Toyobo Co., Ltd.), y la mezcla se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, a continuación, se sometió a un tratamiento térmico a 42°C durante 45 segundos, además, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se inoculó en una placa 2YT que contenía 0,1 mg/ml de ampicilina, después se realizó un cultivo estático durante toda la noche a 37°C para transformar la *E. coli*. La *E. coli* transformada se cultivó, y la miniprep y el análisis de secuencia se llevaron a cabo para construir «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a\_H308\_D1G\_S16A\_Kex2», «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a H308\_D1S\_S16A\_Kex2», «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a H308\_D1E\_S16A\_Kex2» y «péptido inhibidor de HTRA1 pET 32a H308\_D1SLI\_S16A\_Kex2». La operación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en (1-1-1).

**(6-3) Preparación del derivado del péptido inhibidor de HTRA1**

40 **[0209]** *E. coli* Origami B (DE3) (Novagen) se transformó con cada uno de los cinco vectores construidos en (6- 1) y (6-2) y se cultivó a 37°C utilizando un medio 2YT que contiene 0,1 mg/ml de ampicilina. A continuación IPTG (concentración final: 1mM) se añadió a la misma, y la *E. coli* se cultivó durante la noche a 16°C. Al día siguiente, después de la cosecha por centrifugación (3,000 g, 20 min, 4°C), se preparó un lisado utilizando BugBuster Master Mix (Novagen), y se purificó una proteína de fusión His-tag de interés utilizando resina de afinidad metálica TALON (Clontech Laboratories, Inc.). Después, una etiqueta de tiorredoxina y la proteína deseada se escindieron utilizando Kex2 (mencionado anteriormente) y se purificaron utilizando TALON. El resultante se sometió a una cromatografía de filtración de gel (Superdex 75 10/300 GL) o cromatografía en fase inversa (YMC-Pack ODS-AM) para preparar cinco derivados de péptidos inhibidores de HTRA1. Las secuencias de aminoácidos de los derivados se muestran en SEQ ID NO: de 23 a 27 (Figuras de la 35 a la 39).

**(6-4) Evaluación del derivado del péptido inhibidor de HTRA1**

[0210] Como resultado de medir la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) de acuerdo con un método descrito en (3-1), todos los derivados tenían una actividad inhibidora equivalente a la de H308 (Figura 11).

**Ejemplo 7. Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad de unión contra HTRA1 (cat)**

5 [0211] La actividad de unión se evaluó mediante un método de inmunoprecipitación utilizando tres péptidos inhibidores de HTRA1 (H308, H321AT y H322AT) preparados en el Ejemplo (1-2) y HTRA1 (cat) preparado en (2-1). 2,5 µg de cada péptido inhibidor de HTRA1 y 10 µg de HTRA1 (cat) se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, se añadieron 10 µL de la resina de afinidad metálica TALON (Clontech Laboratories, Inc.) a los mismos. Después de una nueva reacción de 30 minutos, la resina se recuperó como fracción de inmunoprecipitación (IP) y se sometió a SDS-PAGE para evaluar la actividad de unión. Se utilizó PBS como un tampón en la reacción.

15 [0212] Cuando se hizo reaccionar cada uno de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 o HTRA1 (cat) con TALON, en un carril de entrada sólo se detectó la banda de HTRA1 (cat) fusionada con His-tag. Por otro lado, la banda de cada péptido inhibidor y la enzima sólo se detectó en un carril de inmunoprecipitación (IP) en el que el péptido inhibidor reaccionó con HTRA1 (cat). En consecuencia, se confirmó que cada uno de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 se unía a HTRA1 (cat).

**Ejemplo 8. Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1**

**(8- 1) Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1 utilizando sustrato peptídico**

20 [0213] Se evaluaron los tres péptidos inhibidores de HTRA1 (H308\_D1G\_S16A, H321AT\_D1G\_S16A y H322AT\_D1G\_S16A) construidos en el Ejemplo 6 por su actividad inhibidora de HTRA1 (cat) o de HTRA1 (completa) utilizando un sustrato peptídico H2-Opt (n = 3). Un sustrato peptídico H2-Opt (Mca-IRRVSYSFK(Dnp)K) (Peptide Institute, Inc.: SEQ ID NO: 54, Figura 8) se disolvió a 10 mM en DMSO, diluyó con un tampón de ensayo (50 mM de Tris, y 150 mM NaCl y 0,25% CHAPS, pH 8,0), y se utilizó en una concentración final de 10 µM. La HTRA1 (HTRA1 (cat) o HTRA1 (completa); Ejemplo 2) y cada péptido inhibidor de HTRA1 diluidos con un tampón de ensayo se mezclaron a 25 µL cada uno y reaccionaron a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50 µL del sustrato diluido con un tampón de ensayo a la misma. Se midió una señal fluorescente (excitación a 328 nm/emisión a 393 nm) utilizando Enspire (PerkinElmer, Inc.). La concentración final de HTRA1 fue de 100 nM, y la concentración final del péptido inhibidor de HTRA1 fue de 1,875 a 1,000 nM. La placa negra PROTEOSAVE(R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se utilizó en la reacción y en la medición.

[0214] Se calculó la velocidad de descomposición del sustrato peptídico del péptido inhibidor de HTRA1 en cada concentración. Cuando la velocidad de descomposición en una concentración inhibidora de 0 nM se definió como 100%, se evaluó la actividad inhibidora de HTRA1 (cat) y HTRA1 (completa) de cada péptido inhibidor de HTRA1.

35 [0215] Como resultado de calcular una concentración inhibidora de 50% (IC50) utilizando GraphPad Prism (versión 5.0; GraphPad Software Inc.), se descubrió que todos los péptidos inhibidores de HTRA1 inhibían la actividad enzimática de HTRA1 (cat) y HTRA1 (completa) a una baja concentración (Figura 66).

**Actividad inhibidora de HTRA1 del péptido inhibidor de HTRA1**

[0216]

[Tabla 2]

	IC50 (nM) para HTRA1 (cat)	IC50 (nM) para HTRA1 (completa)
H308_D1G_S16A	7,9+1,3	9,1+1,4
H321AT_D1G_S16A	9,0+0,6	12,0±1,9
H322AT_D1G_S16A	12,9+0,2	12,2+2,2

40

**(8- 2) Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad inhibidora de HTRA1 utilizando un sustrato de proteína**

[0217] La actividad inhibidora de HTRA1 de un péptido inhibidor de HTRA1 se evaluó con vitronectina humana como un sustrato de proteína. La operación siguió el Ejemplo (3-2).

- 5 [0218] Como en (8-1), los péptidos inhibidores de HTRA1 exhibieron fuertemente la inhibición de HTRA1 (cat) cuando se utilizó vitronectina humana como un sustrato (Figura 67).

**(8-3) Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para especificidad**

- 10 [0219] Se evaluó la especificidad para otras proteasas utilizando la escisión de un péptido sustrato como un indicador. La operación para la bovina tripsina, bovina  $\alpha$ -quimotripsina, proteína C, tripsina, quimasa, trombina, plasmina, tPA, calicreína plasmática, matriptasa, uPA y HTRA2 siguieron el método descrito en el Ejemplo (3-3) (n = 3). Los procedimientos de medir la actividad inhibidora contra otras proteasas y combinaciones de la proteasa y del sustrato son las siguientes.

- 15 [0220] La placa negra PROTEOSAVE(R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) se utilizó en la reacción y en la medición. Cada proteasa y cada muestra (concentración final: 1  $\mu$ M) diluidas con un tampón de ensayo se mezclaron a 25  $\mu$ M cada una y reaccionaron a 37°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ L de cada sustrato diluido con un tampón de ensayo a la misma. Se midió una señal fluorescente utilizando Enspire (PerkinElmer, Inc.).

- 20 [0221] Evaluación de la actividad inhibidora de tripsina humana; 1 nM (concentración final) de tripsina (Sigma-Aldrich Co. LLC; T6424) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Sustrato peptídico fluorogénico Boc-VPR-AMC (R&D Systems, Inc.; ES011), señal fluorescente: excitación a 380 nm/emisión a 460 nm.

[0222] Evaluación de la actividad inhibidora de quimotripsina humana; 10 nM (concentración final) de quimotripsina (Sigma-Aldrich Co. LLC; C8946) y 10  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3120-v), señal fluorescente: excitación a 380 nm/emisión a 460 nm.

- 25 [0223] Evaluación de la actividad inhibidora del factor Xlla humano; 100 nM (concentración final) de factor Alpha-Xlla (Enzyme Research Laboratories Inc.) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v), señal fluorescente: excitación a 380 nm/emisión a 460 nm.

[0224] Evaluación de la actividad inhibidora de MMP-2 humana; 1 nM (concentración final) de tripsina (Calbiochem; PF023) y 100  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico MOCAx-KPLGL-A2pr(Dnp)-AR (Peptide Institute, Inc.; 3226-v), señal fluorescente: excitación a 328 nm/emisión a 393 nm.

- 30 [0225] Evaluación de la actividad inhibidora de TPP1 humana; 0,5  $\mu$ g/mL (concentración final) de TPP1 (Calbiochem; 2237-SE) y 200  $\mu$ M (concentración final) del sustrato peptídico AAF-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3201-v), señal fluorescente: excitación a 380 nm/emisión a 460 nm.

- 35 [0226] Se evaluó la reactividad cruzada con proteasas distintas de HTRA1 utilizando la descomposición del sustrato peptídico como un indicador. Cada péptido inhibidor de HTRA1 no suprimió la actividad de proteasa de ninguna las proteasas en una concentración final de 1  $\mu$ M, lo que indica que el péptido inhibidor de HTRA1 tiene un efecto inhibidor específico de HTRA1 (Figura 68).

**Ejemplo 9. Evaluación del péptido inhibidor de HTRA1 para la actividad de unión contra HTRA1 (cat)**

- 40 [0227] La actividad de unión se evaluó mediante el método de inmunoprecipitación de acuerdo con la operación del Ejemplo 7 utilizando tres péptidos inhibidores de HTRA1 preparados en el Ejemplo 6 y HTRA1 (cat) preparado en (2-1).

- 45 [0228] Cuando se hizo reaccionar cada uno de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 o HTRA1 (cat) con TALON, en un sólo se detectó la banda de HTRA1 (cat) fusionada con His-tag en un carril de entrada. Por otro lado, la banda de cada péptido inhibidor y la enzima sólo se detectó en un carril de inmunoprecipitación (IP) en el que el péptido inhibidor reaccionó con HTRA1 (cat). Por consiguiente, se confirmó que cada uno de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 se unía a HTRA1 (cat) (Figura 69).

[0229] Ejemplo 10. El efecto protector de la retina provocado por la inhibición de HTRA1 en un modelo de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz (parte 2).

[0230] Los efectos protectores de la retina de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 preparados en el Ejemplo 6 se evaluaron utilizando los modelos de ratas de daño retiniano inducido por exposición a la luz, construido en el Ejemplo (5-1). La operación siguió el Ejemplo 5. n = 6 para todos los grupos.

5 [0231] Los resultados de evaluar patológicamente la retina se muestran en la Figura 70. Los tres péptidos inhibidores de HTRA1 mostraron un efecto supresor marcado en la disminución en el recuento de núcleos en una capa nuclear exterior causado por la exposición a la luz.

[0232] Ejemplo 11. Efecto protector en las células del epitelio pigmentario de la retina por inhibición de HTRA1 en modelos de ratas de daño retiniano causado por la carga con una dieta rica en grasas que contiene hidroquinona.

10 **(11-1) Preparación del modelo de daño retiniano en conejos mediante la carga con una dieta rica en grasas que contiene hidroquinona**

[0233] Los modelos de daño retiniano preparados utilizando dietas ricas en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) e hidroquinona (HQ, por sus siglas en inglés) son modelos en los que el estrés oxidativo se induce mediante un prooxidante para causar daño retiniano. Estos modelos se han presentado solamente para ratones (Diego G. Espinosa-Heidmann et al., (2006) Invest Ophthalmol Vis Sci., Vol. 47 (núm. 2): pág. 729-737). Por consiguiente, los conejos de 3 años de edad se alimentaron durante 4 meses con una dieta de RC4 (Oriental Yeast Co., Ltd.) que contenía 1,5% (p/v) de aceite de coco, 0,25% (p/v) de colesterol, 1,5% (p/v) de aceite de cacahuete, 2,4% (p/v) de hidroquinona (HFD-HQ) para construir modelos de conejos de daño retiniano. Después de la eutanasia, se extirparon los glóbulos oculares y se extrajo el segmento anterior del ojo mediante una incisión externa de alrededor de 5 mm del limbo corneal. El cuerpo vítreo se separó más. A continuación, la retina coroides esclerótica se fijó sumergiéndola en fijador de paraformaldehído al 4% (p/v) durante 24 horas o más. Después de la fijación, la coroides se separó y se inmunotizó utilizando como un anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal ZO-1 (ZO1-1A12) (Thermo Fisher Scientific Inc.; 33-9100) y como un anticuerpo secundario, Anticuerpo secundario de adsorción cruzada IgG de pollo anti-ratón (H+L), Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific Inc.; A-21201). La coroides teñida se observó con un microscopio de fluorescencia (BZ-9000; Keyence Corp.). Se determinó el área de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) teñidas para evaluar el daño celular de EPR.

[0234] La Figura 71 muestra imágenes de tinción de las células del EPR de un conejo de 12 semanas, un conejo de 3 años y un conejo de 3 años cargado con HFD-HQ (Figura 71(A)) y un gráfico de las áreas medias de las células del EPR (Figura 71(B)). Se confirmó que las células del EPR estaban más hipertrofiadas en el conejo de 3 años que en el de 12 semanas y que se hipertrofiaban aún más con la carga de HFD-HQ. Se confirmó la aparición de daños en las células del RPE. Se ha observado un cambio similar en los globos oculares de los pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (Ding JD et al., (2011) Proc Natl Acad Sci U S A., Vol. 108 (núm. 28): pág. 279-87).

**(11-2) Aumento del nivel de expresión del factor C3 relacionado con la DMAE en el momento del daño retiniano**

35 [0235] Para evaluar la expresión del factor relacionado con DMAE, los tejidos se recogieron respectivamente de la retina y las/la RPE/coroides de los modelos de conejos de daño retiniano. se extrajo ARNm utilizando un mini kitRNeasy (Qiagen N.V.) y, a continuación, se sometió a una reacción de transcripción inversa utilizando un Master Mix de expresión genética TaqMan (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los niveles de ARNm del componente 3 del complemento (C3) y de un patrón interno  $\beta$ -actina se analizaron cuantitativamente mediante un ensayo TaqMan de expresión genética (Oc03397832\_g1 y Oc03824857\_g1; Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando el sistema 7900HT rápido en tiempo real de PCR (Applied Biosystems, Inc.). El análisis se llevó a cabo en n = 4 para conejos de 3 años y n = 10 para conejos de 3 años cargados con HFD-HQ.

45 [0236] Los niveles de expresión de C3 en la retina y las células RPE y la coroides se muestran en la Figura 71 (C) y (D). Para ambos tejidos, se confirmó el aumento del nivel de expresión de C3 en el grupo de conejos al que se había dado HFD-HQ.

**(11-3) Aumento del nivel de proteína de HTRA1 en el momento del daño retiniano**

50 [0237] Para examinar la implicación de HTRA1 en modelos de conejos de daño retiniano, el humor vítreo se recogió de los conejos modelo preparado en (11-1) y se digirió enzimáticamente con Tripsina/Lys-C Mix (Promega Corp.). Después, un fragmento peptídico de HTRA1 se cuantificó utilizando LC (EASY-nLC 1000; Thermo Fisher Scientific Inc.)-MS (TripleTOF 6600; AB Sciex Pte. Ltd). Se descubrió que el nivel de proteína de HTRA1 aumentó en el humor vítreo de los conejos a los que se les había dado HFD-HQ (Figura 71 (E)). De estos resultados, se confirmó la hipertrofia de las células RPE y la expresión aumentada del factor C3 relacionado con la DMAE y HTRA1, lo que

indica que los modelos de conejos de daño retiniano son útiles en la investigación de la enfermedad retiniana relacionada con la edad.

**(11-4) Efecto protector de la retina del inhibidor de HTRA1 en modelos de conejos de daño retiniano**

5 **[0238]** El efecto protector de la retina del péptido inhibidor de HTRA1 H308 preparado en el Ejemplo 1 se evaluó utilizando modelos de conejos. Después de 2 meses desde el inicio de la alimentación con HFD-HQ, se administraron por vía intravítrea 50 µl de una solución de H308 de 40 mg/mL en un ojo bajo anestesia. La salina normal se administró por vía intravítrea al ojo contralateral. n = 5 para todos los grupos.

10 **[0239]** Después de 4 meses desde el inicio de la alimentación, se evaluó la hipertrofia de las células RPE en los animales modelo. Los resultados se muestran en la Figura 72. El inhibidor de HTRA1 mostró un efecto supresor en la hipertrofia de las células RPE, como se observa en ambos indicadores, es decir, el área media de las células RPE (Figura 72(A)) y el número de células RPE hipertrofiadas que tienen un área celular de 1500 µm<sup>2</sup> o más (Figura 72(B)). Como se muestra en la Figura 71(E), se confirmó un aumento de HTRA1 en el humor vítreo de los modelos, lo que sugiere la implicación de HTRA1 en el proceso de daño en las células RPE debido a HFD-HQ. Por consiguiente, el péptido inhibidor de HTRA1 es útil como un agente antidegeneración macular relacionada con la edad. Esta prueba indicó que el péptido inhibidor de HTRA1 es útil en la prevención de, concretamente, la degeneración macular relacionada con la edad seca.

**[0240]** La presencia del péptido inhibidor de HTRA1 se confirmó en la retina de un conejo normal al que se le administró el péptido inhibidor de HTRA1, lo que indica la elevada penetración tisular del péptido inhibidor de HTRA1.

20 **[0241]** Ejemplo 12. Efecto supresor del péptido inhibidor de HTRA1 en una prueba de inducción de ARNm VEGF que utiliza células del epitelio pigmentario de la retina humanas ARPE-19.

25 **[0242]** Las células RPE-19 se cultivaron hasta confluencia en Transwell de 12 mm con inserto de membrana de poliéster de 0,4 µm de poro, estéril (Corning Inc.) en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> utilizando un medio DMEM/F-12 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific Inc.). Después, las células se cultivaron en DMEM/F-12 sin FBS durante 5 días. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final: 500 µM) se añadió a las capas superiores e inferiores de la cámara y el complemento sérico normal humano (Quidel Corp.) (concentración final: 25%) se añadió a la capa superior de la cámara. Cada uno de HTRA1 (Ejemplo 2-2), mutante de proteasa de HTRA1 inactivo HTRA1 (S328A) (Ejemplo 2-3) o el péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A (Ejemplo 6) se añadieron además en una concentración final de 1 µM a las capas superior e inferior de la cámara. Cuatro horas más tarde, el sobrenadante de cultivo se eliminó y las células se lavaron con PBS. Después, ARNm se extrajo utilizando lisis celular SuperPrep(TM) & RT kit para qPCR (Toyobo Co., Ltd.) y se sometió a una reacción de transcripción inversa. El nivel de ARNm de VEGF se analizó cuantitativamente mediante ensayos TaqMan de expresión genética (Hs000900055\_m1 y Hs02786624\_g1; Thermo Fisher Scientific Inc.) utilizando el sistema 7900HT rápido en tiempo real de PCR (Applied Biosystems, Inc.). GAPDH se utilizó en la corrección del nivel de ARNm.

30 **[0243]** Los resultados se muestran en la Figura 74. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, complemento sérico humano normal y HTRA1 aumentó notablemente el nivel de ARNm del VEGF en comparación con las condiciones de adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, complemento sérico humano normal y mutante HTRA1 inactivo HTRA1 (S328A). Se confirmó que la coadición del péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A suprimió la expresión de VEGF. La inducción de VEGF de las células del epitelio pigmentario de la retina fue importante para la patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda (Klettner A. et al., (2009) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., Vol. 247: pág. 1487-1492). Además, se considera que dicha inducción mórbida del VEGF está implicada no sólo en la patogénesis, sino también en el mantenimiento de la condición patológica. Por consiguiente, la administración del péptido de la presente invención, tal como péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A es efectivo para la prevención y el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda.

35 **[0244]** Ejemplo 13. Efecto supresor del péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A en la migración de la célula endotelial de la vena umbilical humana (HUVEC).

**(13-1) Test de migración de HUVEC**

40 **[0245]** Se cultivó la HUVEC (Kurabo Industries Ltd.) durante 18 horas bajo condiciones de 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en un medio (EGM sin suero que contiene 0,1% de BSA) en el que el medio basal EBM(TM)-2 (Lonza Walkersville, Inc.) que contiene 0,1% de BSA se complementó con un conjunto de factores aditivos EGM(TM)-2 SingleQuots(TM) excepto suero y VEGF. Después, las células se ajustaron a 4 × 10<sup>5</sup> células/mL con EGM sin suero que contenía 0,1% de BSA. Se añadieron 4 × 10<sup>5</sup> células/mL de la suspensión de HUVEC a 50 µl/pocillo a la capa superior de

una cámara de un sistema de soporte permeable multipocillo de 96 pocillos FluoroBlok HTS de Corning con una membrana de PET de alta densidad de 3,0 µm (Corning Inc.) que tenía una membrana recubierta de gelatina. A continuación, se añadió cada muestra descrita a continuación (medio 1, 2 o 3) a 210 µl/pocillo en la capa inferior de la cámara (n = 3). Se añadió EGM sin suero que contenía 0,1% de BSA a 50 µl/pocillo a la capa superior de una cámara sin añadir HUVEC, y se añadió EGM sin suero que contenía 0,1% de BSA a 210 µl/pocillo a la capa inferior de la cámara (n = 3).

Medio 1; EGM sin suero que contiene 0,1% de BSA

Medio 2; medio EBM(TM)-2 suplementado con todos los factores aditivos EGM(TM)-2 SingleQuots(TM) (medio de crecimiento EGM)

10 Medio 3; medio de crecimiento EGM que contiene 300 nM de H308\_D1G\_S16A

[0246] Un sistema de soporte multipocillo de 96 pocillos FluoroBlok HTS se complementó con las células y la muestra se incubó durante 2 horas bajo condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La HUVEC migrada a la capa inferior se lavó con PBS y después se tiñó durante 15 minutos con EGM sin suero que contenía 0,1% de BSA que contenía 4 µg/mL de Calceína-AM (Thermo Fisher Scientific Inc.). Después, se sustituyó el medio por PBS. La intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación/longitud de onda de fluorescencia: 485 nm/535 nm) de cada pocillo se midió utilizando un lector de placas (ARVO-MX, PerkinElmer, Inc.), y las células migradas se contaron para cada pocillo de acuerdo con la siguiente expresión. Células migradas = intensidad media de fluorescencia de los pocillos que contienen HUVEC (n = 3) - intensidad media de fluorescencia de los pocillos en blanco (n = 3).

[0247] Los resultados se muestran en la Figura 75. Se confirmó que el péptido inhibidor de HTRA1 H308\_D1G\_S16A tiene un efecto supresor sobre la migración de HUVEC inducida en el medio que contenía suero. En consecuencia, se descubrió que el péptido de la presente invención exhibe un efecto supresor sobre la angiogénesis, una característica de la degeneración macular relacionada con la edad húmeda.

**Ejemplo 14. Efecto protector del péptido inhibidor de HTRA1 en modelos de conejos de daño retiniano (parte 2)**

[0248] Se evalúa el efecto terapéutico del péptido inhibidor de HTRA1 H308 preparado en el Ejemplo 1 o de uno de los tres péptidos inhibidores de HTRA1 preparados en el Ejemplo 6 sobre el daño retiniano utilizando los modelos de daño retiniano de conejos preparados y evaluados en los Ejemplos (11-1) a (11-3). Se administran por vía intravítrea 50 µl de una solución de péptido inhibidor de 40 mg/mL en un ojo de cada animal modelo bajo anestesia, y se cría al animal durante 2 meses. La salina normal se administra por vía intravítrea al ojo contralateral. n = 5 para todos los grupos.

[0249] El aumento en el área celular de RPE o el aumento en el recuento celular de RPE debería considerarse normal en el grupo de administración salina normal, mientras que el aumento en el área celular de RPE o el aumento en el recuento celular de RPE debería suprimirse en el grupo de administración del péptido inhibidor de HTRA1. Por consiguiente, se puede confirmar que el péptido inhibidor de HTRA1 es útil como un agente antidegeneración macular relacionada con la edad. En este Ejemplo, se puede confirmar que el péptido inhibidor de HTRA1 es útil en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, en particular.

**Aplicabilidad industrial**

[0250] El péptido proporcionado por la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el péptido son útiles en el tratamiento o prevención, etc. de la degeneración macular relacionada con la edad y similares.

**Lista de secuencias de texto libre**

**[0251]**

SEQ ID NO: 1- secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (Figura 13)

45 SEQ ID NO: 2- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de SPINK2 humana (Figura 14)

SEQ ID NO: 3- secuencia de aminoácidos del péptido H218 (Figura 15)

SEQ ID NO: 4- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H218 (Figura 16)

SEQ ID NO: 5- secuencia de aminoácidos del péptido H223 (Figura 17)

- SEQ ID NO: 6- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H223 (Figura 18)
- SEQ ID NO: 7- secuencia de aminoácidos del péptido H228 (Figura 19)
- SEQ ID NO: 8- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H228 (Figura 20)
- SEQ ID NO: 9- secuencia de aminoácidos del péptido H308 (Figura 21)
- 5 SEQ ID NO: 10- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H308 (Figura 22)
- SEQ ID NO: 11- secuencia de aminoácidos del péptido H321 (Figura 23)
- SEQ ID NO: 12- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H321 (Figura 24)
- 10 SEQ ID NO: 13- secuencia de aminoácidos del péptido H322 (Figura 25)
- SEQ ID NO: 14- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido H322 (Figura 26)
- SEQ ID NO: 15- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308AT.(Figura 27)
- 15 SEQ ID NO: 16- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308AT (Figura 28)
- SEQ ID NO: 17- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H321AT.(Figura 29)
- SEQ ID NO: 18- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H321AT (Figura 30)
- SEQ ID NO: 19- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H322AT.(Figura 31)
- 20 SEQ ID NO: 20- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H322AT (Figura 32)
- SEQ ID NO: 21- secuencia de aminoácidos del péptido M7 (Figura 33)
- SEQ ID NO: 22- secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del péptido M7 (Figura 34)
- SEQ ID NO: 23- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308\_S16A.(Figura 35)
- 25 SEQ ID NO: 24- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308\_D1G\_S16A.(Figura 36)
- SEQ ID NO: 25- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308\_D1S\_S16A.(Figura 37)
- SEQ ID NO: 26- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308\_D1E\_S16A.(Figura 38)
- SEQ ID NO: 27- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H308\_D1SLI\_S16A.(Figura 39)
- SEQ ID NO: 28- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H321AT\_D1G\_S16A.(Figura 40)
- 30 SEQ ID NO: 29- secuencia de aminoácidos del derivado peptídico H322AT\_D1G\_S16A.(Figura 41)
- SEQ ID NO: 30- fórmula general del péptido inhibidor de HTRA1 (Figura 42)
- SEQ ID NO: 31- secuencia de aminoácidos que consiste en un *S-tag* y un enlazador (Figura 43)
- SEQ ID NO: 32- secuencia de aminoácidos del hexámero C-terminal (Figura 44)
- SEQ ID NO: 33- secuencia de nucleótidos del cebador 1 (Figura 45)
- 35 SEQ ID NO: 34- secuencia de nucleótidos del cebador 2 (Figura 46)
- SEQ ID NO: 35- secuencia de nucleótidos del cebador 3 (Figura 47)
- SEQ ID NO: 36- secuencia de nucleótidos del cebador 4 (Figura 48)
- SEQ ID NO: 37- secuencia de nucleótidos del cebador 5 (Figura 49)

## ES 2 966 319 T3

- SEQ ID NO: 38- secuencia de nucleótidos del cebador 6 (Figura 50)
- SEQ ID NO: 39- secuencia de nucleótidos del cebador 7 (Figura 51)
- SEQ ID NO: 40- secuencia de nucleótidos del cebador 8 (Figura 52)
- SEQ ID NO: 41- secuencia de nucleótidos del cebador 9 (Figura 53)
- 5 SEQ ID NO: 42- secuencia de nucleótidos del cebador 10 (Figura 54)
- SEQ ID NO: 43- secuencia de nucleótidos del cebador 11 (Figura 55)
- SEQ ID NO: 44- secuencia de nucleótidos del cebador 12 (Figura 56)
- SEQ ID NO: 45- secuencia de nucleótidos del cebador 13 (Figura 57)
- SEQ ID NO: 46- secuencia de nucleótidos del cebador 14 (Figura 58)
- 10 SEQ ID NO: 47- secuencia de nucleótidos del cebador 15 (Figura 59)
- SEQ ID NO: 48- secuencia de nucleótidos del cebador 16 (Figura 60)
- SEQ ID NO: 49- secuencia de nucleótidos del cebador 17 (Figura 61)
- SEQ ID NO: 50- secuencia de nucleótidos del cebador 18 (Figura 62)
- SEQ ID NO: 51- secuencia de nucleótidos del cebador 19 (Figura 63)
- 15 SEQ ID NO: 52- secuencia de nucleótidos del cebador 20 (Figura 64)
- SEQ ID NO: 53- secuencia de aminoácidos de HTRA1 humana (completa) (Figura 65)
- SEQ ID NO: 54- secuencia de aminoácidos de H2-Opt(Figura 8)
- SEQ ID NO: 55- secuencia de nucleótidos del cebador 21 (Figura 76)
- SEQ ID NO: 56- secuencia de nucleótidos del cebador 22 (Figura 77)

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido mutante SPINK2 que inhibe la actividad de proteasa de una HTRA1 humana, donde el péptido comprende:
  - 5 (a) una secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 24, 23, de la 25 a la 27, 9, 15, 3, 5, 7, 11, 13, 17, 19, 21, 28 y 29 (Figuras 36, 35, de la 37 a la 39, 21, 27, 15, 17, 19, 23, 25, 29, 31, 33, 40 y 41); o
  - (b) una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de (a) mediante la delección de 1 a 15 aminoácidos.
2. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos comprendida en el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una célula que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2 o el vector de acuerdo con la reivindicación 3 o que produce el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un método para producir un péptido mutante SPINK2 que inhibe la actividad de proteasa de HTRA1, que
  - 15 comprende las siguientes etapas (i) y (ii):
    - (i) cultivo de la célula de acuerdo con la reivindicación 4; y
    - (ii) recuperación del péptido mutante SPINK2 del cultivo.
6. Un conjugado que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o el péptido producido de acuerdo con la reivindicación 5 unido a una fracción adicional.
7. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, que es un polipéptido.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la recuperación del péptido mutante SPINK2 comprende una purificación por afinidad utilizando un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, que se une al péptido.
9. Una composición que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, el péptido producido de acuerdo con la reivindicación 5, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, el vector de acuerdo con la
  - 25 reivindicación 3, la célula de acuerdo con la reivindicación 4, y/o el conjugado de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.
10. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, el péptido producido de acuerdo con la reivindicación 5, el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, el vector de acuerdo con la reivindicación 3, la célula de acuerdo con la reivindicación 4, y/o el conjugado de acuerdo con la
  - 30 reivindicación 6 o 7.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con HTRA1, donde la enfermedad relacionada con HTRA1 es una o dos o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad húmeda, degeneración macular relacionada con la edad seca, atrofia geográfica, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, vasculopatía coroidea polipoidea, artritis reumatoide y osteoartritis.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende uno o dos o más medicamentos adicionales.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que se utiliza en combinación con uno o dos o más medicamentos adicionales.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12 o 13, o la
  - 40 composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 13, que es un agente protector de la retina.



hHtra1 (completa) Q92743	350	TKGGKELGLRNSMDYIQDAILINVSNGGPIANLDEGVIGINILKVTAGISFAIPSDK	359
cino. Htra1	361	TKGGKELGLRNSMDYIQDAILINVSNGGPIANLDEGVIGINILKVTAGISFAIPSDK	360
ratón Htra1 Q9R118	360	TKGGKELGLRNSMDYIQDAILINVSNGGPIANLDEGVIGINILKVTAGISFAIPSDK	359
rata HTRA1_Q9QZKS	360	TKGGKELGLRNSMDYIQDAILINVSNGGPIANLDEGVIGINILKVTAGISFAIPSDK	359
hHtra1 (completa) Q92743	360	TKKLTESHDRDQAKGNITKPKYIGIRMSLISSEKELKDRHDFEDV	419
cino. Htra1	361	TKKLTESHDRDQAKGNITKPKYIGIRMSLISSEKELKDRHDFEDV	420
ratón Htra1 Q9R118	360	TKKLTESHDRDQAKGNITKPKYIGIRMSLISSEKELKDRHDFEDV	419
rata HTRA1_Q9QZKS	360	TKKLTESHDRDQAKGNITKPKYIGIRMSLISSEKELKDRHDFEDV	419
hHtra1 (completa) Q92743	420	DTPEAKGLKENDVILSINGQSVV	479
cino. Htra1	421	DTPEAKGLKENDVILSINGQSVV	480
ratón Htra1 Q9R118	420	DTPEAKGLKENDVILSINGQSVV	479
rata HTRA1_Q9QZKS	420	DTPEAKGLKENDVILSINGQSVV	479
hHtra1 (completa) Q92743	480	PK	480
cino. Htra1	481	PK	481
ratón Htra1 Q9R118	480	PK	480
rata HTRA1_Q9QZKS	480	PK	480

Figura 1 (B)

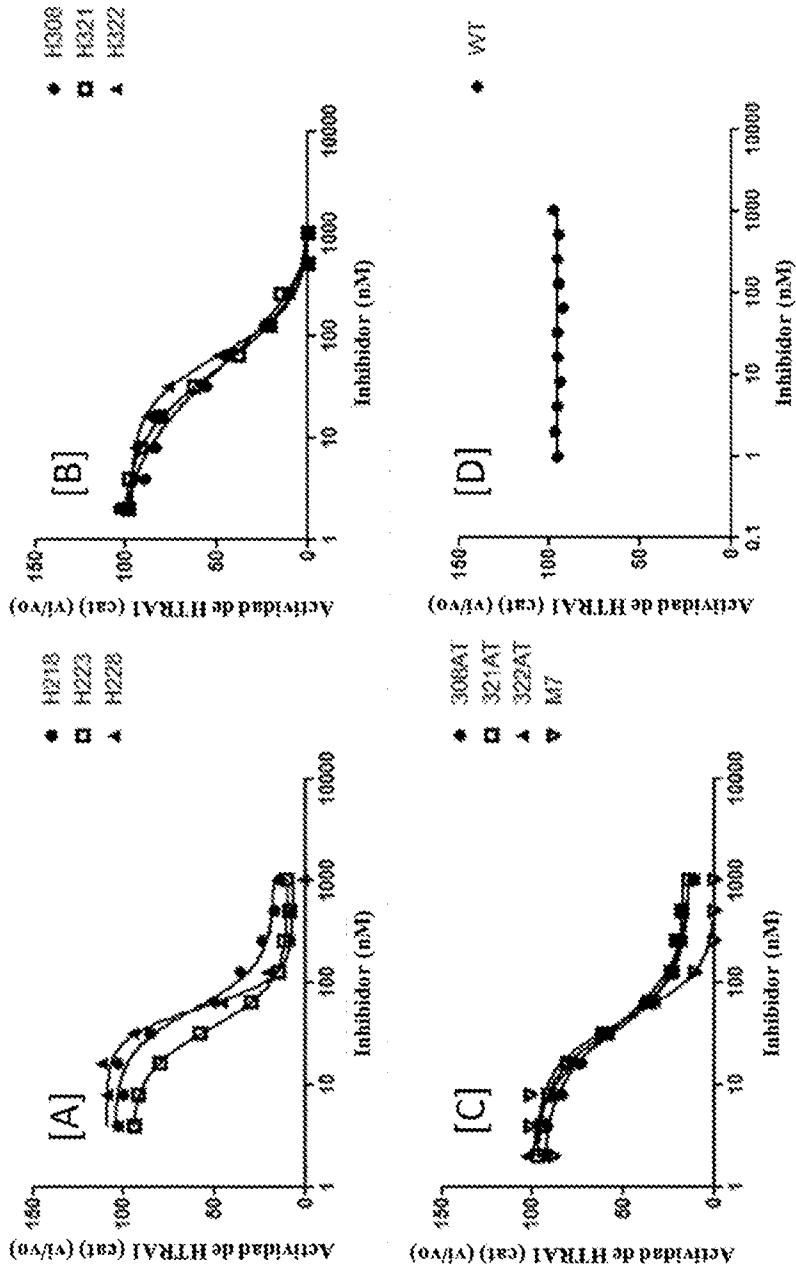


Figura 2

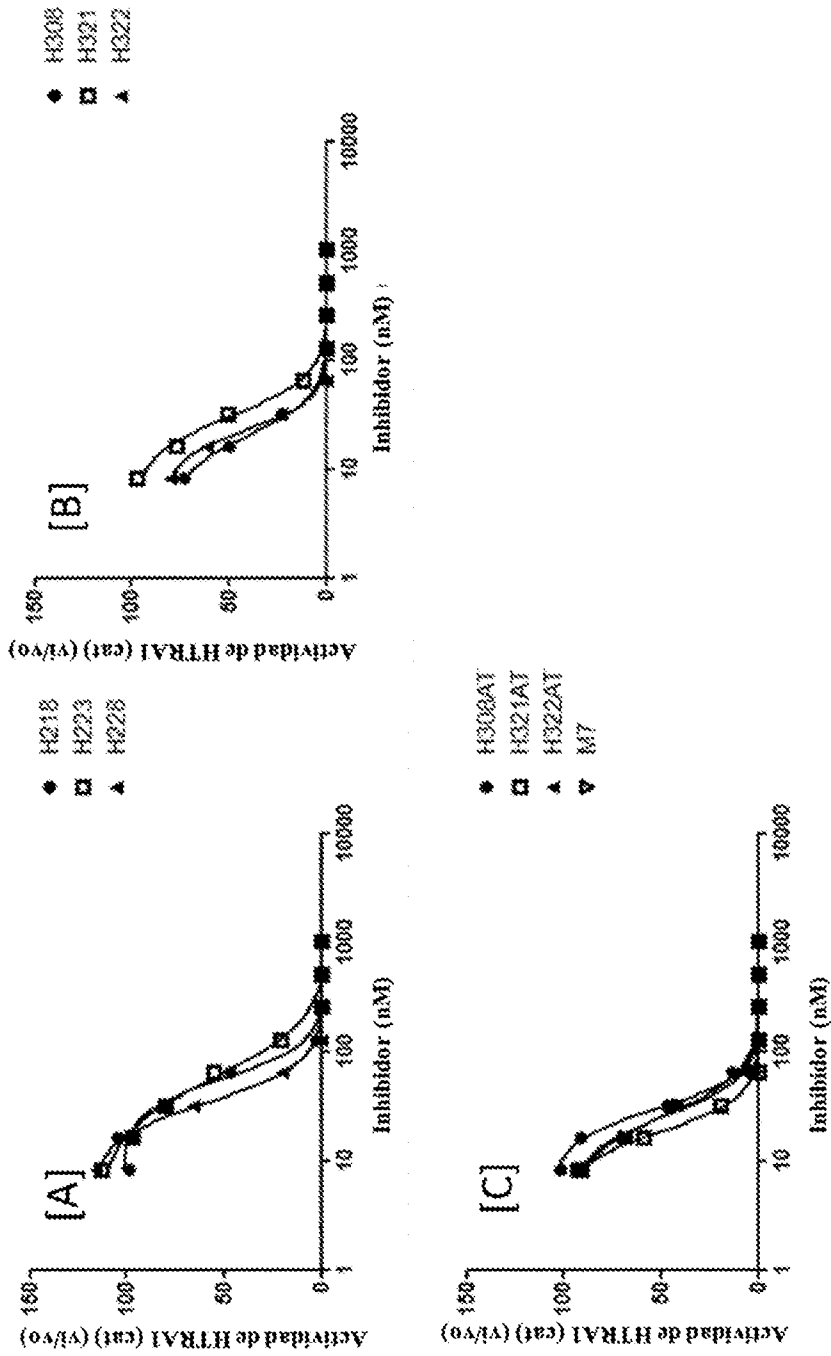


Figura 3

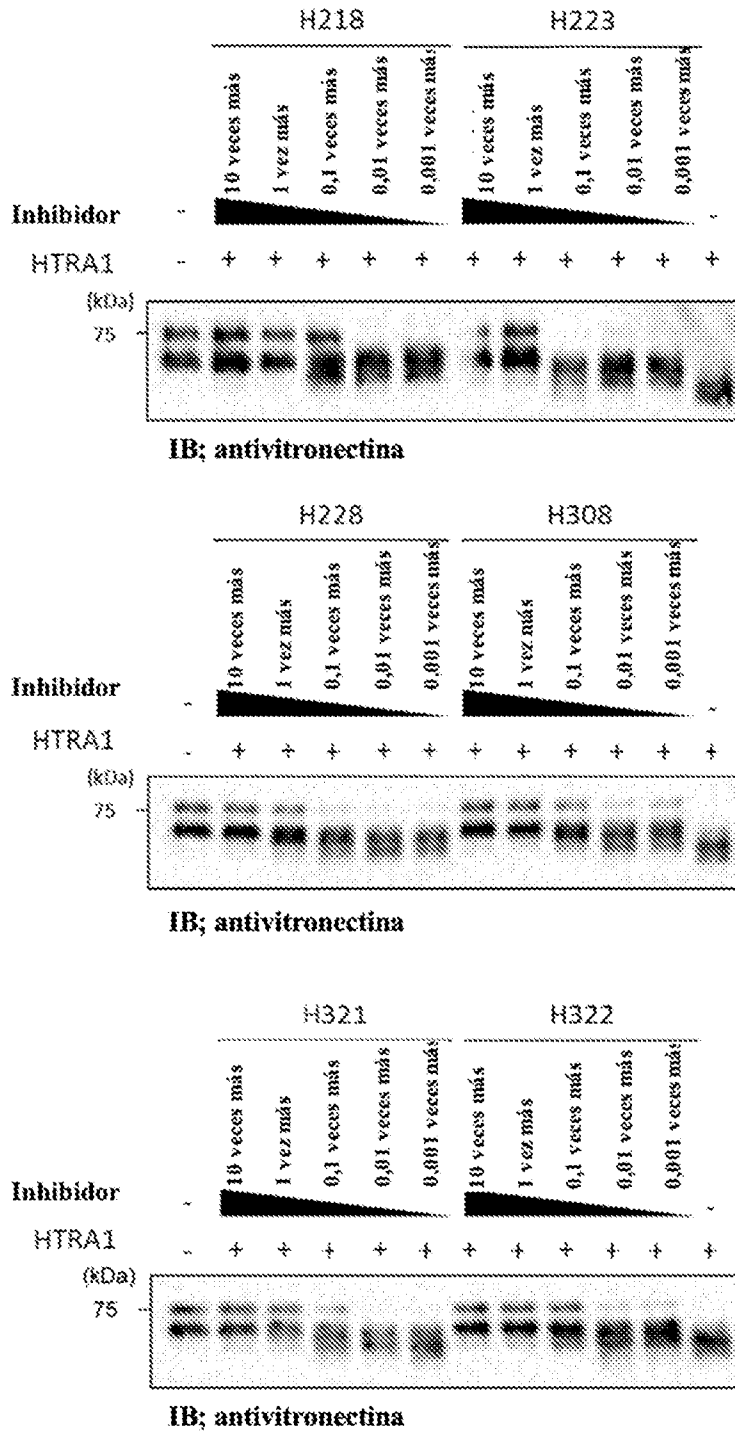


Figura 4 (A)

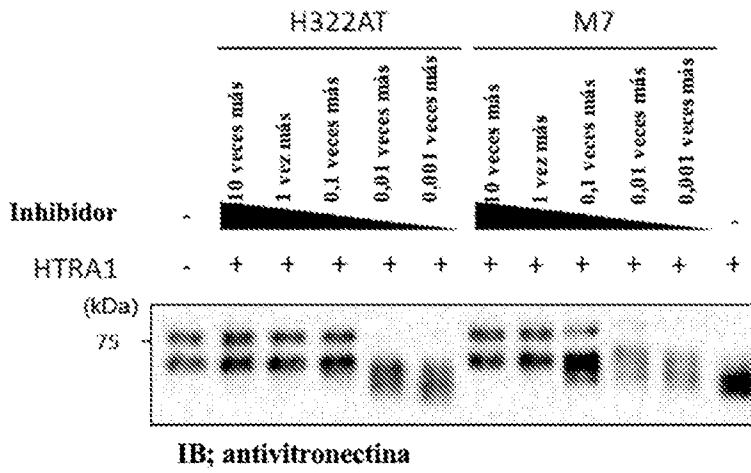
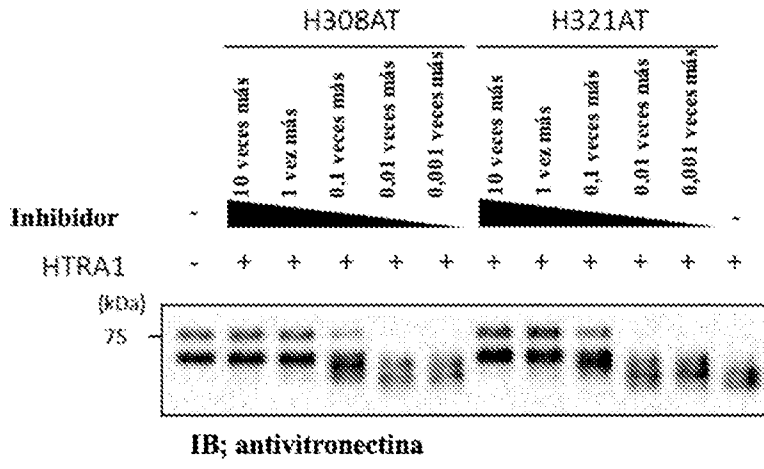


Figura 4 (B)

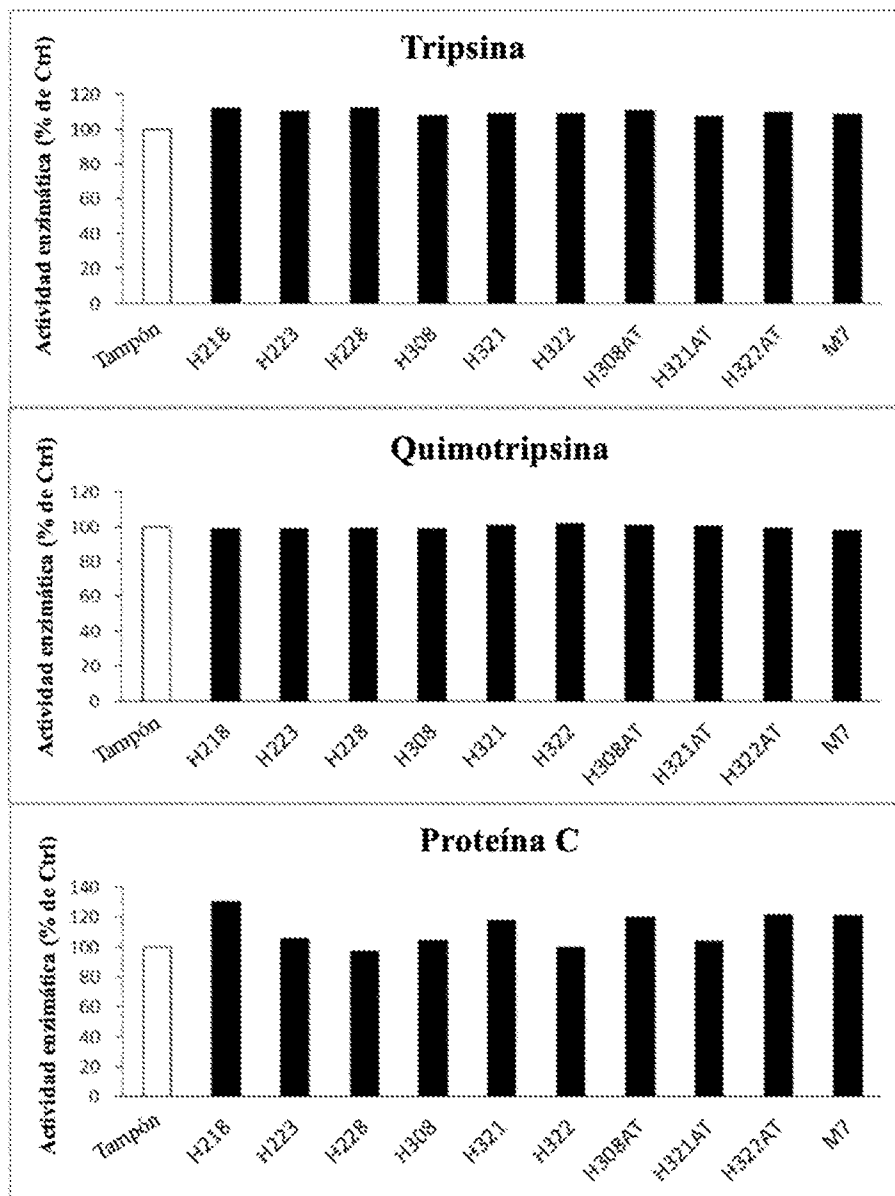


Figura 5 (A)

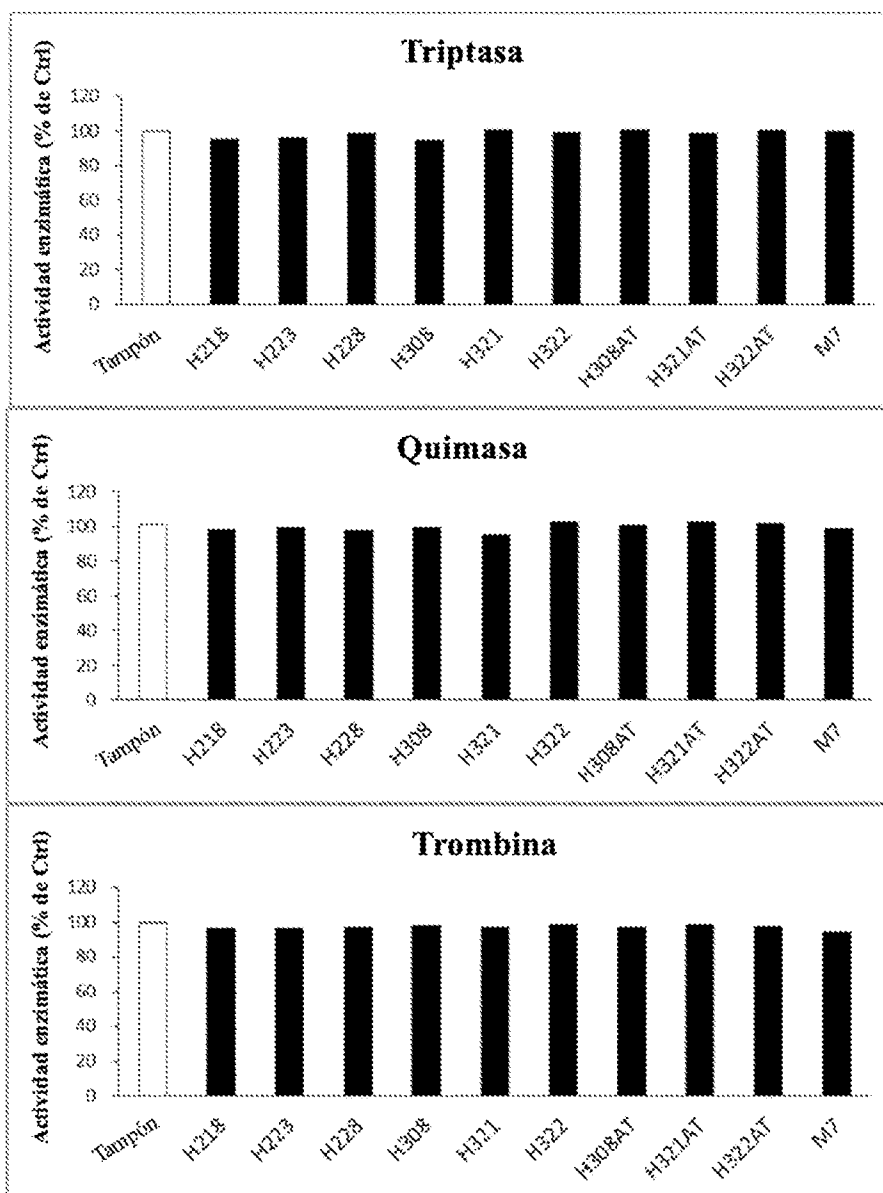


Figura 5 (B)

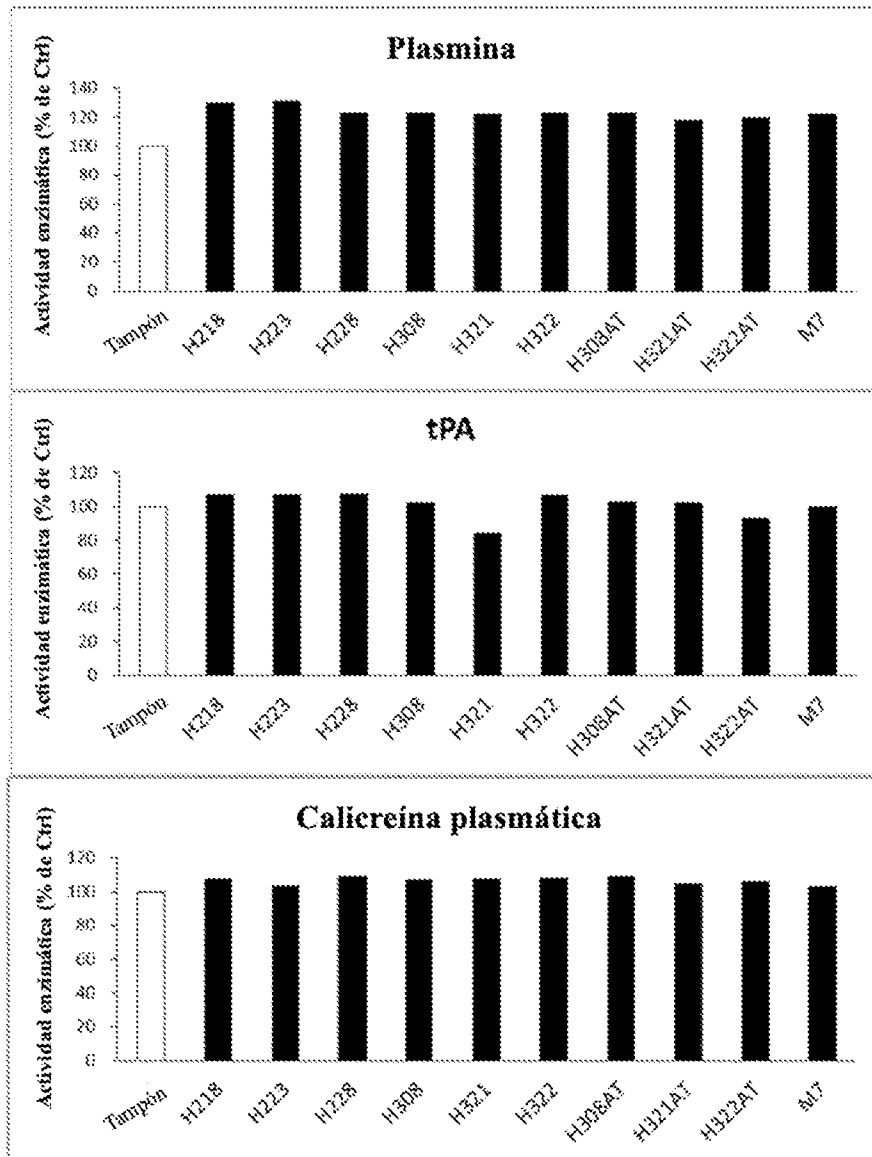


Figura 5 (C)

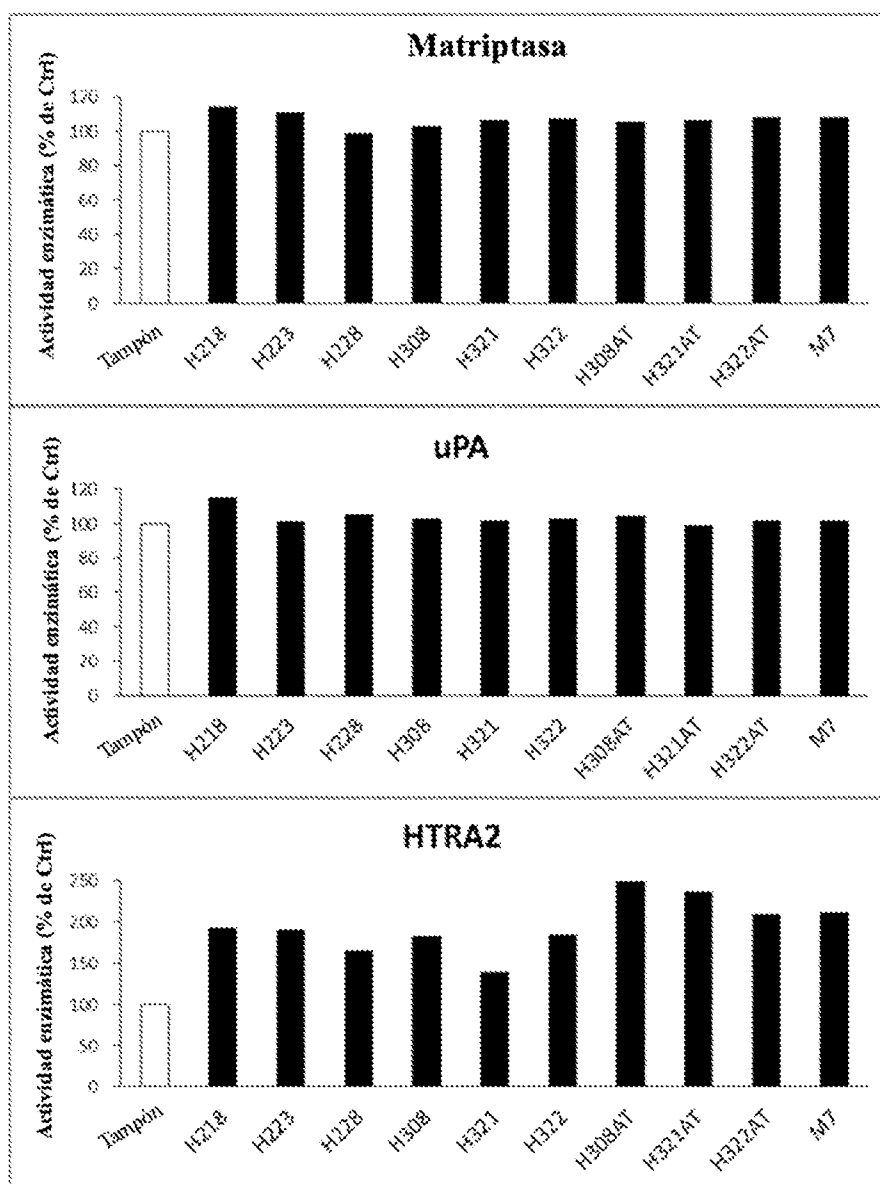


Figura 5 (D)

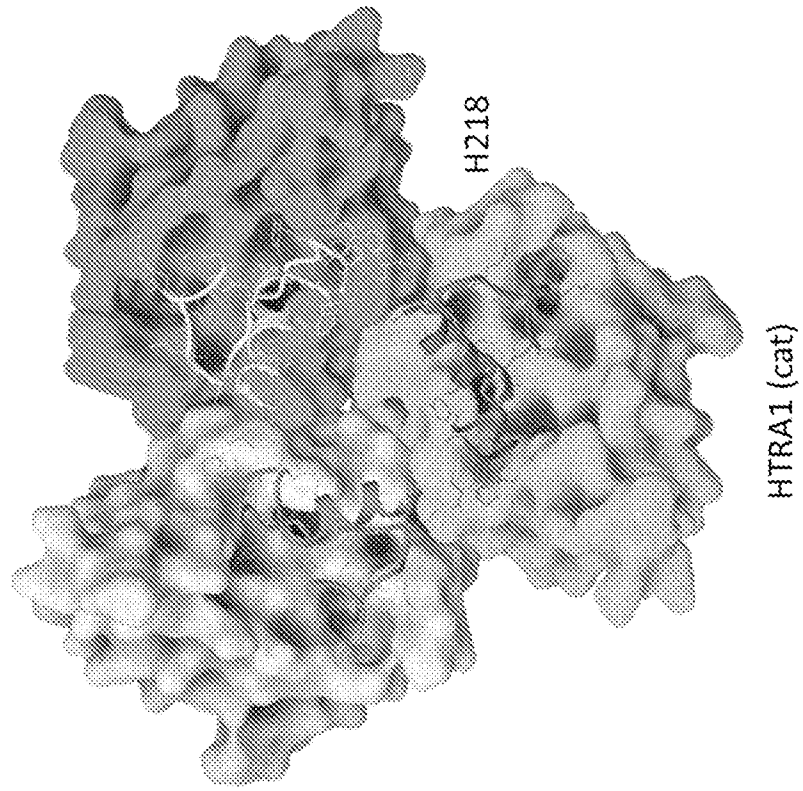


Figura 6

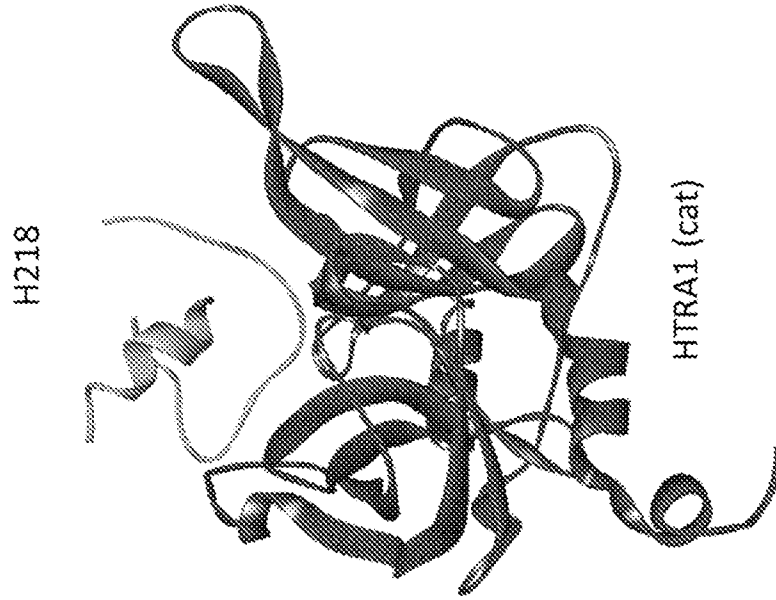


Figura 7

[Figura 8]

H2-Opt

Mea-IRRVSYSPK (Dnp) K (SEQ ID NO: 54)

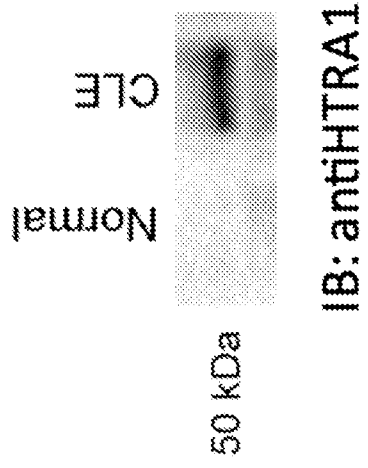


Figura 9

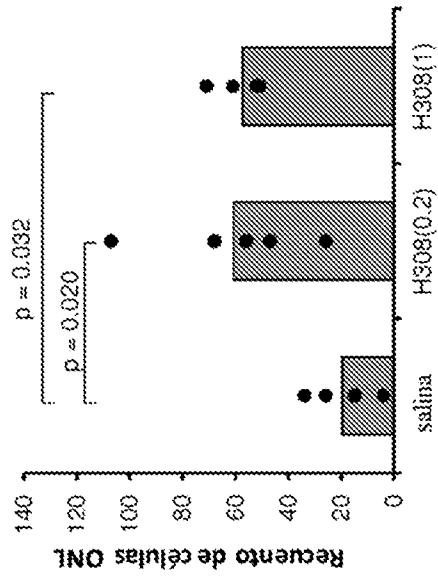


Figura 10

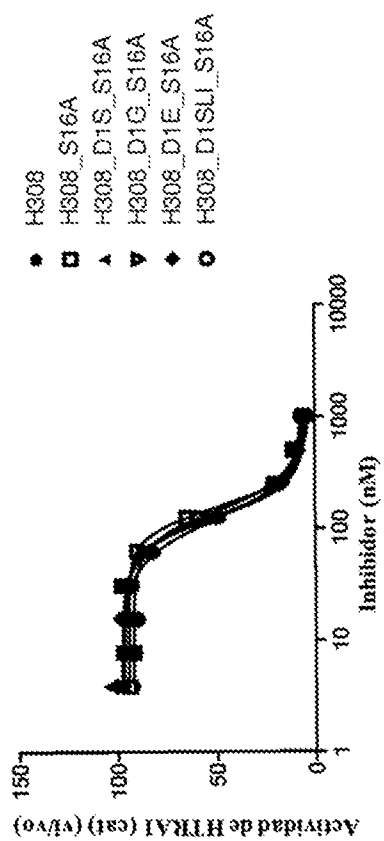


Figura 11

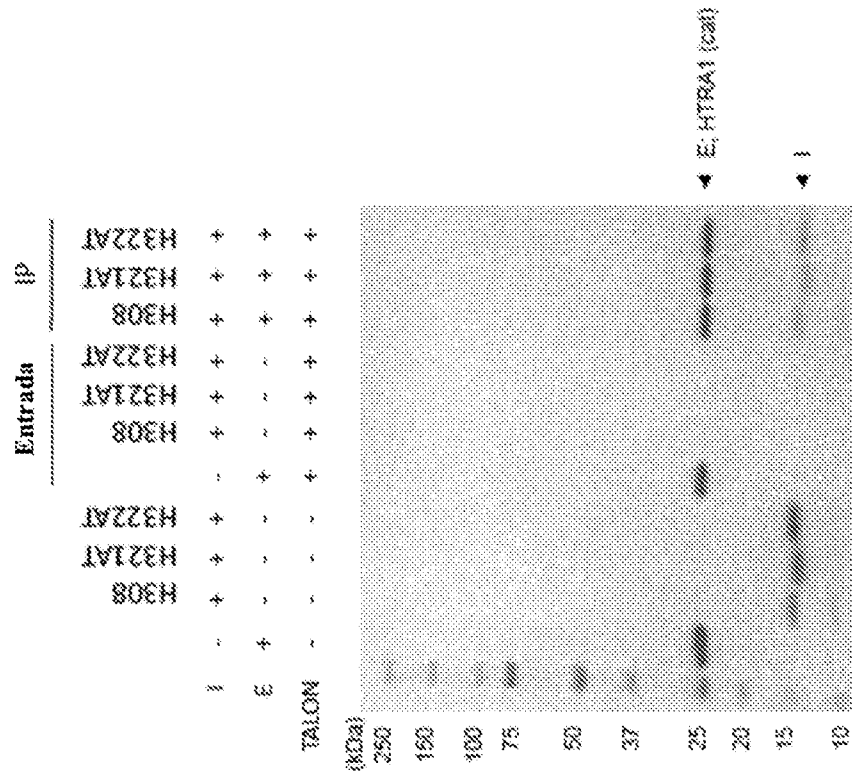


Figura 12

[Figura 13]

SPINK2 humana

DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (SEQ ID  
NO: 1)

[Figura 14]

SPINK2 humana

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCCAGTATCGTCTGCCTGGTTGTC  
CGCGTCATTTTAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCTAA (SEQ ID NO: 2)

[Figura 15]

Péptido inhibidor de HTRA1 H218

DPQFGLFSKYRTPNCLKSEGMACYAYYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 3)

[Figura 16]

Péptido inhibidor de HTRA1 H218

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTCTGAAATCTGAAGGTATGGCTTGTT  
ACGCTTACTACGAACCGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 4)

[Figura 17]

Péptido inhibidor de HTRA1 H218

DPQFGLFSKYRTPNCTMDMGMACWAFYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 5)

[Figura 18]

Péptido inhibidor de HTRA1 H223

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTA CTATGGACATGGGTATGGCTTGTT  
GGGCTTTCTACGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 6)

[Figura 19]

Péptido inhibidor de HTRA1 H228

DPQFGLFSKYRTPNCGHYNGWACQAFFEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 7)

[Figura 20]

Péptido inhibidor de HTRA1 H228

HTRA1-inhibiting peptide H228  
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTTGGTCAATTACAACGGTTGGGCTTGTC  
AGGCTTTCTTCGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 8)

[Figura 21]

Péptido inhibidor de HTRA1 H308

DPQFGLFSKYRTPNCS DHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 9)

[Figura 22]

Péptido inhibidor de HTRA1 H308

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG  
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGAAAATGAATGTGTTCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCCGGCCGCTAA (SEQ ID NO:10)

[Figura 23]

Péptido inhibidor de HTRA1 H321

DPQFGLFSKYRTPNCSEDFDGMACYAFYEPVCGSDM  
STYMNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO:11)

[Figura 24]

Péptido inhibidor de HTRA1 H321

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCGACTTCGACGGTATGGCATGTT  
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATATGAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCCGGCCGCTAA (SEQ ID NO:12)

[Figura 25]

Péptido inhibidor de HTRA1 H322

DPQFGLFSKYRTPNCSEQHEGMACYALYEPVCGSDM  
STYVNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO:13)

[Figura 26]

Péptido inhibidor de HTRAl H322

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGCCATGTT  
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGTTAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA  
AATTTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO:14)

[Figura 27]

Péptido inhibidor de HTRAl H308AT

DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO:15)

[Figura 28]

Péptido inhibidor de HTRAl H308AT

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGCCATGTG  
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO:16)

[Figura 29]

Péptido inhibidor de HTRAl H321AT

DPQFGLFSKYRTPNCSDFDGMACYAFYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO:17)

[Figura 30]

Péptido inhibidor de HTRAI H321AT

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCCGACTTCGACGGTATGGCATGTT  
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 18)

[Figura 31]

Péptido inhibidor de HTRAI H322AT

DPQFGLFSKYRTPNCSQHEGMACYALYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 19)

[Figura 32]

Péptido inhibidor de HTRAI H322AT

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGGCATGTT  
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 20)

[Figura 33]

Péptido inhibidor de HTRAI M7

DPQFGLFSKYRTPNCS DHAGMACVAFYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 21)

[Figura 34]

Péptido inhibidor de HTRA1 M7

GATCCGCAGTTTGGCTCTGTTTAGCAAATATCGTAC  
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG  
TTGCTTTTTTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG  
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA  
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTTAAAATTATTC  
GCAATGGTCCGTGCGGGCGGCTAA (SEQ ID NO: 22)

[Figura 35]

Péptido inhibidor de HTRA1 H308\_S16A

DPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 23)

[Figura 36]

Péptido inhibidor de HTRA1  
H308\_D1G\_S16A

GPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 24)

[Figura 37]

Péptido inhibidor de HTRA1  
H308\_D1S\_S16A

SFQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 25)

[Figura 38]

Péptido inhibidor de HTRA1  
H308\_D1E\_S16A

EPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM  
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 26)

[Figura 39]  
Péptido inhibidor de HTRAI  
H308\_D1SLI\_S16A  
SLIPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGS  
DMSTYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 27)

[Figura 40]  
H321AT...DIG...S16A  
GPQFGLFSKYRTPNCADFDGMACYAFYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 28)

[Figura 41]  
H322AT...DIG...S16A  
GPQFGLFSKYRTPNCAQHEGMACYALYEPVCGSDM  
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ  
ID NO: 29)

[Figura 42]  
Fórmula general del PÉPTIDO  
INHIBIDOR DE HTRAI S  
 $X_1$ PQFGLFSKYRTPNC $X_2$  $X_3$  $X_4$  $X_5$ G $X_6$ AC $X_7$ AX $X_8$ EP  
VCGSDMSTY $X_{10}$ NECK $X_{11}$ LCMKIREGGHNIKIIRNG  
PC (SEQ ID NO: 30)

[Figura 43]  
S-tag + enlazador  
GSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIG  
SANS (SEQ ID NO: 31)

[Figura 44]  
Hexámero de C-terminal  
GASAAA (SEQ ID NO: 32)

[Figura 45]

Cebador 1

AAAAGAATTCTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG  
(SEQ ID NO: 33)

[Figura 46]

Cebador 2

AAAACTCGAGTTATGCCGGCCGCAGACGCCGCCGCAC  
GGACC (SEQ ID NO: 34)

[Figura 47]

Cebador 3

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTG  
GTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 35)

[Figura 48]

Cebador 4

AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCCA  
ATAATTTTA (SEQ ID NO: 36)

[Figura 49]

Cebador 5

AAACATATGGGGCAGGAAGATCCCAACAGTTTGC  
(SEQ ID NO: 37)

[Figura 50]

Cebador 6

AAACTCCAGTTTGGCCTGTCGGTCATGGGACTC (S  
EQ ID NO: 38)

[Figura 51]

Cebador 7

AAAAGAATTCCGCCACCATGCAGATTCCTAGAGCCG  
(SEQ ID NO: 39)

[Figura 52]

Cebador 8

AAAAC TCGAGTCAGTCGGTGATGGTGGTGGTGGCCG  
G (SEQ ID NO: 40)

[Figura 53]

Cebador 9

CTTGTCGTCATCGTCCTTG TAGTCGCCGGGGTCCA  
TTTCCTC (SEQ ID NO: 41)

[Figura 54]

Cebador 10

GCGACTACAAGGACGATGACGACAAGCACCACCAC  
CATCATCAC (SEQ ID NO: 42)

[Figura 55]

Cebador 11

AAAAC TCGAGCTAGTGATGATGGTGGTGGTGCTT  
GTCGTC (SEQ ID NO: 43)

[Figura 56]

Cebador 12

CCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCC  
GAATTGT (SEQ ID NO: 44)

[Figura 57]

Cebador 13

GCCATACCAGCATGGTCCGCACAATTCGGGGTACG  
ATATTTGC (SEQ ID NO: 45)

[Figura 58]

Cebador 14

GCGGACCATGCTGGTATGGCATGTGTTGCTCTGTA  
TGAAC (SEQ ID NO: 46)

[Figura 59]

Cebador 15

AAAAC TCGAGTTAGCCCGCCGCACGGACCATTGCCG  
ATAA (SEQ ID NO: 47)

[Figura 60]

Cebador 16

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTG  
GTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 48)

[Figura 61]

Cebador 17

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTG  
GTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 49)

[Figura 62]

Cebador 18

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCCGCAGTTTG  
GTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 50)

[Figura 63]

Cebador 19

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGAACCGCAGTTTG  
GTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 51)

[Figura 64]

Cebador 20

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCTGATTCCGC  
AGTTTGGTCTGTTTAG (SEQ ID NO: 52)

[Figura 65]

HTRAl humana (completa)

QLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCPPQPEHCCEGGR  
ARDACGCCEVCGAPEGAACGLQEGPCGEGLQCVVP  
FGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEFVCGSDANTYA  
NLCQLRAASRRSERLHRPPVIVLQRGACGQGQEDP  
NSLRHKYNFIADVVEKIAPAVVHIELFRKLPFSKR  
EVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVEL  
KNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLL  
GRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQR  
GGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLDG  
EVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQA  
KGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPD  
VISGAYIIEVIFDTPAEAGGLKENDVIISINGQSV  
VSANDVSDVIKRESTLNMVVRRGNEDIMITVIFEE  
IDP (SEQ ID NO: 53)

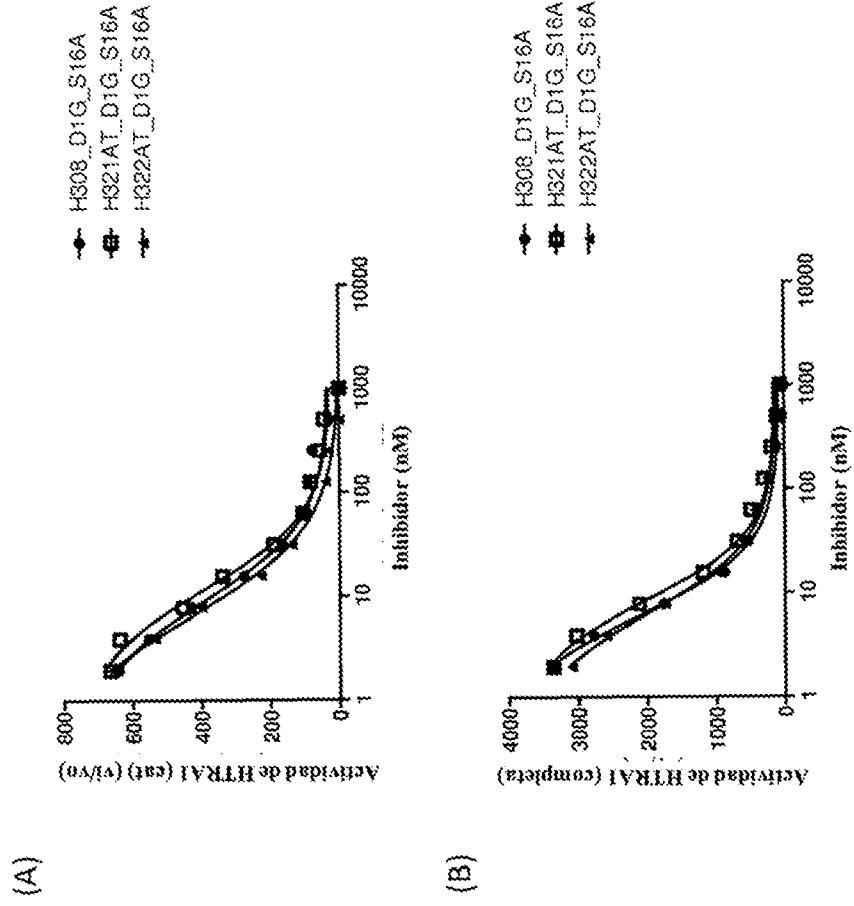


Figura 66

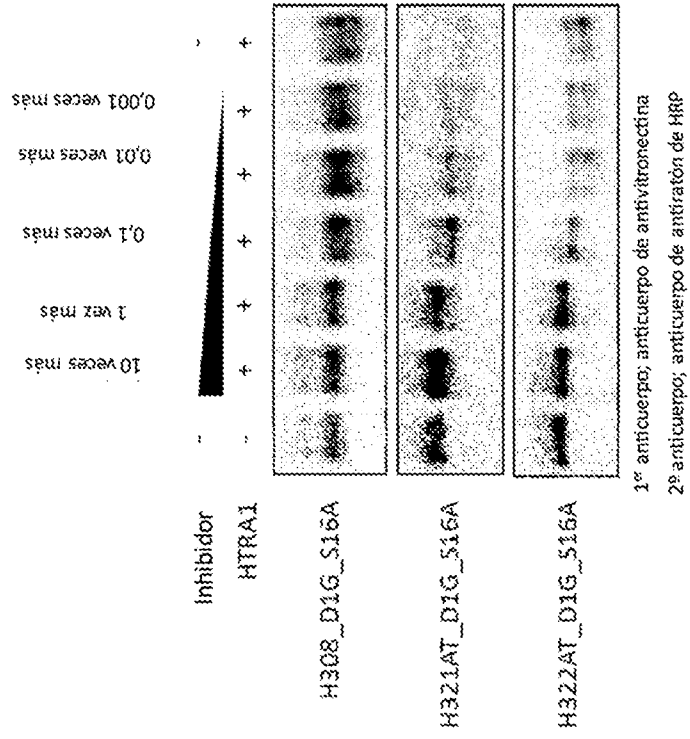


Figura 67

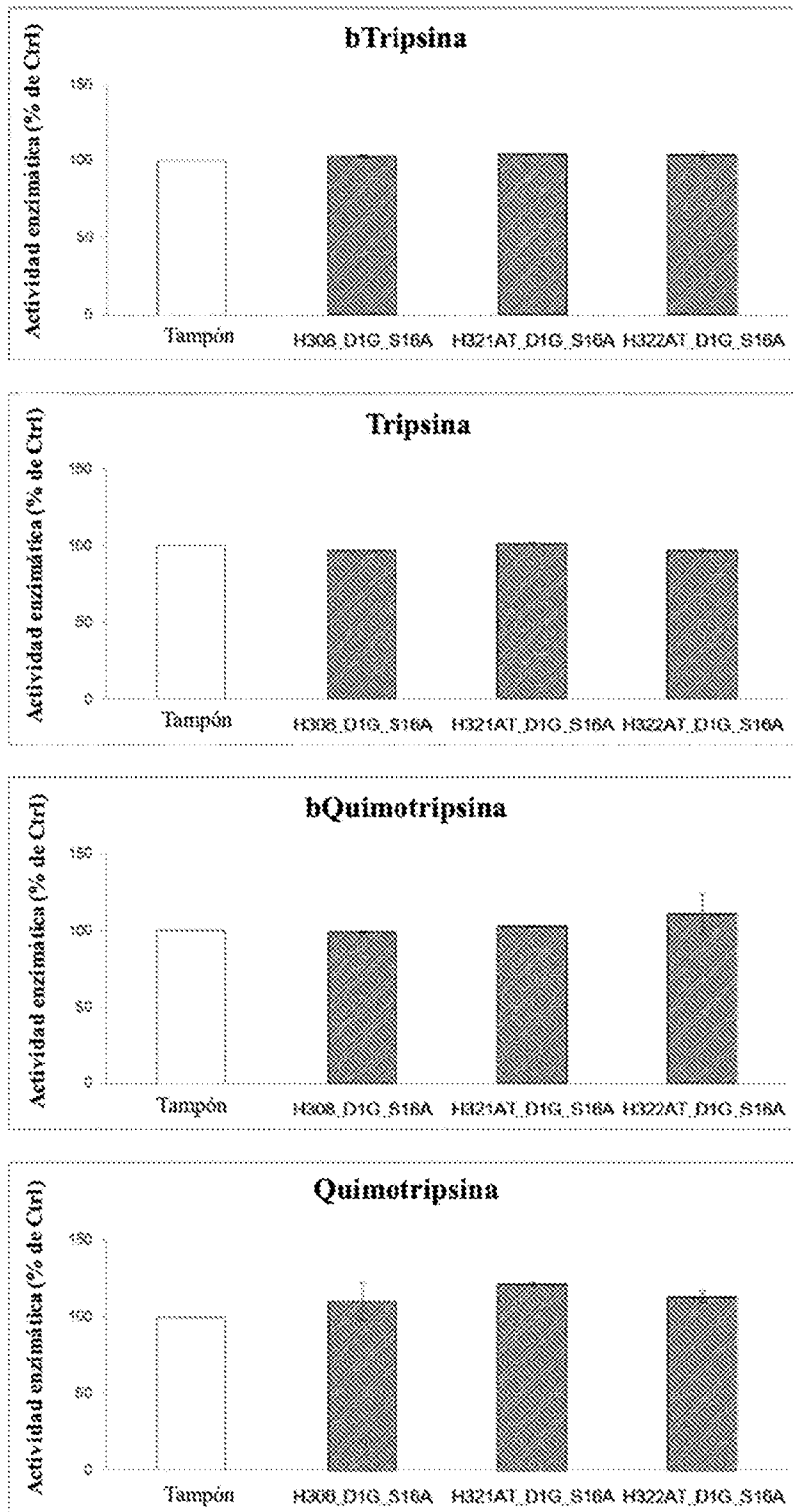


Figura 68 (A)

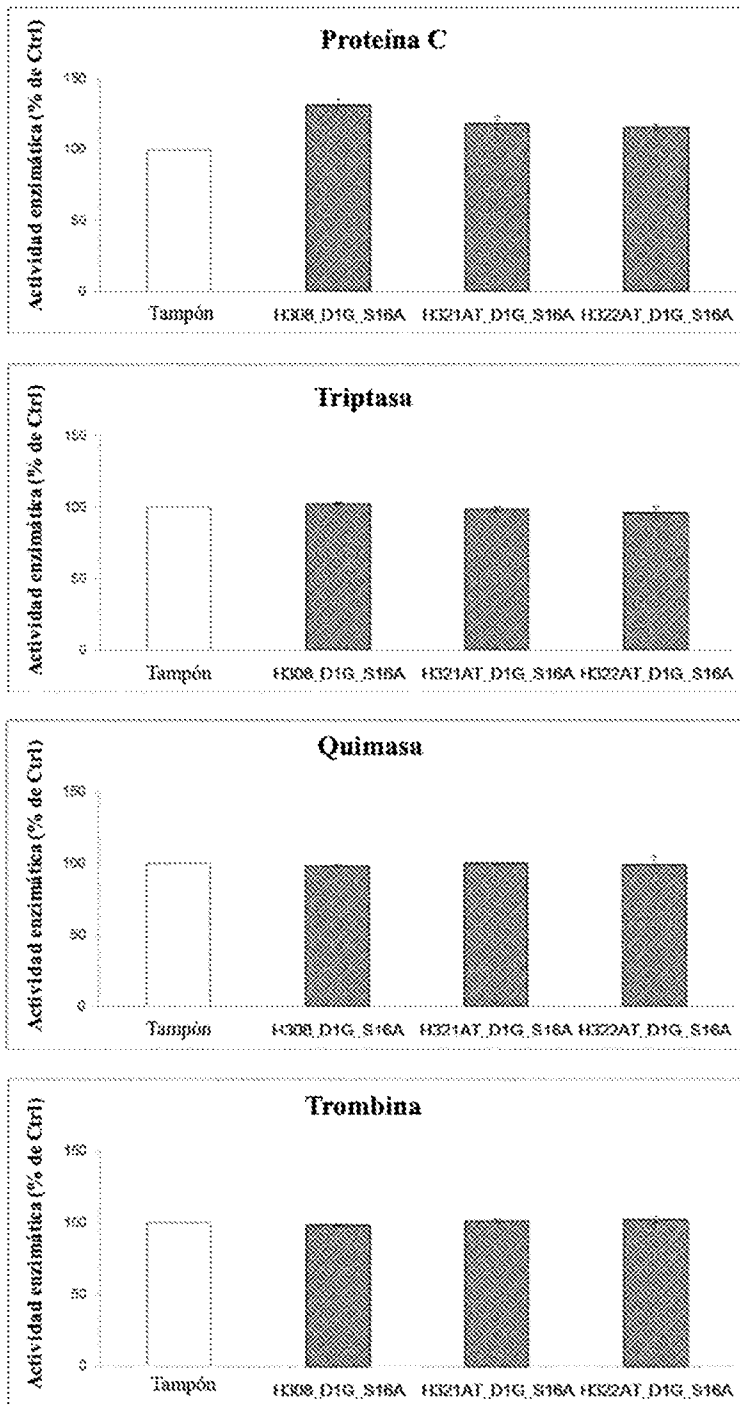


Figura 68 (B)

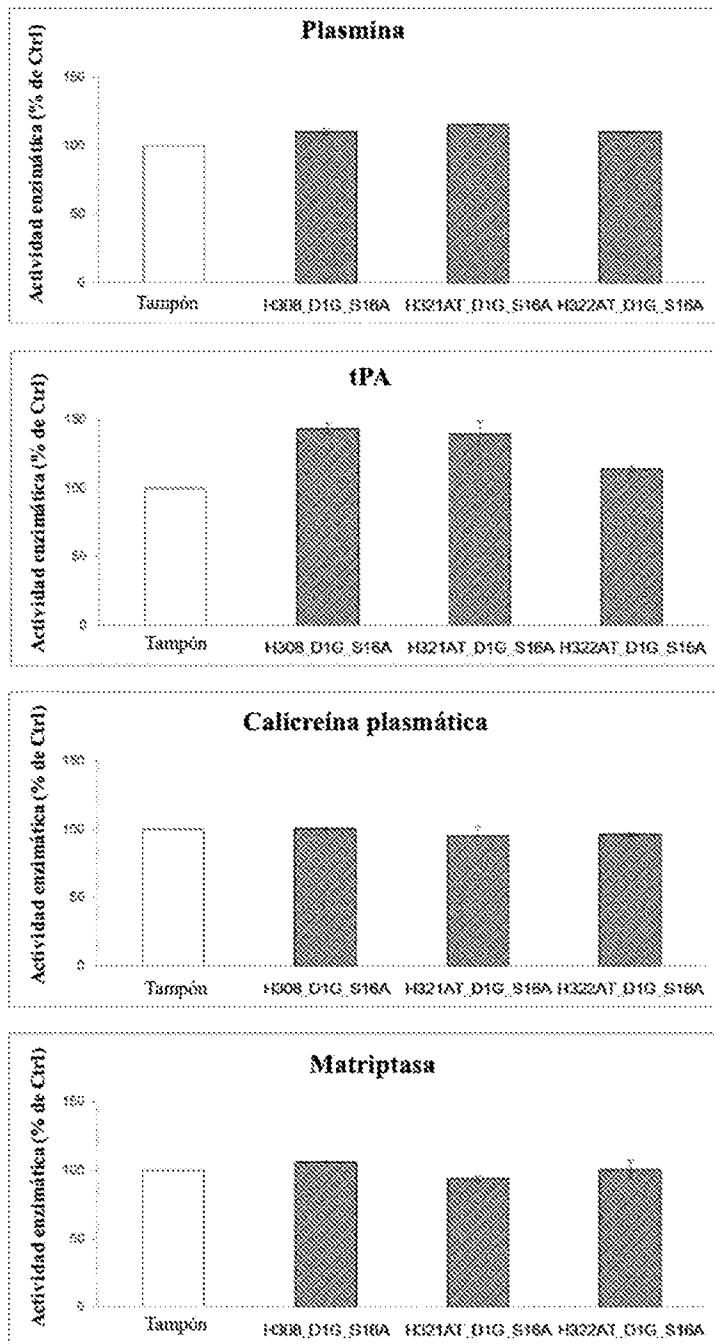


Figura 68 (C)

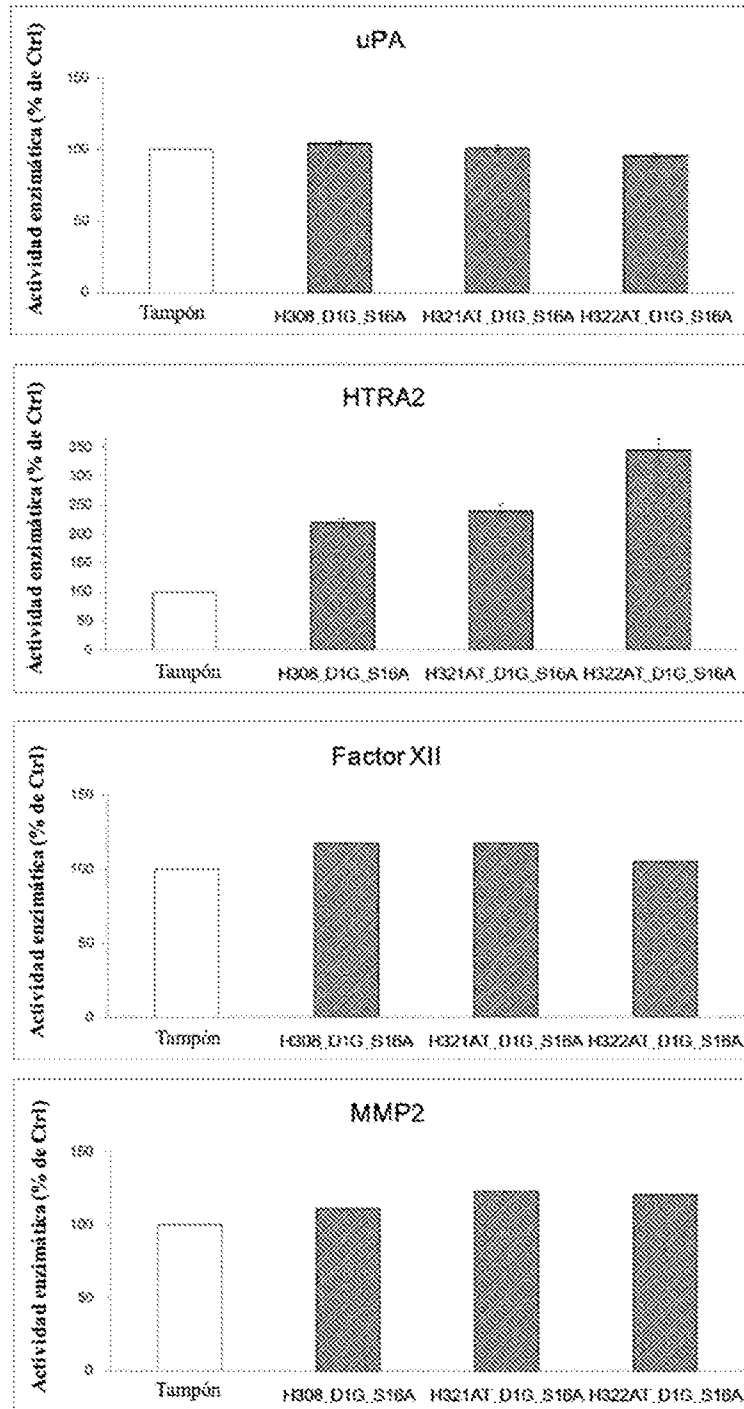


Figura 68 (D)

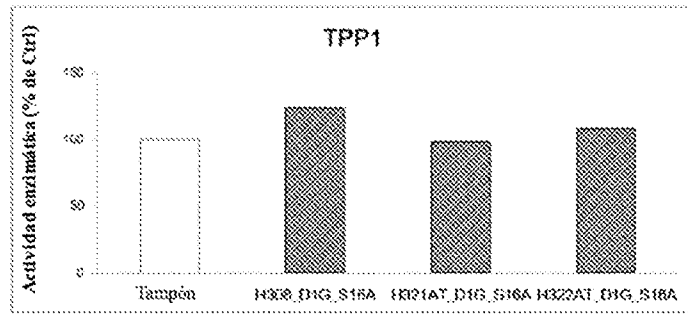


Figura 68 (E)

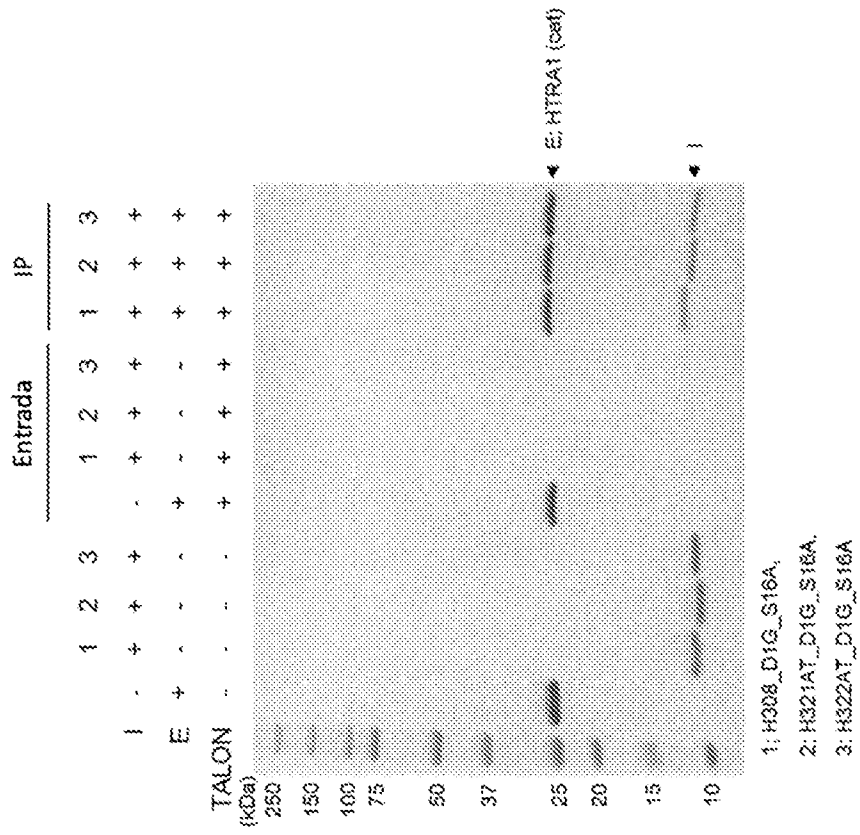


Figura 69

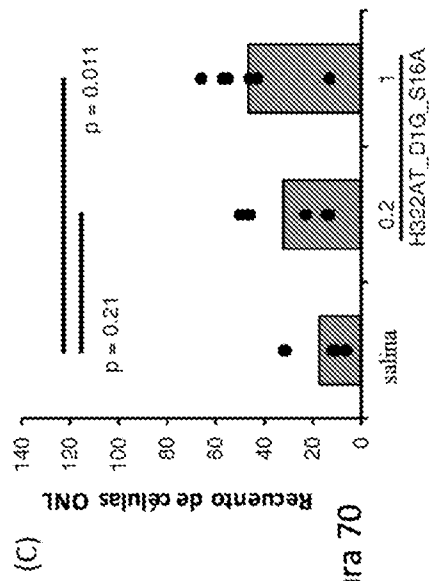
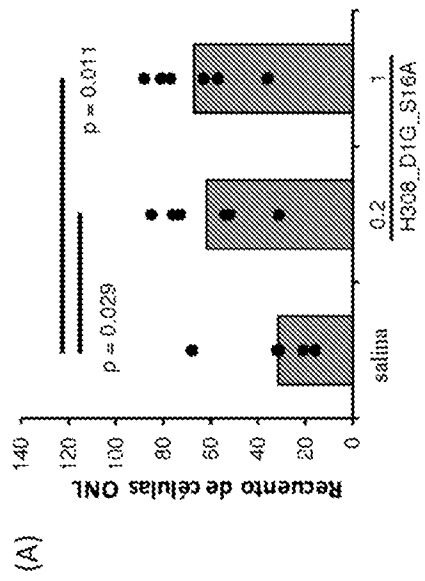
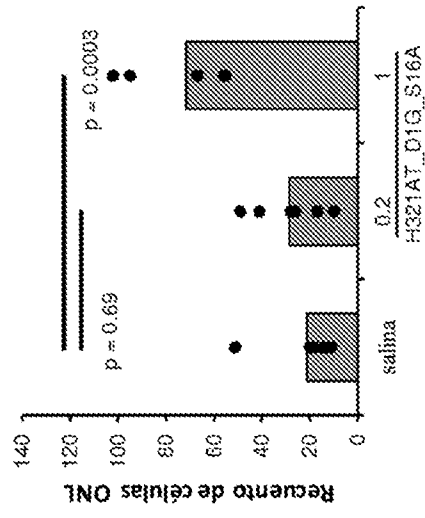


Figura 70

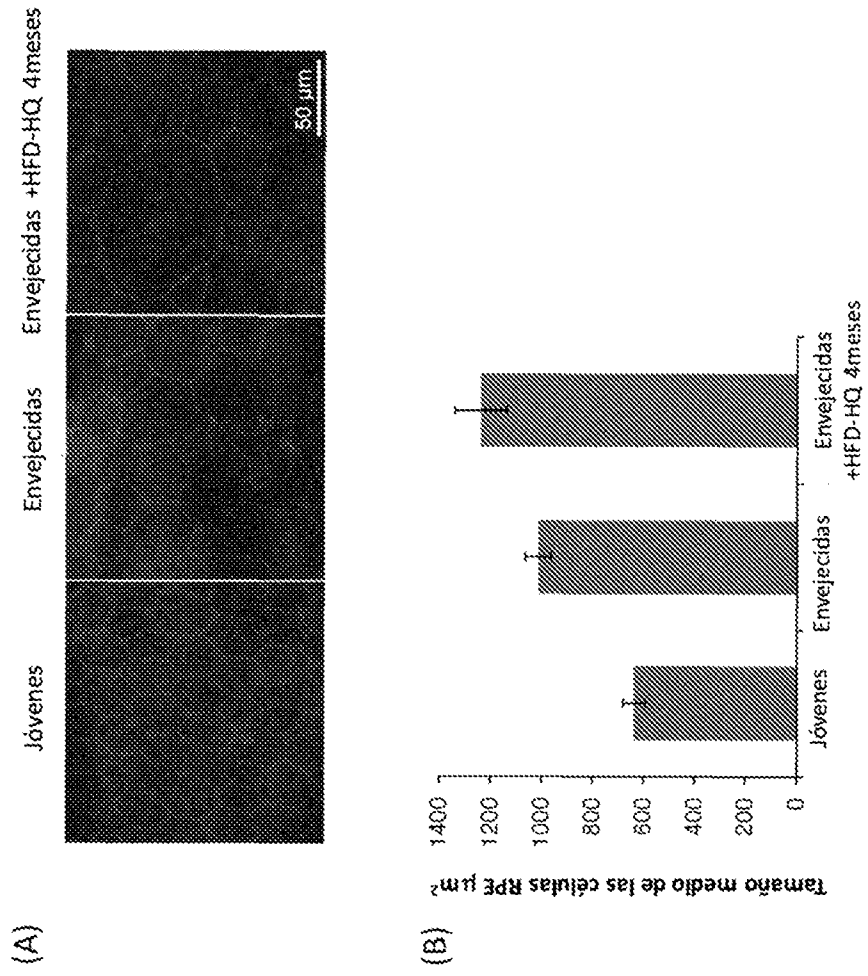


Figura 71

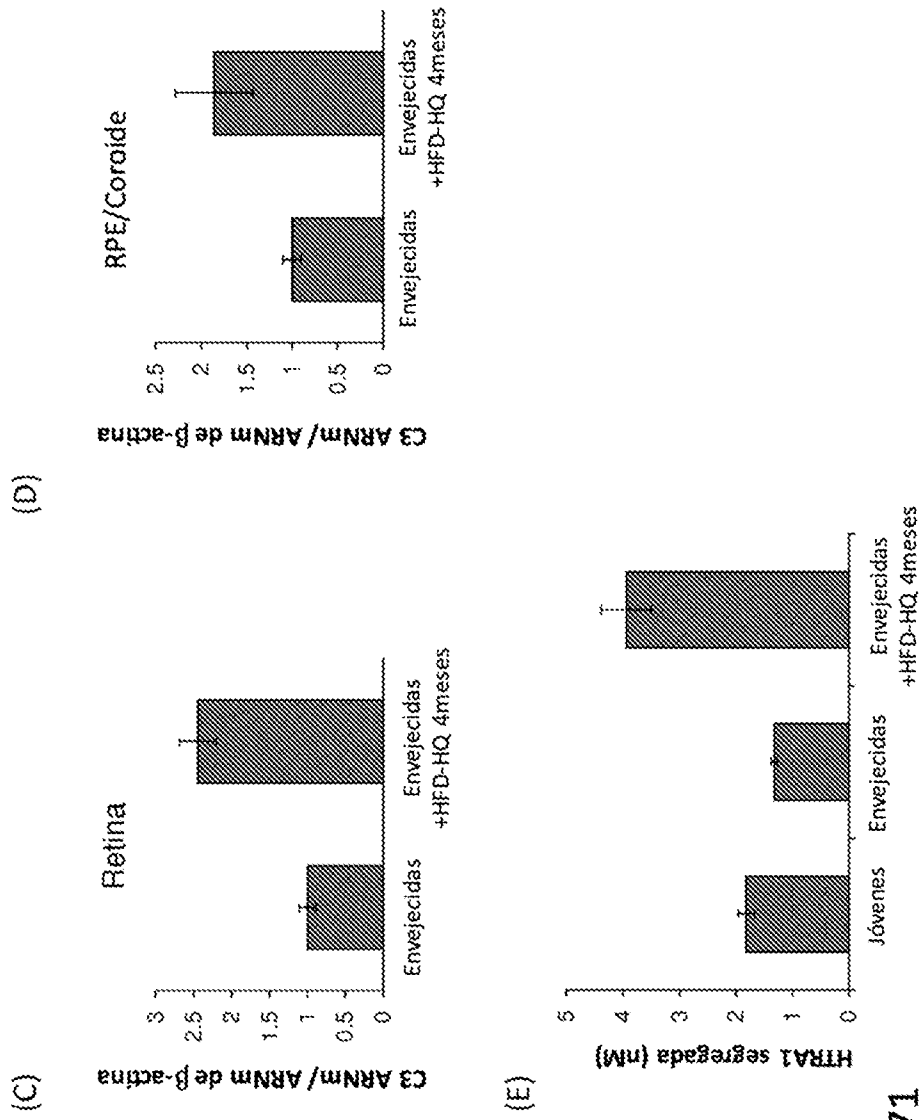


Figura 71

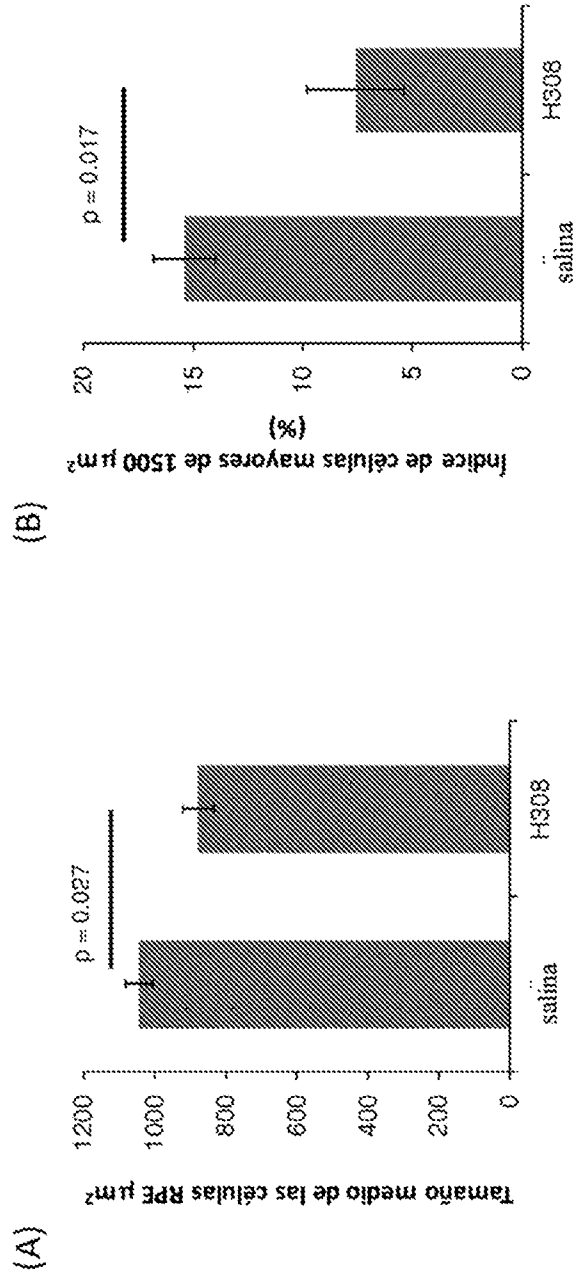


Figura 72

humano	1	GSGFIVSEEDGLIVTNAHVVTNK	RVKVELKNGATVEAKIKDQVDEKADIALIKIDHQCKLP	60
cino.	1	GSGFIVSEEDGLIVTNAHVVTNK	RVKVELKNGATVEAKIKDQVDEKADIALIKIDHQCKLP	60
conejo	1	GSGFIVSEEDGLIVTNAHVVTNK	RVKVELKNGATVEAKIKDQVDEKADIALIKIDHQCKLP	60
ratón	1	GSGFIVSEEDGLIVTNAHVVTNK	RVKVELKNGATVEAKIKDQVDEKADIALIKIDHQCKLP	60
rata	1	GSGFIVSEEDGLIVTNAHVVTNK	RVKVELKNGATVEAKIKDQVDEKADIALIKIDHQCKLP	60
humano	61	VLLLCRSSELNRPGEFVVAIGSPFSLQNTVITGIVSTTORGGKELGLRNSDMDYIQTDAIL		120
cino.	61	VLLLCRSSELNRPGEFVVAIGSPFSLQNTVITGIVSTTORGGKELGLRNSDMDYIQTDAIL		120
conejo	61	VLLLCRSSELNRPGEFVVAIGSPFSLQNTVITGIVSTTORGGKELGLRNSDMDYIQTDAIL		120
ratón	61	VLLLCRSSELNRPGEFVVAIGSPFSLQNTVITGIVSTTORGGKELGLRNSDMDYIQTDAIL		120
rata	61	VLLLCRSSELNRPGEFVVAIGSPFSLQNTVITGIVSTTORGGKELGLRNSDMDYIQTDAIL		120
humano	121	NYGNSGGPLVNLGDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL		161
cino.	121	NYGNSGGPLVNLGDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL		161
conejo	121	NYGNSGGPLVNLGDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL		161
ratón	121	NYGNSGGPLVNLGDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL		161
rata	121	NYGNSGGPLVNLGDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL		161

Figura 73

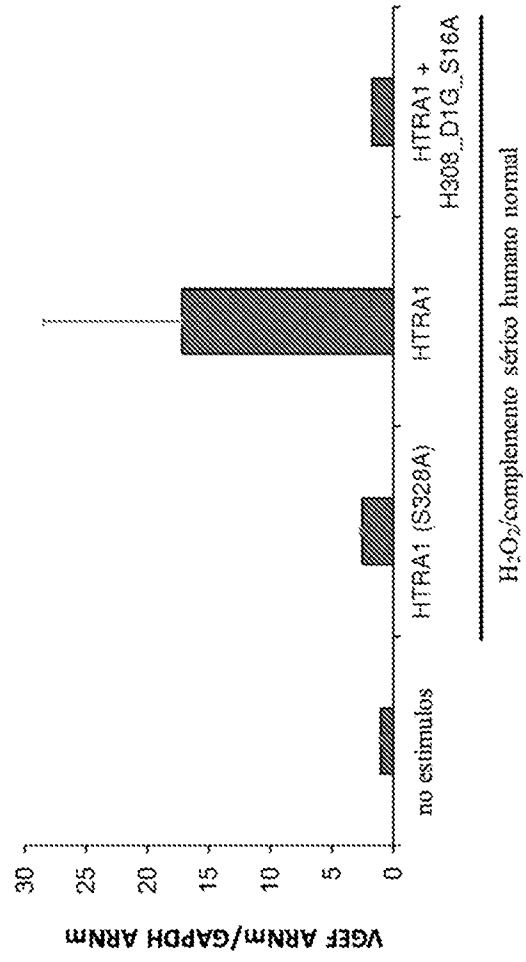


Figura 74

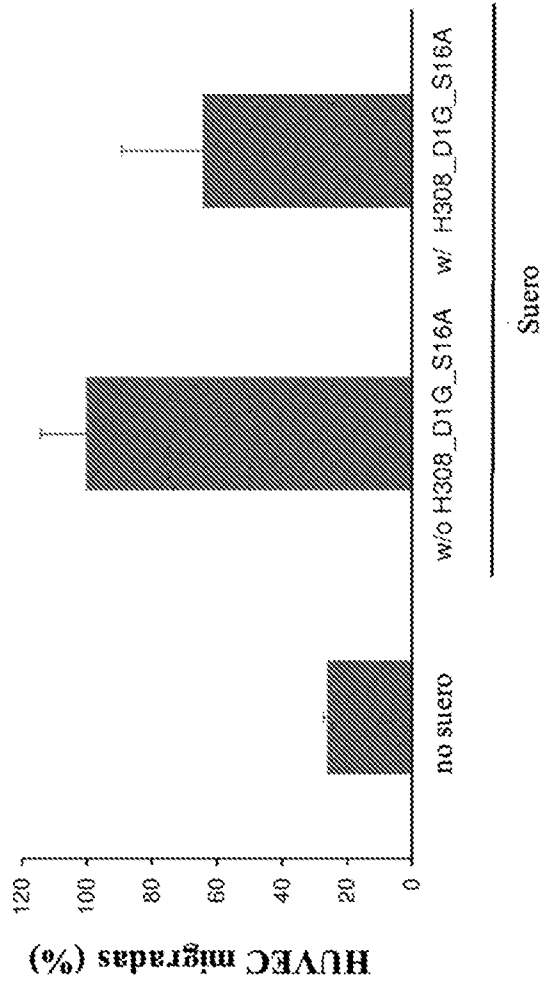


Figura 75

[Figura 76]

Cebador 21

CCATCATCAACTACGGCAACGCGGGCGGACCCCTC  
GTGAACC (SEQ ID NO: 55)

[Figura 77]

Cebador 22

GGTTCACGAGGGGTCCGCCCGCGTTGCCGTAGTTG  
ATGATCG (SEQ ID NO: 56)