

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de mayo de 2011 (12.05.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/054993 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 27/06* (2006.01)

Francesc [ES/ES]; Torres Vilaró 56, E-08859 Begues (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070710

(74) Mandatario: **SEGURA CÁMARA, Pascual**; Centre de Patents de la UB, Baldiri Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de noviembre de 2010 (04.11.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200902164
4 de noviembre de 2009 (04.11.2009) ES

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **UNIVERSIDAD DE BARCELONA** [ES/ES]; Centre de Patents de la UB, Baldiri Reixac 4, E-08028 Barcelona (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Séneca 2, E-28040 Madrid (ES). **INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER** [ES/ES]; Villarroel 170, E-08036 Barcelona (ES). **FUNDACIÓN RIOJA SALUD** [ES/ES]; Cibir, Piqueras 98, 3º, E-26006 Logroño (ES).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **MORALES FUCIÑOS, Miguel** [ES/ES]; Travessera de Gràcia 13, 3r 2a, E-08036 Barcelona (ES). **GASULL CASANOVA, Xavier** [ES/ES]; Sepúlveda 155, 4t 1a, E-08011 Barcelona (ES). **ACEBES VINDEL, Àngel** [ES/ES]; Armenteros 26, E-28039 Madrid (ES). **FERRÚS GAMERO, Alberto** [ES/ES]; Avda. Marsil 116, Urbanización El Golf, E-28290 Las Matas (ES). **PINTOR JUST, Jesús** [ES/ES]; Francisco Silvela 88, 7ºB, E-28002 Madrid (ES). **RABANAL ANGLADA,**

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: PEPTIDES FOR THE TREATMENT OF OCULAR HYPERTENSION AND/OR GLAUCOMA

(54) Título : PÉPTIDOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN OCULAR Y/O EL GLAUCOMA

(57) Abstract: The invention relates to peptide compounds with the amino acid sequence having formula (I): Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-(X)-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met- Asp-Met-Ser (I), wherein (X) is none, one or more amino acid spacer residues and pTyr is a phosphorylated tyrosine, and variants and derivatives of said compounds, which can be used in medicine to reduce intraocular pressure. The peptides or the pharmaceutical compositions containing same can be used for the treatment and/or prevention of ocular hypertension and/or glaucoma.

(57) Resumen: Compuestos peptídicos con la secuencia aminoacídica de fórmula (I): Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-(X)-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met- Asp-Met-Ser (I) donde (X) es ninguno, uno o más residuos de aminoácido espaciadores, y pTyr es una tirosina fosforilada, y variantes y derivados de los mismos, son útiles en medicina para reducir la presión intraocular. Los péptidos o las composiciones farmacéuticas que lo comprenden son útiles para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular y/o el glaucoma.



WO 2011/054993 A1

Péptidos para el tratamiento de la hipertensión ocular y/o el glaucoma

La presente invención se enmarca de manera general en el campo de la medicina y específicamente en el campo de la oftalmología. En particular, la
5 invención se refiere a compuestos para el tratamiento del glaucoma y/o la hipertensión ocular.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 El glaucoma se caracteriza por producir una lesión en la cabeza del nervio óptico acompañada por una disminución en el campo visual normal. Una presión intraocular (en adelante IOP) elevada constituye un factor de riesgo para la pérdida de campo visual glaucomatosa. Alrededor de 67 millones de personas en el mundo tienen glaucoma, y entre 5 y 8 millones de ellas son
15 ciegas. Según algunas estimaciones, unos 100 millones más de personas tienen IOP elevada y estarían en riesgo de padecer importantes problemas en la visión.

Aunque las causas del glaucoma no se conocen completamente, sus
20 síntomas, en la mayoría de los casos, incluyen una IOP elevada que puede ser causada por sobreproducción o por una eliminación inadecuada del humor acuoso. La elevación de la IOP se asocia con manifestaciones clínicas características de la neuropatía óptica glaucomatosa. La disfunción del nervio óptico podría ser el resultado de los cambios producidos en la presión
25 a nivel de la estructura de la cabeza del nervio óptico y/o de un bajo aporte sanguíneo en la cabeza del nervio óptico y en la retina. La ausencia de tratamiento o un tratamiento inadecuado del glaucoma pueden llevar a una pérdida significativa de visión o a ceguera total.

30 En los casos en los que la cirugía no está aconsejada, diversos fármacos son útiles para el tratamiento del glaucoma. Estos incluyen: mióticos (p.ej. pilocarpina, carbachol, e inhibidores de la acetilcolinesterasa); simpaticomiméticos (p.ej. epinefrina, dipivalilepinefrina y apraclonidina); beta-
35 bloqueantes (p.ej. betaxolol, levobunolol y timolol); e inhibidores de la anhidrasa carbónica (p.ej. dorzolamida cloridrato, acetazolamida, metazolamida y etoxzolamida). Se acepta que los mióticos y simpaticomiméticos disminuyen la IOP incrementando el flujo de evacuación

del humor acuoso, mientras que los beta-bloqueantes y los inhibidores de la anhidrasa carbónica disminuyen la IOP al reducir la formación de humor acuoso. Los cuatro tipos de fármacos presentan potencialmente serios efectos secundarios. Los mióticos como la pilocarpina pueden producir visión
5 borrosa y otros efectos secundarios en la visión, lo cual conduce a un malestar del enfermo o al abandono del tratamiento. Los inhibidores de la anhidrasa carbónica pueden producir también importantes efectos secundarios que afectan al bienestar del paciente y/o al abandono del tratamiento. Además, al menos un beta-bloqueante, el timolol, se ha asociado
10 con frecuencia a importantes efectos secundarios pulmonares que se atribuyen a su efecto en los receptores beta-2 presentes en el tejido pulmonar. Recientemente, los análogos de prostaglandina se han mostrado útiles en el tratamiento del glaucoma por vía tópica. Estos compuestos disminuyen la IOP al incrementar el flujo de evacuación del humor acuoso
15 por la vía uveoescleral.

En consecuencia, existe una continua necesidad de terapias alternativas para controlar la IOP elevada asociada al glaucoma, intentando disminuir los efectos adversos de las terapias actuales.

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores proporcionan una nueva aproximación para el tratamiento del glaucoma y la hipertensión ocular que implica el uso de compuestos
25 peptídicos, o sus sales farmacéuticamente aceptables, seleccionados del grupo que consiste en: (i) un péptido con la secuencia de aminoácidos de fórmula (I):

Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-(X)-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met-
30 Asp-Met-Ser (I)

donde (X) es ninguno, uno o más residuos de aminoácido espaciadores, y pTyr es una tirosina fosforilada; (ii) una variante del péptido de fórmula (I) que tiene sustitución, eliminación y/o adición de residuos de aminoácido a lo
35 largo de la secuencia de aminoácidos, y/o que tiene otra adición de 1 a 10 residuos de aminoácido en los extremos N y/o C terminal de la secuencia; y (iii) un derivado del péptido de fórmula (I) que tiene modificaciones químicas

en los residuos de aminoácido. Los compuestos peptídicos tienen como mínimo un 80% de identidad de secuencia con el péptido de SEQ ID NO: 1, y tienen la capacidad de activar la fosfatidilinositol-3-kinasa ("phosphatidylinositol-3-kinase", Pi3K).

5

Los compuestos peptídicos de la invención muestran importantes diferencias con los fármacos comerciales utilizados normalmente en el tratamiento de la hipertensión ocular. El péptido con secuencia SEQ ID NO: 1 presenta mayores efectos que cualquiera de los fármacos comerciales probados:

10 reducción de la IOP de un 49% versus un 35.3% obtenida con timolol (Timoftol®). La aplicación de este péptido implica una reducción máxima de la IOP mayor y de efecto duradero. Los compuestos peptídicos de la invención no actúan estimulando un receptor (a diferencia del carbacol), ni activando un receptor tirosina kinasa (a diferencia del factor de crecimiento derivado de

15 plaquetas o platelet-derived growth factor, PDGF), ni antagonizando un receptor (a diferencia del timolol), ni tampoco inhibiendo una enzima (a diferencia de la dorzolamida). Por el contrario, los compuestos peptídicos de la invención actúan a través de la activación de Pi3K, reclutando el complejo Pi3K hacia la membrana e induciendo su activación. Esto representa una

20 nueva diana farmacológica no descrita previamente para el control de la hipertensión ocular.

De esta manera, la presente invención se refiere a compuestos peptídicos con la secuencia de aminoácidos de fórmula (I), así como variantes o

25 derivados de dicho péptido.

Son parte de la presente invención, variantes del péptido de fórmula (I), sujeto a sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos seleccionados de los

30 aminoácidos naturales o de aminoácidos no naturales / modificados. La sustitución de aminoácidos puede ser conservativa (i.e. sustituidos por otros residuos con propiedades fisicoquímicas similares) o no-conservativa (i.e. sustituidos por otros residuos con diferentes propiedades fisicoquímicas) pero sin implicar una alteración sustancial de la estructura primaria. El

35 péptido puede tener otra adición de entre 1 y 10 residuos de aminoácido añadidos en los extremos N y/o C terminal de la secuencia. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones se seleccionan de manera que no

afecten a la actividad del péptido.

También son adecuados para el tratamiento ocular descrito de acuerdo con la invención, los derivados del péptido de fórmula (I) que tienen

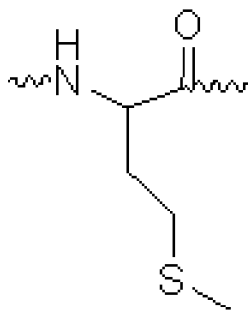
- 5 modificaciones químicas en los residuos de aminoácido. Derivados particularmente adecuados son aquéllos amidados, acetilados, sulfatados, fenilados, alquilados fosforilados, glicosidados, oxidados o modificados con polietilenglicol. Las modificaciones se seleccionan de manera que no afecten a la actividad del péptido.

10

Modificaciones preferidas para el péptido de fórmula (I) son la amidación del extremo C-terminal para prevenir la degradación del mismo; la sustitución del ácido aspártico y la glicina (posiciones 14 y 15 de la fórmula (I)) para evitar la hidrólisis espontánea; y la sustitución de la metionina (fórmula (II)) por

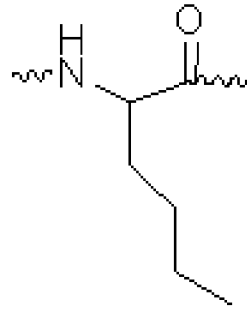
15 norleucina (fórmula (III)) para evitar la oxidación espontánea de la metionina. Así, en una realización particular de la invención, el compuesto peptídico tiene una o las dos Met sustituidas por norleucina (Nle).

20



25

fórmula (II)

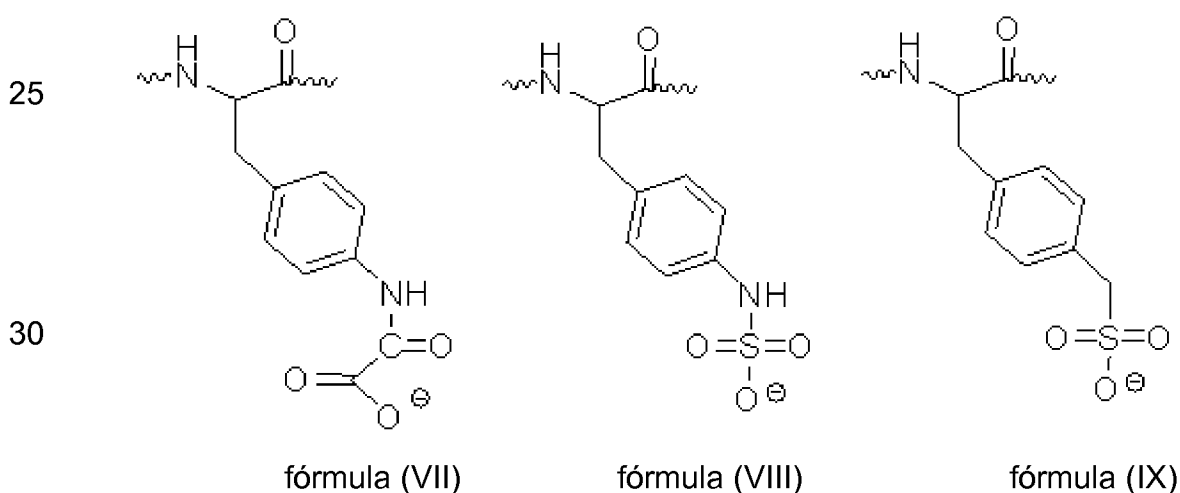
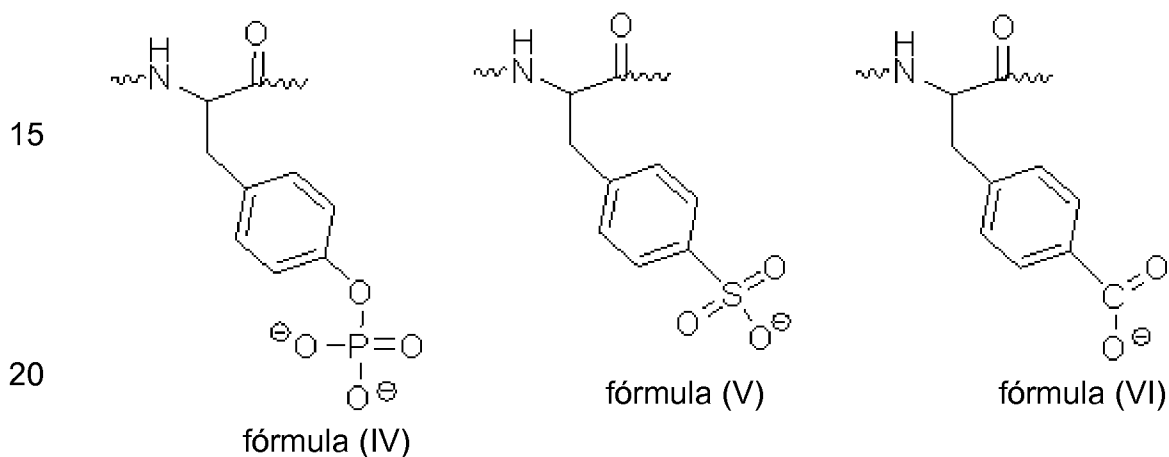


fórmula (III)

- Los derivados y variantes del péptido de fórmula (I) tienen como mínimo un 80% de identidad en su secuencia con el péptido de SEQ ID NO: 1, y tienen
- 30 la capacidad de activar Pi3K. Esta actividad se establece preferentemente en un ensayo donde se miden los niveles de fosforilación de Akt. Akt o PKB (proteína kinasa B) es un efector de Pi3K que se encuentra más abajo en la cascada de señalización. En la descripción de realizaciones particulares se describe un ensayo adecuado. Los niveles basales de Akt fosforilada (p-Akt)
- 35 son muy bajos, por lo que la activación de Akt y, por consiguiente, la activación Pi3K significan un incremento de este nivel basal. El porcentaje de activación se calculó como el nivel de p-Akt después del tratamiento

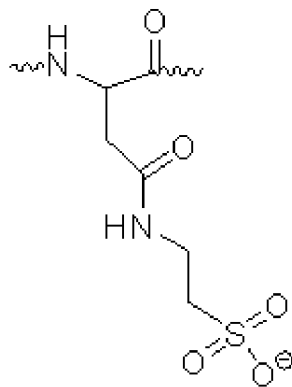
comparado con el nivel de p-Akt en condiciones control. Tras 30 minutos de tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 1 se logró un incremento del 50% respecto al nivel basal de p-Akt, y un 55% tras 180 min.

- 5 Variantes particularmente adecuadas son aquéllas en las que pTyr (fórmula (IV)) ha sido sustituido por un birradical seleccionado del grupo que consiste en 4-sulfofenilalanina (fórmula (V)), 4-carboxi-L-fenilalanina (fórmula (VI)), N-(oxalil)-4-aminofenilalanina (fórmula (VII)), N-(sulfo)-4-aminofenilalanina (fórmula (VIII)), 4-(sulfometil)-fenilalanina (fórmula (IX)), N-(2-sulfoetil)-L-asparagina (fórmula (X)), N-(sulfometil)-L-asparagina, 4-(fosfonometil)-L-fenilalanina (fórmula (XI)), N^δ-oxalil-ornitina y S-(2-sulfoetil)cisteína.



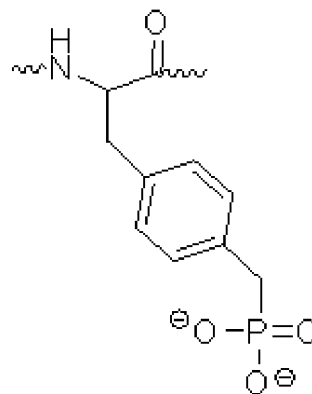
6

5



10

fórmula (X)



fórmula (XI)

Las fórmulas indican la forma aniónica del residuo de aminoácido.

Estas variantes fueron encontradas usando el péptido de SEQ ID NO: 1
como molécula de referencia en un cribado de análogos potenciales del
péptido. El cribado tuvo en cuenta en primer lugar mimetizar las propiedades
físico-químicas del péptido. Puesto que el campo molecular de una molécula
representa su interacción con otra entidad (por ejemplo, una proteína), se
espera que dos moléculas con un campo molecular similar tengan la misma
función, en este caso, una función biológica. Después, para conseguir un
mejor análisis, las moléculas mejores del primer cribado, fueron sometidas a
un procedimiento de acomplamiento (docking) considerando las propiedades
del target. De esta manera, las variantes encontradas mimetizan el péptido
de SEQ ID NO: 1.

25

En otra realización particular, el compuesto peptídico tiene la secuencia de
aminoácidos de fórmula (I) donde (X) es ninguno, uno o más residuos de
aminoácido espaciadores, y pTyr es una tirosina fosforilada. En una
realización más particular, (X) es un residuo de glicina. Más particularmente,
el compuesto peptídico tiene la secuencia SEQ ID NO: 1.

30

En otras realizaciones particulares, el compuesto peptídico tiene una
secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID
NO: 2-22.

35

Los compuestos peptídicos de la invención pueden ser sintetizados por
cualquier método análogo a los detallados aquí, incluyendo, pero no

limitándose a, síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida, expresión de proteína por células transformadas, escisión de un polipéptido sintético o semi-sintético, o una combinación de estos métodos.

- 5 Los aminoácidos que componen la secuencia pueden tener configuración L o D. Aquéllos con configuración D son más caros, pero más resistentes a la degradación por proteasas.

- 10 Compuestos peptídicos de acuerdo con la presente invención, en forma de sales farmacéutica y/o biológicamente aceptables como la sal de sodio, de potasio, de calcio, de magnesio o sales ácidas de adición, también pueden ser obtenidos por métodos análogos a los descritos aquí. Ejemplos de estas últimas sales incluyen sales de ácidos inorgánicos (ej. ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico) y de ácidos orgánicos (ej. ácido acético, 15 ácido propiónico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido metanosulfónico).

- Otro aspecto de la invención se refiere a los compuestos peptídicos de la invención para uso en medicina. Otro aspecto de la invención se refiere al 20 uso de los compuestos peptídicos de la invención para la fabricación de un medicamento para reducir la presión intraocular. También se pueden usar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular y/o el glaucoma. Este aspecto puede expresarse también como referido a un método para el tratamiento y/o la prevención del 25 glaucoma y/o la hipertensión ocular en un mamífero, incluyendo a un humano, donde se administra una cantidad efectiva del compuesto peptídico de la invención al ojo afectado de dicho mamífero o humano.

- El compuesto peptídico de la invención podría adicionalmente ser combinado 30 o unido a otras secuencias como secuencias de histidinas para permitir la purificación del péptido, o a secuencias antigénicas como la hemaglutinina, T7 o myc, para reconocer el compuesto peptídico.

- Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que 35 comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto peptídico de la invención, junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, los excipientes

farmacéuticamente aceptables son apropiados para la administración tópica oftálmica, es decir, apropiados para el uso en contacto con los tejidos oculares sin inducir toxicidad, irritación, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica o similar.

5

La cantidad de compuesto peptídico de la invención a administrar puede ser determinada sin demasiada experimentación por una persona experta en la materia. Debido a la transducción directa del compuesto peptídico tras su aplicación corneal, la cantidad efectiva necesaria para tener un efecto terapéutico es menor que con otros fármacos antiglaucomatosos. En general, para administración tópica se usan cantidades entre 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, y preferentemente 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Como podrán apreciar los expertos en la materia, las composiciones pueden prepararse en diferentes formas de dosificación adecuadas para aplicación tópica oftálmica, incluyendo soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos y esprays.

Adicionalmente, a las formas oftalmológicas de aplicación tópica, el compuesto peptídico se podrá administrar a través de otras formas, como son la inyección directa en la cámara anterior del ojo, o por cualquier tipo de sistema de liberación lenta.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender adicionalmente componentes que permitan una liberación controlada o mayor confort. Estos componentes incluyen polímeros mucomiméticos, geles espesantes basados en polisacáridos o sustratos transportadores de fármacos finamente divididos. Además las composiciones de la invención pueden comprender diversos ingredientes como conservantes antimicrobianos y agentes tonificantes para ajustar la osmolaridad de las composiciones. Dependiendo de la enfermedad, las composiciones pueden comprender el compuesto peptídico como agente único para tratamiento de la hipertensión ocular y el glaucoma, o bien combinaciones de varios de estos compuestos, o combinaciones con otros agentes terapéuticos.

35

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los comúnmente entendidos por

una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir
5 otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes realizaciones particulares y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos
10 de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de las realizaciones particulares y preferidas aquí descritas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15

La FIG. 1 muestra el efecto sobre la IOP después de una sola aplicación de una gota de 10 μ l del péptido de SEQ ID NO: 1, a concentración de 0.5 μ g/ μ l. Tal como la figura indica, la máxima reducción de la IOP se obtuvo después de cinco horas. "t (h)" significa tiempo en horas; "pep" significa péptido; "con"
20 significa control salino. La FIG.1 se refiere a la sección "Aplicación única" de la descripción de realizaciones particulares.

La FIG. 2 muestra el efecto sobre la IOP después de aplicar 10 ng de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en un volumen final de 10 μ l. IOP se representa como % del control. "t (h)" significa tiempo en horas; "ve"
25 significa vehículo. La FIG. 2 se refiere a la sección "Comparación del Péptido con PDGF" de la descripción de realizaciones particulares.

La FIG. 3 muestra una gráfica de los niveles de IOP durante un tratamiento de cinco días con el péptido de SEQ ID NO: 1. Las flechas indican el tiempo de las diferentes aplicaciones. "t (h)" significa tiempo en horas; "pep" significa péptido. La FIG. 3 se refiere a la sección "Aplicación crónica" de la
30 descripción de realizaciones particulares.

35 La FIG. 4 muestra el incremento de los niveles de p-Akt inducidos por el péptido de SEQ ID NO: 1. La capacidad del péptido para activar la vía de señalización de Pi3K-Akt-GSK3 se cuantificó midiendo los niveles de p-Akt

- en la posición Ser-473 empleando una línea celular de gliomas humano SH-SY5Y. Las células se mantuvieron en ayuno de suero durante 16 horas antes de la adición del péptido. La cuantificación muestra que los niveles de p-Akt incrementaron hasta un máximo después de 60-120 minutos y permanecieron constantes durante el intervalo de tiempo examinado (6 horas). "t (min)" significa tiempo en minutos. La FIG. 4 se refiere a la sección "Cuantificación de la actividad de Pi3K mediante Western Blot" de la descripción de realizaciones particulares.
- 10 La FIG. 5 muestra la reducción de la IOP ("IOP red" en mm Hg) durante un tratamiento de cinco días consecutivos con El Péptido a los ojos izquierdos de las ratas (LE) y con solución salina (control) a los ojos derechos (RE). 1, 2, 3, 4 y 5 son los días de tratamiento. Las medidas de tratamiento se indican con barras de patrón rayado mientras que las medidas control con barras
- 15 lisas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

Animales

- 20 Se mantuvieron conejos blancos de Nueva Zelanda, que pesaban 2-2.5 kg, en jaulas individuales, con comida y agua ad libitum tal como se describe anteriormente (cf. M. Morales et al., "Hypotensive effect of proflin on rabbit intraocular pressure", Eur J Pharmacol 2007, vol. 567, pp. 145-8). Los
- 25 animales empleados se estabularon siguiendo un ciclo controlado de 12 h/12 h luz/oscuridad. Todos los protocolos empleados cumplían con el ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research y con la European Communities Council Directive 86/609/EEC.

30 Formulación del péptido y método de administración

- El péptido con secuencia: Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala Gly-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met-Asp-Met-Ser (SEQ ID NO: 1) será llamado a continuación "El Péptido". Se obtuvo mediante síntesis peptídica en fase
- 35 sólida.

El Péptido se formuló en solución isotónica salina y se usó a una concentración final de 0.5 µg/µl. El Péptido se aplicó unilateralmente a la córnea a un volumen fijo de 10 µl. El ojo contralateral recibió el mismo volumen de solución control (NaCl 0.9%, vehículo). Dado que la tonometría puede producir cierto malestar en los conejos, las córneas se anestesiaron aplicando 10 µl de una solución 1:10 (v:v) de oxibuprocaina / tetracaina (4 mg y 1 mg respectivamente, de Alcon Cusí, Barcelona, España).

La IOP se midió una vez cada 30 minutos durante la primera hora y después una vez cada hora. El tiempo de instilación se consideró tiempo 0.

Los experimentos se realizaron siguiendo un protocolo ciego: el investigador no recibió ninguna información sobre la naturaleza del agente (Péptido o vehículo). Las mediciones de IOP se realizaron con un tonómetro de contacto Tonopen® XL a nivel basal (pretratamiento) y en los tiempos indicados después de la instilación del compuesto. La IOP se registró durante 8 horas, para estudiar el desarrollo temporal de los efectos. Durante un día de experimentación, solamente se probó una dosis, la cual se lavó al menos durante dos días entre dosis.

Aplicación única

Para estudiar los efectos del Péptido en la IOP de los conejos, se ensayó una aplicación única siguiendo las condiciones descritas antes. Se aplicó sólo una gota (10 µl) a una concentración de 0.5 µg/µl de manera unilateral. Las mediciones de la IOP comenzaron 30 minutos antes de la instilación del agente. El tiempo cero se estableció como el tiempo de aplicación del agente. Posteriormente las medidas se realizaron cada hora.

La aplicación del Péptido indujo una reducción significativa de la IOP que fue máxima cuatro horas después de la instilación del compuesto. La reducción promedio de la IOP a partir de 8 animales distintos fue de un $49.5 \pm 1.8\%$. La reducción de la IOP se mantuvo significativamente por debajo de los niveles control durante las siguientes cuatro horas (n=8; FIG. 1).

Como control, el mismo experimento se realizó ensayando independientemente únicamente solución salina. En ninguna condición la IOP mostró cambios significativos (n=8, FIG. 1).

5 Comparación del Péptido con fármacos comerciales

La reducción de la IOP obtenida con El Péptido, indica un mejor comportamiento que el de los fármacos hipotensivos comerciales comúnmente empleados en el tratamiento de la presión intraocular. Para este fin, el efecto del Péptido se comparó con tres fármacos diferentes con tres mecanismos farmacológicos distintos. Se ensayaron los fármacos dorzolamida (Trusopt[®]), timolol (Timofol[®]) y pilocarpina (Colircusí pilocarpina) respecto a su capacidad para regular la IOP (n=6), y los resultados se compararon con los del Péptido. Todos los fármacos se ensayaron aplicando un volumen de 40 µl. La siguiente tabla resume los resultados. El porcentaje indica la máxima reducción de la IOP.

TABLA 1

Compuesto	Porcentaje de reducción en la IOP
Péptido	49%
dorzolamida	18.56%
timolol	35.3%
pilocarpina	25.8%

20 Comparación del Péptido con PDGF

Ya que El Péptido imita el dominio intracelular de la forma activada del receptor de PDGF, teóricamente, debería producir unos resultados similares a los de la aplicación de PDGF. Para este propósito se estudiaron los cambios en los niveles de IOP después de una aplicación corneal de 10 ng de PDGF (en un volumen final de 10 µl).

Tal como indica la FIG. 2, la aplicación de PDGF sólo disminuyó los niveles de IOP hasta un 20%, y la reducción sólo duró 3-4 horas. En resumen, el péptido de la invención presenta un mejor rango de efectos, reducción de la IOP máxima y unos efectos más duraderos que los obtenidos tras la aplicación de PDGF.

Aplicación crónica

Para estudiar los efectos de una exposición repetida del Péptido se realizó un experimento de tratamiento crónico. Para este fin, se trataron cinco animales cada día con una sola dosis del Péptido durante un periodo de cinco días. La IOP se midió cada día después de 5 y 8 horas de la instilación. Los resultados (FIG. 3) indican que la aplicación repetida siempre induce el mismo grado de disminución de la IOP, sin desensibilizarse. Es importante notar que los niveles basales de IOP medidos durante el segundo y siguientes días no se recuperaron completamente, indicando una ventana de efecto de tiempo mayor de 24 horas.

Análisis de los datos

Los valores numéricos se representan como media $\pm$ error estándar de la media (ESM). Las medias entre grupos se compararon usando el test t-Student (no pareado, dos colas) con un 5% de significancia.

20 Cuantificación de la actividad de Pi3K mediante Western Blot

La capacidad del Péptido para activar Pi3K se monitorizó midiendo los niveles de fosforilación de la proteína Akt, un efector de Pi3K. Se trataron cultivos de la línea celular de un glioma humano (SH-SY5Y) en ayuno de suero, con una concentración de 50 μ g/ml del Péptido. Los niveles de p-Akt se cuantificaron a 10, 30, 120, 180 y 360 minutos después de la aplicación del péptido. Las células se cultivaron en placas de 12 mm de diámetro y se lavaron dos veces con PBS (4 °C). Se rasparon y lisaron con 300 μ l de solución tampón de lisis conteniendo: 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT y 0.01% bromofenol. Se recogieron los lisados celulares y se calentaron a 85 °C durante 3 minutos. Se sonicaron durante 5 minutos y finalmente fueron clarificados por centrifugación a 17.000 g. Los sobrenadantes se guardaron congelados a -80 °C. Las muestras se pasaron por un gel SDS-PAGE al 12% y Western blotting empleando dos anticuerpos específicos: una contra Akt y un segundo contra p-Akt. La señal se detectó empleando un sistema de detección quimioluminiscente. Los niveles de actividad se expresan como la relación de la densidad óptica de p-Akt

dividida por su correspondiente nivel total de Akt. El Péptido inducía un incremento estable de p-Akt hasta un 50 % de activación después de 30 minutos y 55 % después de 180 minutos (ver FIG. 4).

5 Evaluación in vivo de la reducción de la IOP en un modelo de glaucoma inducido

El objetivo del estudio era evaluar la reducción de la IOP en un modelo animal de glaucoma inducido. El modelo seleccionado fue la cauterización de
10 tres venas epiesclerales que causa una extensión de muerte celular equivalente al glaucoma en humano.

Se utilizaron en este estudio ratas hembra de tres años Sprague-Dawley que pesaban aproximadamente 250 g. Para todas las ratas, se sometieron los
15 ojos izquierdos (LE) a cauterización de las venas epiesclerales (CEV) siguiendo el protocolo descrito en J.H. Urcola et al., "Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death", Experimental Eye Research 2006, vol. 83, pp. 429-37. Brevemente, se aislaron de los tejidos de
20 alrededor, dos venas epiesclerales dorsales localizadas cerca del músculo rectus superior, y una vena epiescleral temporal cerca del músculo rectus lateral. Se aplicó una cauterización específica y precisa a la vena seleccionada teniendo cuidado en no provocar daño térmico al resto de tejidos vecinos. Después del procedimiento, se aplicó a la superficie del ojo
25 un ungüento antibiótico-esteroideo que contenía cloramfenicol y dexametasona. No se aplicó cirugía a los ojos derechos (RE), que fueron usados como control.

Medida de la presión intraocular: las medidas de IOP se realizaron con un
30 tonómetro de contacto Tonopen® XL a nivel basal (pretratamiento) y en los tiempos indicados después de la instilación del compuesto. Las ratas se mantuvieron despiertas (no anestesiadas) y se aplicó una sola gota de anestésico local en el ojo antes de la medida. El responsable de coger las medidas siempre era la misma persona para evitar posibles modificaciones
35 en la metodología de medida y para evitar el estrés de la rata. Las medidas fueron cogidas siempre a la misma hora del día. La primera medida empezó a las 9 a.m. y la segunda después del tratamiento empezó a la 13h. Las

medidas fueron cogidas en el mismo orden de las ratas para mantener los tiempos entre medidas.

Metodología de tratamiento: las IOPs de LE y RE se midieron a las 9 a.m.

- 5 Inmediatamente después, se instiló una gota de 10 µl de solución salina al RE y 10 µl del Péptido al LE: Cuatro horas después de la instilación, se midieron todas las ratas para los dos ojos siguiendo el mismo orden. Al día siguiente, se midieron las IOPs a las 9 a.m. antes de aplicar la nueva gota a la rata. Estas medidas, 24 h después de las primeras gotas, sirven para
- 10 saber si el efecto del tratamiento se mantiene a largo plazo (24 h). El tratamiento se aplicó durante cinco días consecutivos.

Controles: el RE de cada rata se utilizó como control para comprobar que no se producía efecto en la IOP por el vehículo (solución salina).

15

Conclusión: La FIG. 5 muestra que la aplicación del Péptido indujo una reducción significativa de la IOP 4 horas después de la instilación del Péptido. La reducción del nivel de IOP permaneció significativamente por debajo del valor control durante todos los días estudiados.

REVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico, o sus sales farmacéuticamente aceptables, seleccionado del grupo que consiste en:

5

(i) un péptido con la secuencia de aminoácidos de fórmula (I):

Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-(X)-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met-Asp-Met-Ser (I)

10

donde (X) es ninguno, uno o más residuos de aminoácido espaciadores, y pTyr es una tirosina fosforilada;

(ii) una variante del péptido de fórmula (I) que tiene sustitución, eliminación y/o adición de residuos de aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos, y/o que tiene otra adición de 1 a 10 residuos de aminoácido en los extremos N y/o C terminal de la secuencia; y

15

(iii) un derivado del péptido de fórmula (I) que tiene modificaciones químicas en los residuos de aminoácido;

20

donde el compuesto peptídico tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia con el péptido de SEQ ID NO: 1, y tiene la capacidad de activar la fosfatidilinositol-3-kinasa (Pi3K).

25

2. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, que es una variante donde pTyr ha sido sustituido por un birradical seleccionado del grupo que consiste en 4-sulfofenilalanina, 4-carboxi-L-fenilalanina, N-(oxalil)-4-aminofenilalanina, N-(sulfo)-4-aminofenilalanina, 4-(sulfometil)-fenilalanina, N-(2-sulfoetil)-L-asparagina, N-(sulfometil)-L-asparagina, 4-(fosfonometil)-L-fenilalanina, N^δ-oxalil-ornitina y S-(2-sulfoetil)cisteína.

30

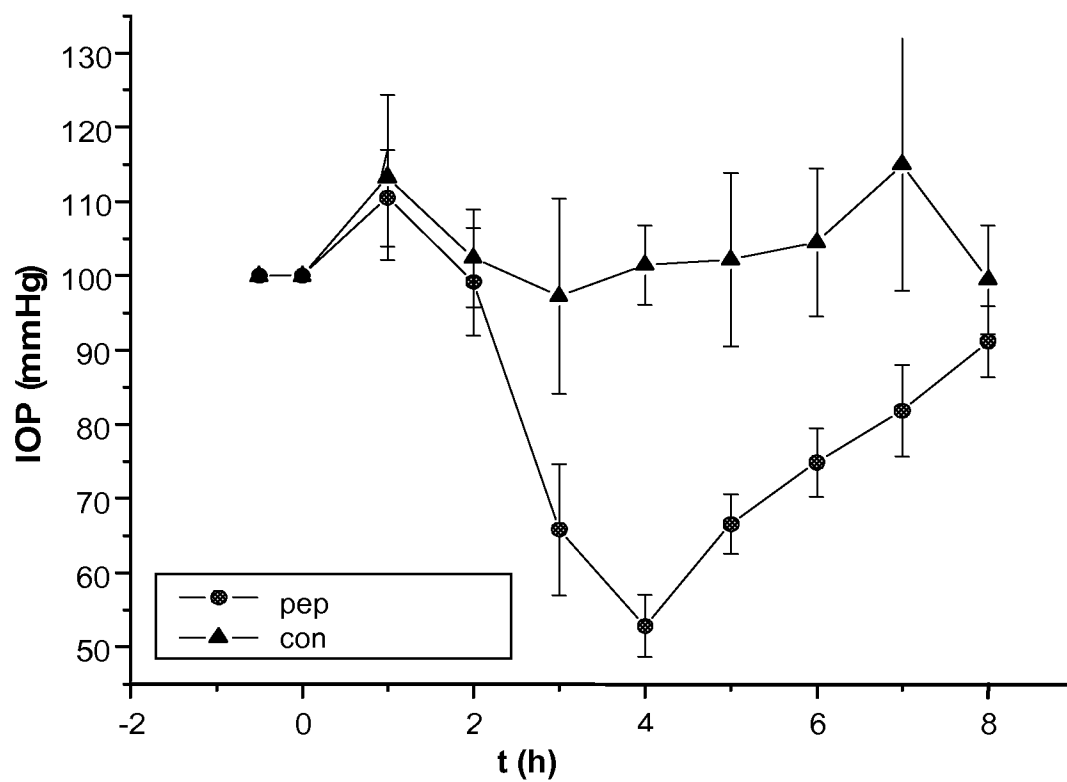
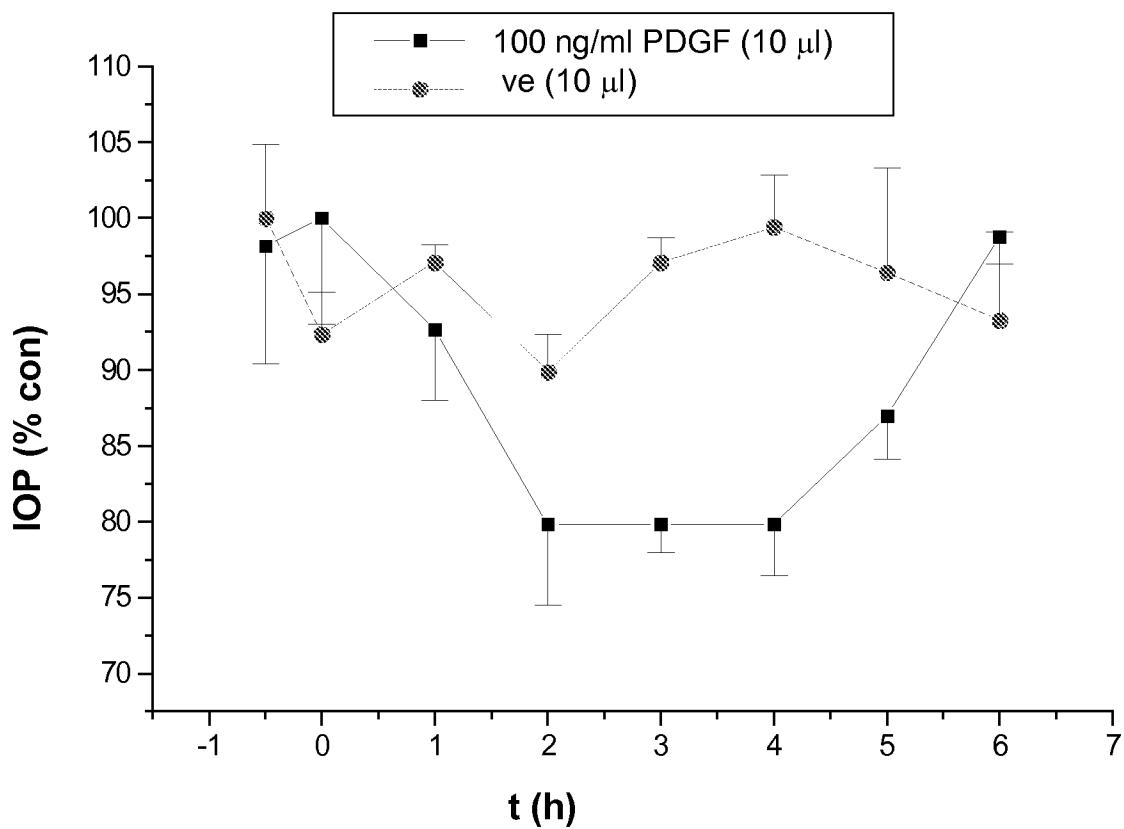
3. Compuesto peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde una o las dos Met han sido sustituidas por norleucina (Nle).

35

4. Compuesto peptídico según la reivindicación 1, que es un péptido con la secuencia de aminoácidos de fórmula (I) donde (X) es ninguno, uno o más residuos de aminoácido espaciadores, y pTyr es una tirosina fosforilada.
- 5 5. Compuesto peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde (X) es un residuo de glicina.
6. Compuesto peptídico según la reivindicación 5, que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 7. Compuesto peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-22.
- 15 8. Compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en medicina.
9. Compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en la reducción de la presión intraocular.
- 20 10. Compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular y/o el glaucoma.
- 25 11. Uso del compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para la fabricación de un medicamento para la reducción de la presión intraocular.
- 30 12. Uso del compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hipertensión ocular y/o el glaucoma.
- 35 13. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto peptídico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, donde los excipientes farmacéuticamente aceptables son apropiados para la administración tópica oftálmica.

1/4

FIG. 1**FIG. 2**

2/4

FIG. 3

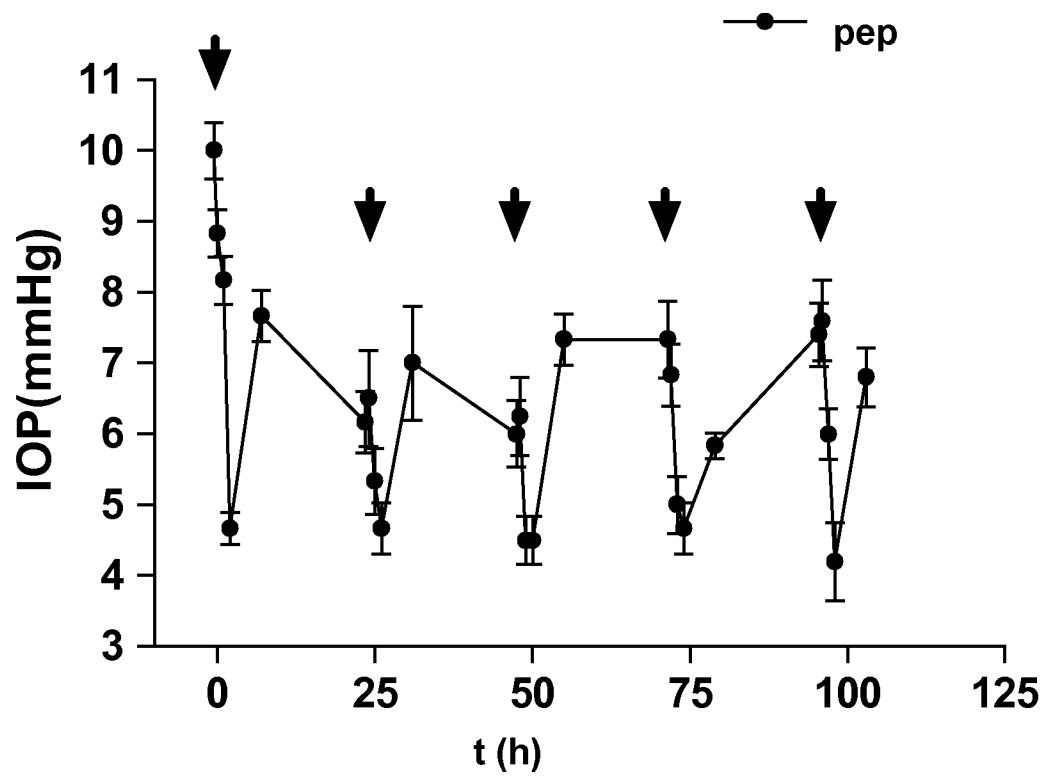
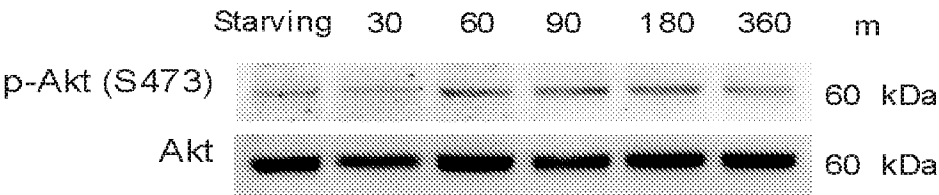


FIG. 4

A



B

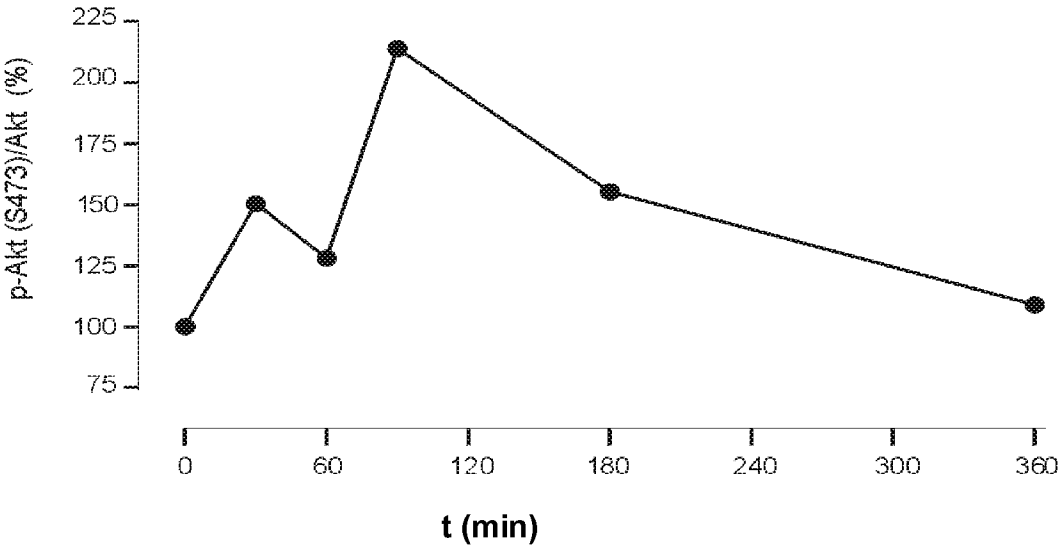
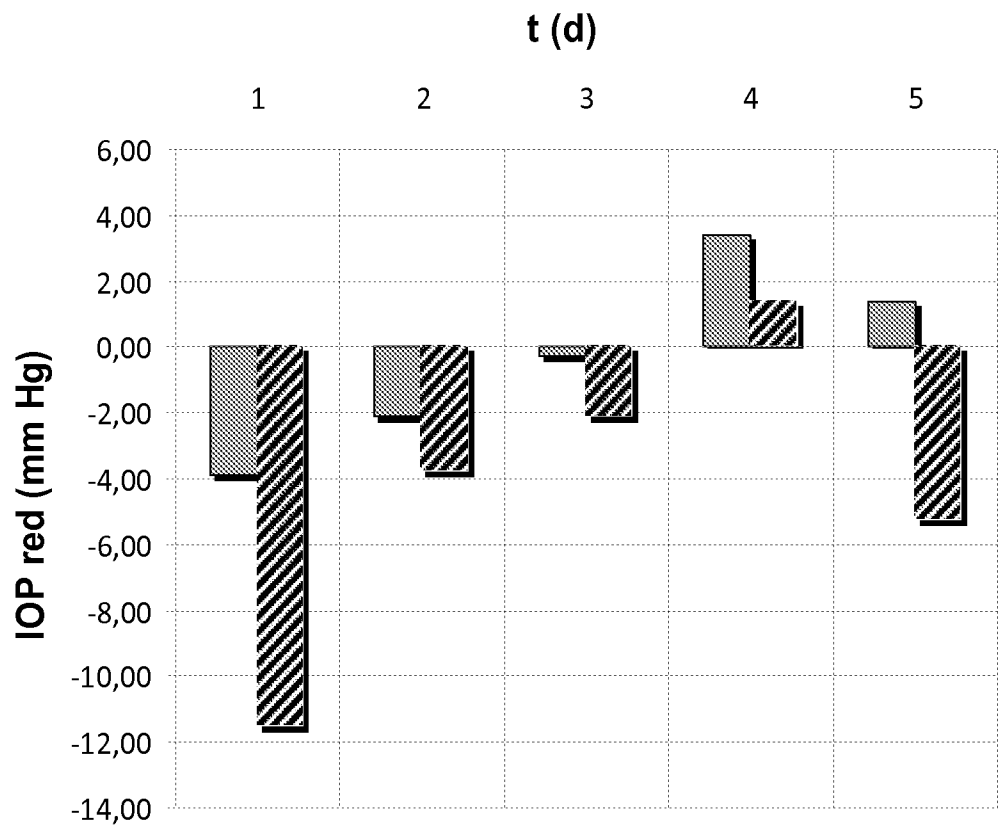


FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2010/070710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/16 (2006.01)

A61P27/06 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/119850 A1 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 09.10.2008, (the whole document)	1-14
A	Morales M. et al. Hypotensive effect of profilin on rabbit intraocular pressure. European Journal of Pharmacology. 22-04-2007, Vol. 567, pages 145-148 (the whole document)	1-14
A	Huang Y. et al. Differential roles of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in retinal ganglion cell survival in rats with or without acute ocular hypertension. Neuroscience. 2008, Vol. 153, pages 214-225 (the whole document)	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01/04/2011

Date of mailing of the international search report
(12/04/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Cumbreño Galindo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2010/070710

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sakai H. et al. Transduction of TAT fusion proteins into the human and bovine trabecular meshwork. Investigative Ophthalmology and Visual Science. October 2006, Vol. 47, N° 10, pages 4427-4434 (the whole document)	1-14
A	Andrieu-Soler C. et al. Ocular gene therapy: A review of nonviral strategies. Molecular Vision. 30.10.2006, Vol. 12, pages 1334-1347 (the whole document)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2010/070710

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2008119850 A	09.10.2008	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2010/070710

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/16 (2006.01)

A61P27/06 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2008/119850 A1 (UNIVERSIDAD DE BARCELONA) 09.10.2008, (todo el documento)	1-14
A	Morales M. et al. Hypotensive effect of profilin on rabbit intraocular pressure. European Journal of Pharmacology. 22-04-2007, Vol. 567, páginas 145-148 (todo el documento)	1-14
A	Huang Y. et al. Differential roles of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway in retinal ganglion cell survival in rats with or without acute ocular hypertension. Neuroscience. 2008, Vol. 153, páginas 214-225 (todo el documento)	1-14

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
01/04/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
12 de abril de 2011 (12/04/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Cumbreño Galindo
Nº de teléfono 91 3496880

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2010/070710

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Sakai H. et al. Transduction of TAT fusion proteins into the human and bovine trabecular meshwork. Investigative Ophthalmology and Visual Science. Octubre 2006, Vol. 47, Nº 10, páginas 4427-4434 (todo el documento)	1-14
A	Andrieu-Soler C. et al. Ocular gene therapy: A review of nonviral strategies. Molecular Vision. 30.10.2006, Vol. 12, páginas 1334-1347 (todo el documento)	1-14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2010/070710

Informaciónes relativas a los miembros de familias de patentes			
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2008119850 A	09.10.2008	NINGUNO	