(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 025 657**

(51) Int. Cl.:

***A61K 38/17*** (2006.01)
***A61K 9/00*** (2006.01)
***A61K 31/4725*** (2006.01)
***A61K 31/573*** (2006.01)
***A61K 38/13*** (2006.01)
***A61P 27/02*** (2006.01)
***A61P 27/04*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2020 PCT/EP2020/067448**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2021 WO21013452**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2020 E 20734889 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 4003396**

(54) Título: **Fragmento polipeptídico de TSG6 para la enfermedad del ojo seco**

(30) Prioridad:

**25.07.2019 GB 201910645**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**09.06.2025**

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.00%)**
**Oxford Road**
**Manchester, Greater Manchester M13 9PL, GB**

(72) Inventor/es:

**DAY, ANTHONY;**
**MILNER, CAROLINE y**
**OH, JOO YOUN**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

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

Fragmento polipeptídico de TSG6 para la enfermedad del ojo seco

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de los trastornos de la superficie ocular y, en particular, aunque no exclusivamente, al tratamiento de la enfermedad del ojo seco con un polipéptido LINK_TSG6.

**Antecedentes**

Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral (TNF) (TSG-6) es un producto secretado de ~35 kDa del gen 6 estimulado por el TNF, expresado en respuesta a mediadores inflamatorios y factores de crecimiento.

Aunque se expresa de forma constitutiva en unos pocos tejidos, TSG-6 generalmente se regula positivamente allí donde hay inflamación. En su mayor parte, TSG-6 presenta propiedades antiinflamatorias y protectoras de los tejidos, pero se ha implicado que en ocasiones desempeña una función en la patología de la enfermedad, por ejemplo, en el pulmón. Aunque es fabricada por una amplia gama de tipos celulares, fue el descubrimiento de que TSG-6 es producida por las células madre/estromáticas mesenquimáticas (MSC, por sus siglas en inglés) en respuesta a señales inflamatorias, y que media en muchas de sus actividades inmunomoduladoras y reparadoras, lo que ha conducido a una gran cantidad de publicaciones sobre los efectos terapéuticos de esta intrigante molécula en una amplia gama de modelos de enfermedad.

TSG-6 es una proteína relativamente pequeña, con una masa molecular de sólo ~35-38 kDa, que se compone principalmente de dos dominios modulares. Dado el tamaño de TSG-6, tiene un número sorprendentemente grande de actividades, incluyendo la modulación de la función de las células inmunitarias y estromáticas y su contribución a la formación, mecánica y remodelación de la matriz extracelular. Es la capacidad de TSG-6 para regular la organización de la matriz y controlar la asociación de moléculas de la matriz con receptores de superficie celular y con factores de señalización extracelular (por ejemplo, quimiocinas), lo que probablemente subyace a su repertorio funcional diverso. En este sentido, TSG-6 interactúa con una gran variedad de ligandos, tales como glicosaminoglicanos (GAG), proteínas del núcleo de proteoglicano (PG) y otros componentes de la matriz, y se une directamente a múltiples quimiocinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Una función particularmente inusual de TSG-6 es su papel como enzima que cataliza la modificación covalente del glicosaminoglicano no sulfatado hialuronano (HA) con las denominadas cadenas pesadas (HC) de la familia de inter-α-inhibidor (IαI) de proteoglicanos. Este proceso, mediado por la proteína TSG6 de longitud completa, pero no los polipéptidos LINK_TSG6 que sólo contienen un fragmento de TSG-6, da como resultado la formación de complejos HC•HA, y es esencial para la ovulación y la fecundación en mamíferos, y también ocurre en muchos otros contextos (por ejemplo, la inflamación) en los que los HC•HA confieren protección a los tejidos o contribuyen a procesos patológicos.

Los sitios y contextos de la expresión de TSG-6, su estructura y propiedades de unión a ligando, y cómo estos juntos sustentan su diversa biología y potencial terapéutico a nivel molecular se revisan en Day y Milner (*Matrix Biology* (2019) 78-79, 60-83).

El documento US2015/0057229 describe el uso de LINK_TSG6 en la inhibición de la degradación del cartílago.

La enfermedad del ojo seco (también conocida como queratoconjuntivitis seca) es una de las enfermedades oculares más comunes, produciéndose entre el 7 % y el 33 % de la población mundial. Se trata de una afección multifactorial de la película lagrimal y la superficie ocular que se acompaña de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal y de inflamación de la superficie ocular, deficiencia neurotrófica y disfunción de las glándulas de meibomio.

Kim *et al.* (2016) (*Cornea* 35(4), 536-542) compararon TSG-6 aplicada por vía tópica, ciclosporina y prednisolona para el tratamiento del ojo seco. A ratones NOD.B10.H2b de 12 semanas de edad se les administró por vía tópica TSG-6 recombinante (0,1 %) 4 veces al día, ciclosporina al 0,05 % (Restasis) dos veces al día o prednisolona al 1 % (Pred Forte) 4 veces al día durante 1 semana. Se descubrió que TSG-6 tópica es tan eficaz en el ojo seco mediado por inflamación como los colirios de ciclosporina. Sin embargo, concluyen que la aplicación clínica de TSG-6 está limitada por diversos factores, incluyendo las dificultades de producción a gran escala o la variación en la estabilidad de la proteína recombinante.

El documento WO2011/139357 describe el uso de células madre/células progenitoras adultas y proteínas de células madre para el tratamiento de lesiones y enfermedades oculares. Proponen una terapia basada en el descubrimiento de que después de una quemadura química en la córnea de una rata, la aplicación de MSC o de medio acondicionado con MSC redujo la inflamación y la revascularización. Propusieron el uso de proteínas antiapoptóticas y antiinflamatorias tales como STC-1 y TSG-6, que son expresadas por células madre mesenquimáticas. La inflamación de la superficie corneal se creó en ojos de rata mediante la aplicación de etanol y el desbridamiento mecánico del epitelio corneal y limbal. La aplicación de TSG-6 recombinante de longitud completa dio como resultado una reducción de la opacidad corneal y la neovascularización en comparación con un control de PBS, y los autores concluyen que

las proteínas producidas por las MSC en respuesta a una señal de lesión pueden proteger la superficie corneal del daño mediante el aumento de la viabilidad y la proliferación de progenitores epiteliales corneales y mediante la supresión de la inflamación en la superficie corneal.

El documento US2016/0075750 (Prockop *et al.*) describe un método de producción de una proteína o un polipéptido, tal como la proteína TSG-6, en células de mamífero suspendidas en un medio sin proteínas que incluye al menos un agente que suprime la producción de ácido hialurónico, hialuronano o una sal de los mismos.

La presente invención se ha ideado a la luz de las consideraciones anteriores.

**Sumario de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación se refiere a un polipéptido LINK_TSG6 para su uso en el tratamiento o la prevención de trastornos de la superficie ocular tales como la enfermedad del ojo seco u otros trastornos de la superficie ocular con lesiones corneales similares a las observadas en la enfermedad del ojo seco. Los inventores han descubierto que este polipéptido es capaz de reducir o prevenir los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco, de una manera dependiente de la dosis. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que este polipéptido es más potente para reducir los defectos epiteliales corneales que la TSG-6 de longitud completa.

En algunos casos, el tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco que se describen en el presente documento comprende uno o más efectos seleccionados del grupo que consiste en: la curación de los defectos epiteliales corneales; el aumento de la producción de lágrimas; la supresión de la inflamación; y un aumento o la conservación de, el número de células caliciformes conjuntivales. La supresión de la inflamación puede comprender una disminución de la producción de una o más citocinas proinflamatorias en la córnea, las glándulas lagrimales intraorbitales o tanto la córnea como las glándulas lagrimales intraorbitales, las citocinas proinflamatorias seleccionadas opcionalmente de TNFα, IFNγ, IL-6 y IL-1β.

El tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco puede comprender la curación de los defectos epiteliales corneales, el aumento de la producción de lágrimas, la supresión de la inflamación o un aumento o conservación del número de células caliciformes conjuntivales en comparación con los defectos epiteliales corneales, la producción de lágrimas, la inflamación o el número de células caliciformes conjuntivales antes de la administración del polipéptido LINK_TSG6 y en comparación con la administración del vehículo de PBS.

El tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco puede comprender la curación de los defectos epiteliales corneales, el aumento de la producción de lágrimas, la supresión de la inflamación o un aumento o conservación del número de células caliciformes conjuntivales en comparación con los defectos epiteliales corneales, la producción de lágrimas, la inflamación o el número de células caliciformes conjuntivales en un individuo de control tratado con proteína TSG-6 de longitud completa.

En algunos aspectos que se describen en el presente documento, el tratamiento comprende la administración tópica del polipéptido LINK_TSG6 en el ojo. El polipéptido LINK_TSG6 puede formularse como colirio. El tratamiento puede comprender la administración de un colirio que comprende LINK_TSG6. El polipéptido LINK_TSG6 puede formularse con, o el tratamiento puede implicar la coadministración con, prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™), lágrimas artificiales o cualquier combinación de los mismos.

En algunos aspectos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 dos veces al día. En algunos aspectos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 más de dos veces al día. En algunos casos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 menos de 4 veces al día o menos de 3 veces al día. En algunos casos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 una vez al día. En algunos casos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 con una frecuencia inferior a una vez al día, tal como una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada semana o una vez cada dos semanas.

El tratamiento puede implicar la administración de entre 10-200 µg de LINK_TSG6 por ojo, tal como entre 100 y 200 µg de LINK_TSG6 por ojo, entre 100 y 150 µg de LINK_TSG6 por ojo, entre 120 y 150 µg de LINK_TSG6 por ojo. Preferentemente, el tratamiento implica la administración de aproximadamente 120 µg-150 µg del polipéptido LINK_TSG6 por ojo o aproximadamente 12-15 µg de LINK_TSG6 por ojo.

El tratamiento o la prevención de trastornos de la superficie ocular tales como la enfermedad del ojo seco divulgada en el presente documento es aplicable a la enfermedad del ojo seco asociada a cualquier causa. La persona que se está tratando puede tener una afección que se asocia a una mayor incidencia de la enfermedad del ojo seco, tal como el síndrome de Sjögren, la artritis reumatoide o la diabetes. En algunos casos, el individuo tiene diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2. El individuo puede estar en riesgo de desarrollar un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco debida al envejecimiento, la exposición a la contaminación atmosférica y/o el mayor uso de un dispositivo visual (por ejemplo, teléfono inteligente, ordenador, tableta).

El tratamiento implica la administración del polipéptido LINK_TSG6 que consiste en (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9, o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o 9.

Un aspecto adicional que se divulga en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende el polipéptido LINK_TSG6. La composición farmacéutica puede comprender el polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina. La composición farmacéutica puede comprender el polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina tamponada con fosfato. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende al menos 2000 µg/ml, 2100 µg/ml, 2200 µg/ml, 2300 µg/ml, 2400 µg/ml, 2500 µg/ml, 2600 µg/ml, 2700 µg/ml, 2800 µg/ml, 2900 µg/ml, 3000 µg/ml, 3100 µg/ml, 3200 µg/ml, 3300 µg/ml o más de 3300 µg/ml de LINK_TSG6. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende al menos 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml, 1300 µg/ml, 1400 µg/ml, 1500 µg/ml, 1600 µg/ml, 1700 µg/ml, 1800 µg/ml, 1900 µg/ml, 2000 µg/ml de LINK_TSG6. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende al menos 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml, 800 µg/ml, 900 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml, 1300 µg/ml, 1400 µg/ml, 1500 µg/ml, 1600 µg/ml, 1700 µg/ml, 1800 µg/ml, 1900 µg/ml, 2000 µg/ml de LINK_TSG6. Preferentemente, la formación farmacéutica comprende al menos 2000 µg/ml de LINK_TSG6. Dichas formulaciones son útiles para suministrar entre aproximadamente 120 µg y aproximadamente 150 µg de LINK_TSG6 por gota.

La composición farmacéutica puede ser una formulación de colirio. La formulación de colirio puede comprender entre 1500 µg/ml y 3500 µg/ml, entre 1500 µg/ml y 3000 µg/ml, entre 2000 µg/ml y 3000 µg/ml, o entre 2400 µg/ml y 3000 µg/ml. Preferentemente, la formulación de colirio comprende entre aproximadamente 2400 µg/ml y aproximadamente 3000 µg/ml. En algunos casos, la formulación de colirio comprende al menos 2200, al menos 2300 µg/ml, al menos 2400 µg/ml, al menos 2500 µg/ml, al menos 2600 µg/ml, al menos 2700 µg/ml, al menos 2800 µg/ml, al menos 2900 µg/ml, al menos 3000 µg/ml o más de 3000 µg/ml. La formulación de colirio puede comprender además prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™) o lágrimas artificiales. La formulación de colirio puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable. La formulación de colirio puede comprender polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina. La formulación de colirio puede comprender polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina tamponada con fosfato.

La presente invención incluye la combinación de los aspectos y las características preferidas descritos, excepto cuando una combinación de este tipo sea claramente inaceptable o se evite expresamente.

**Sumario de las figuras**

Se analizarán ahora realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención con referencia a las figuras adjuntas en las que:

**Figura 1.** Secuencias relevantes para la presente divulgación.

**Figura 2.** LINK_TSG6 reduce los signos de la enfermedad del ojo seco. A. Puntuación de la tinción ocular después de la tinción con verde de lisamina; B. Producción de lágrima acuosa determinada por el ensayo del hilo rojo de fenol; C. Nivel de ARNm de citocinas proinflamatorias determinado mediante RT-PCR en tiempo real; D. Recuento de células caliciformes conjuntivales en secciones conjuntivales teñidas con PAS (tinción de ácido periódico-Schiff). Para A y B, la significación se determinó mediante el ensayo de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon para la comparación entre el pretratamiento y el postratamiento y el ensayo U de Mann-Whitney para la comparación entre PBS y LINK_TSG6. ns = no significativo, p > 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. Para C y D, la significación se determinó mediante ANOVA unidireccional y el ensayo de comparaciones múltiples de Tukey. ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

**Figura 3.** LINK_TSG6 reduce los signos de la enfermedad del ojo seco de manera dependiente de la dosis. A. Cuantificación de defectos epiteliales corneales a partir de córneas teñidas con verde de lisamina. 1 µg y 0,1 µg de LINK_TSG6 resultaron eficaces para reducir los defectos epiteliales corneales, pero 0,01 µg de LINK_TSG6 no mejoró significativamente los defectos epiteliales corneales. B. Cuantificación de la producción de lágrimas acuosas mediante el ensayo del hilo rojo de fenol. 1 µg y 0,1 µg de LINK_TSG6 fueron eficaces para aumentar la producción de lágrimas, pero 0,01 µg LINK_TSG6 no mejoró significativamente la producción de lágrimas. C. Cuantificación de citocinas proinflamatorias mediante análisis por RT-PCR en tiempo real. 1 µg de LINK_TSG6 fue más eficaz en la supresión de la expresión de TNF-α. En A y B, la significación se determinó mediante el ensayo de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; ns = no significativo, p > 0,05. En C, la significación se determinó mediante ANOVA unidireccional y el ensayo de comparaciones múltiples de Tukey. ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

**Figura 4.** Datos de respuesta a la dosis para LINK_TSG6. A. Cuantificación de los defectos epiteliales corneales a partir de córneas teñidas con verde de lisamina mediante tinción ocular; B. Cuantificación de la producción de lágrimas acuosas mediante el ensayo del hilo rojo de fenol; C. Nivel de ARNm de citocinas proinflamatorias determinado mediante RT-PCR en tiempo real D. Recuento de células caliciformes conjuntivales en secciones

conjuntivales teñidas con PAS. Significación determinada mediante ANOVA unidireccional y ensayos de comparaciones múltiples de Tukey. ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

**Figura 5.** LINK_TSG6 es más eficaz que TSG-6 recombinante humana de longitud completa (TSG6 FL) para reducir los signos de la enfermedad del ojo seco. A. Puntuación de la tinción ocular después de la tinción con verde de lisamina; B. Producción de lágrima acuosa determinada por el ensayo del hilo rojo de fenol; C. Recuento de células caliciformes conjuntivales en secciones conjuntivales teñidas con PAS D. Análisis histológico de la inmunotinción con CD3 en la glándula lagrimal expresada por el número de focos con infiltración de células CD3. Se comparan dosis molares equivalentes (92, 9,2 y 0,92 pmol) correspondientes a 1, 0,1 y 0,01 µg de LINK_TSG6 y 3,27, 0,327 y 0,0327 µg de FL TSG-6, respectivamente. La significación se determinó mediante ANOVA unidireccional y el ensayo de comparaciones múltiples de Tukey. * = p < 0,05.

**Figura 6.** Evaluación de LINK_TSG6 en un modelo de ojo seco inducido por lesión por desecación y comparación con Restasis. A. Tinción ocular previa a la inducción de la lesión por desecación y pretratamiento; B. Tinción ocular postlesión por desecación y postratamiento; C. Producción de lágrimas antes de la inducción de la lesión por desecación y pretratamiento; D. Producción de lágrimas postlesión por desecación y postratamiento; E. Células Th1 en ganglios linfáticos cervicales drenantes; F. Células Th17 en ganglios linfáticos cervicales drenantes. ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001.

**Figura 7.** Evaluación de LINK_TSG6 en ratones ya desecados. A. Tinción ocular; B. Producción de lágrimas; C. Recuentos de células caliciformes conjuntivales en secciones conjuntivales teñidas con PAS después del tratamiento; D. Niveles de ARNm de MMP-9 en la superficie ocular; ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001. A y B Ensayo de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon para pares emparejados para la comparación entre el pretratamiento y el postratamiento. C y D ANOVA unidireccional y ensayo de comparaciones múltiples de Tukey.

**Figura 8.** Comparación de LINK_TSG6 y Restasis en un modelo de enfermedad del ojo seco. A. Puntuación de la tinción ocular después de la tinción con verde de lisamina, antes del tratamiento; B. Puntuación de la tinción ocular después de la tinción con verde de lisamina después del tratamiento; C. Cuantificación de la producción de lágrima acuosa mediante el ensayo del hilo rojo de fenol antes del tratamiento D. Cuantificación de la producción de lágrima acuosa mediante el ensayo del hilo rojo de fenol después del tratamiento E. Recuento de células caliciformes conjuntivales en secciones conjuntivales teñidas con PAS después del tratamiento. F. Análisis histológico de la inmunotinción con CD3 en la glándula lagrimal. ns = no significativo, p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01 *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001, ANOVA unidireccional con ensayo de comparaciones múltiples de Tukey.

**Descripción detallada de la invención**

Se analizarán ahora, con referencia a las figuras adjuntas, aspectos de la presente divulgación. Aspectos adicionales serán evidentes para los expertos en la materia.

La presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir trastornos de la superficie ocular tales como la enfermedad del ojo seco, método que comprende administrar a un sujeto un polipéptido LINK_TSG6. Los inventores han demostrado que LINK_TSG6 es más potente que la TSG-6 humana recombinante en la reducción de las lesiones epiteliales corneales y en el tratamiento o la reducción de los signos o síntomas de trastornos de la superficie ocular tales como la enfermedad del ojo seco. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, esto puede ser resultado de una penetración mejorada en el tejido (debido al menor tamaño de la molécula), diferencias en la biodistribución en comparación con la proteína de longitud completa o la ausencia de actividades de señalización o enzimáticas efectuadas por el dominio CUB_C. En este sentido, TSG-6 de longitud completa se une más eficazmente a HA que LINK_TSG6 puesto que la primera interacción es cooperativa (y probablemente implica el dominio CUB_C) (Baranova *et al.*, 2011 *J. Biol. Chem*. 286, 25675-25686). Se ha implicado a AH en algunas actividades antiinflamatorias (véase Day y Milner 2019).

*TSG-6 (Gen 6 estimulado por el factor de necrosis tumoral)*

TSG-6 es una proteína secretada compuesta por dos dominios modulares. TSG-6 por lo general no se expresa constitutivamente en tejidos adultos, en lugar de inducirse en respuesta a mediadores inflamatorios. Durante la inflamación, TSG-6 es un protector endógeno de los tejidos. Muchos de los efectos inmunomoduladores y protectores de los tejidos de las MSC están mediados por su secreción de TSG-6.

Se ha demostrado que la proteína TSG-6 recombinante de longitud completa tiene efectos antiinflamatorios y protectores de tejidos en una amplia gama de modelos de enfermedad, tales como ateroesclerosis, infarto de miocardio, cicatrices hipertróficas, colitis, diabetes autoinmunitaria, artritis reumatoide, traumatismo craneoencefálico o lesión pulmonar aguda. TSG-6 de longitud completa es difícil de fabricar, insoluble y propensa a la agregación. Como se divulga en el presente documento, estas desventajas no se asocian a LINK_TSG6, un péptido recombinante corto que comprende el módulo LINK de la TSG-6 humana. Este polipéptido corto es más fácil de fabricar que la TSG6

completa, y es muy soluble y estable en solución.

El polipéptido LINK_TSG6 como se ha divulgado en el presente documento comprende solamente el módulo Link de TSG-6 humana o de mamífero. En algunos aspectos, el polipéptido TSG-6 comprende o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. El módulo Link corresponde a los restos 37-128 de las SEQ ID NO: 2 y 5, y se muestra en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos preferidos, los polipéptidos LINK_TSG6 útiles en la presente divulgación no comprenden algunos o todos los residuos 1-35 de la secuencia de TSG6 de longitud completa de las SEQ ID NO: 2 o 5 en el extremo N,
El módulo Link es responsable de la actividad de unión a hialuronano (HA), actividad de unión a condroitina-4-sulfato, actividad de unión a agrecano, actividad de unión a inter-α-inhibidor (IαI), actividad de unión a bikunina, actividad de unión a versicano, actividad de unión a dermatán sulfato, actividad de unión a pentraxina-3, actividad de unión a trombospondina-1, actividad de unión a trombospondina-2, actividad de unión a fibronectina, actividad de unión a heparina/heparán sulfato, actividad de unión a RANKL de TSG-6, actividad de unión a la proteína morfogenética ósea (BMP)-2, actividad de unión a BMP-4, actividad de unión a BMP-5, actividad de unión a BMP-6, actividad de unión a BMP-7, actividad de unión a BMP-13, actividad de unión a BMP-14, actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5, actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27.

LINK_TSG6 puede ser un fragmento de TSG-6 que presenta uno o más de actividad de unión a hialuronano (HA), actividad de unión a condroitina-4-sulfato, actividad de unión a agrecano, actividad de unión a inter-α-inhibidor (IαI), actividad de unión a bikunina, actividad de unión a versicano, actividad de unión a dermatán sulfato, actividad de unión a pentraxina-3, actividad de unión a trombospondina-1, actividad de unión a trombospondina-2, actividad de unión a fibronectina, actividad de unión a heparina/heparán sulfato, actividad de unión a RANKL, actividad de unión a la proteína morfogenética ósea (BMP)-2, actividad de unión a BMP-4, actividad de unión a BMP-5, actividad de unión a BMP-6, actividad de unión a BMP-7, actividad de unión a BMP-13, actividad de unión a BMP-14, actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5, actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27.

El dominio LINK de TSG-6 (LINK_TSG6) puede ser la región de TSG-6 de longitud completa N-terminal con respecto al dominio CUB_C. Como tal, la proteína LINK_TSG6 puede carecer total o parcialmente del dominio CUB_C.

El dominio LINK puede contener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o de la SEQ ID NO: 9. El polipéptido LINK_TSG6 comprende, consiste o consiste esencialmente en (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9, o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o 9.

LINK_TSG6 es preferentemente un polipéptido que comprende o consiste en: (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o 9, o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene uno de al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o 9. En consecuencia, el polipéptido LINK_TSG6 puede comprender:

(a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;
(b) una variante de la misma que tiene al menos un 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y que tiene actividad de unión a RANKL; o
(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5, actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27. El polipéptido LINK_TSG6 puede consistir en, o consistir esencialmente en, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.

la SEQ ID NO: 9 muestra un polipéptido recombinante que incluye el módulo Link de TSG-6 (LINK_TSG6). En consecuencia, el polipéptido TSG-6 utilizado en la divulgación puede comprender preferentemente:

(a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;
(b) una variante de la misma que tiene al menos un 50 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y que tiene actividad de unión a RANKL; o
(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5, actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27.

El polipéptido LINK_TSG6 consiste preferentemente en, o consiste esencialmente en, la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9.

En algunos aspectos que se describen en el presente documento, el polipéptido LINK_TSG6 no está conjugado con un agente activo, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, en algunos casos, el polipéptido LINK_TSG6 no está conjugado con un anticuerpo contra IL-17A o fragmento del mismo. En algunos casos, el polipéptido LINK_TSG6 comprende o consiste en una única copia del polipéptido LINK_TSG6, tal como una única copia de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9. En otras palabras, en estos casos, el polipéptido LINK_TSG6 no comprende una pluralidad de secuencias del módulo LINK, tal como una pluralidad de copias de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9. En algunos casos, el polipéptido LINK_TSG6 no comprende un marcador de His, tal como un marcador de 6xHIS.

La identidad de aminoácidos puede calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, utilizado en sus ajustes por defecto) (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes (normalmente en su configuración por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul (1993) *J. Mol. Evol.* 36, 290-300; Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-10.

El programa informático para realizar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del "National Center for Biotechnology Information" (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica identificar primero un par de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de la puntuación de palabra adyacente (Altschul *et al.*, anteriormente citado). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulada. Las extensiones de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulada queda fuera por la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, previsión (E) de 10, M = 5, N =4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que se produciría una coincidencia entre dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es inferior a aproximadamente 1, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y mucho más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

Las secuencias variantes normalmente difieren en al menos 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, pueden realizarse de 1 a 50, de 2 a 30, de 3 a 20 o de 5 a 10 sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Generalmente, el polipéptido modificado puede conservar la actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5, actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27, preferentemente de manera dependiente de la dosis. Las sustituciones son preferentemente sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y, preferentemente, de la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

| | | |
|---|---|---|
| ALIFÁTICOS | No polares | G A P |
| | | I L V |
| | Polares - sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polares - con carga | D E |
| | | K R |
| AROMÁTICOS | | H F W Y |

Un polipéptido LINK_TSG6 utilizado en la divulgación tiene normalmente al menos 10, por ejemplo, al menos 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más aminoácidos de longitud, hasta 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de longitud, siempre que conserve la actividad de unión a CXCL4, actividad de unión a CXCL6, actividad de unión a CXCL8, actividad de unión a CXCL11, actividad de unión a CXCL12, actividad de unión a CCL2, actividad de unión a CCL5,

actividad de unión a CCL7, actividad de unión a CCL19, actividad de unión a CCL21 o actividad de unión a CCL27 de TSG-6. Preferentemente, el polipéptido incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7. Los fragmentos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 contienen preferentemente los restos que se ha demostrado que son esenciales para la unión del hialuronano en Mahoney *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 22764-22771 y Blundell *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 49261-49270. Los fragmentos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 5 contienen preferentemente los restos Lys-46 y/o Tyr-47 y/o Tyr-94 y/o Phe-105 y/o Tyr-113 de la SEQ ID NO: 2 o 5. Mucho más preferentemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 2 o 5 contiene cada uno de los restos Lys-46, Tyr-47, Tyr-94, Phe-105 y Tyr-113 de la SEQ ID NO: 2 o 5.

En la divulgación pueden usarse fragmentos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. Dichos fragmentos contienen preferentemente los restos Lys-10 y/o Tyr-11 y/o Tyr-58 y/o Phe-69 y/o Tyr-77 de la SEQ ID NO: 7. Mucho más preferentemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 7 contiene cada uno de los restos Lys-10, Tyr-11, Tyr-58, Phe-69 y Tyr-77 de la SEQ ID NO: 7.

Los fragmentos de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 contienen preferentemente los restos Lys-11 y/o Tyr-12 y/o Tyr-59 y/o Phe-70 y/o Tyr-78 de la SEQ ID NO: 9. Mucho más preferentemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 9 contiene cada uno de los restos Lys-11, Tyr-12, Tyr-59, Phe-70 y Tyr-78 de la SEQ ID NO: 9. Los polipéptidos TSG-6 utilizados en la divulgación pueden modificarse químicamente, por ejemplo, modificarse postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden glicosilarse, fosforilarse o comprender restos de aminoácidos modificados. Pueden modificarse mediante la adición de residuos de histidina para ayudar a su purificación o mediante la adición de una secuencia transmembrana para promover la inserción dentro la membrana celular. Dichos polipéptidos modificados caen dentro del alcance del término "polipéptido" utilizado en el presente documento.

Se conocen bien en la técnica ensayos adecuados para determinar la capacidad de un polipéptido TSG-6 para unirse a HA, condroitín-4-sulfato, agrecano, inter-α-inhibidor (IαI), bikunina, versicano, dermatán sulfato, pentraxina-3, trombospondina-1, heparina/heparán sulfato, fibronectina y RANKL (Getting *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 51068-51076; Mahoney *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 27044-27055; Salustri *et al.* (2004) *Development* 131, 1577-1586; Parkar *et al.* (1997) *FEBS Lett.* 410, 413-417; Parkar *et al.* (1998) *FEBS Lett.* 428, 171-176; Mahoney *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 22764-22771; Nentwich *et al.* (2002) *J. Biol Chem.* 211, 15354-15362; Kuznetsova *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30899-30908), Dyer *et al.* (2014) *J. Immunol* 192, 2177-2185; Dyer *et al.* (2016) *J. Biol. Chem.* 291, 12627-12640; y Mahoney *et al.* (2008) *J. Biol. Chem* 283, 25952-25962.

Los polipéptidos TSG-6 para su uso en la divulgación pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con portadores o diluyentes que no interferirán con el fin previsto del polipéptido y aún se considerarán sustancialmente aislados. Un polipéptido para su uso en la divulgación también puede estar en una forma substancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá el polipéptido en una preparación en la que más del 50 %, por ejemplo, más del 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la divulgación.

Los polipéptidos LINK_TSG6 para su uso en la presente divulgación pueden ser polipéptidos de origen natural o no natural. Los polipéptidos pueden aislarse de cualquier organismo adecuado que exprese un polipéptido TSG-6. El polipéptido TSG-6 puede aislarse de un ser humano u otro mamífero adecuado, tal como primates, ratas o ratones. Como alternativa, el polipéptido TSG-6 puede aislarse de un pez o un anfibio. Los polipéptidos para su uso en la divulgación también pueden prepararse como fragmentos de dichos polipéptidos aislados.

Además, los polipéptidos LINK_TSG6 también pueden fabricarse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, puede producirse un polipéptido LINK_TSG6 recombinante transfectando células en cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido unida operablemente a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo y purificando el polipéptido LINK_TSG6 producido por las células. Se conocen bien en la técnica métodos para la producción recombinante de polipéptidos (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3.ª edición, Cold Harbour Laboratory Press). Preferentemente, el polipéptido LINK_TSG6 se fabrica en una bacteria, tal como *E. coli.* Preferentemente, el polipéptido LINK_TSG6 no se fabrica en una célula CHO u otra célula de mamífero. Como apreciarán los expertos en la materia, las proteínas y los polipéptidos fabricados en una bacteria tal como *E. coli* carecerán totalmente o sustancialmente de glicosilación, mientras que la glicosilación es una característica común de las proteínas y los polipéptidos fabricados en una célula de mamífero tal como una célula CHO. En particular, el LINK_TSG6 de acuerdo con la presente divulgación puede carecer de glicosilación ligada a N en Asn118 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5).

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos LINK_TSG6 para su uso en la divulgación puede modificarse para incluir aminoácidos de origen no natural o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse siguiendo la producción sintética o recombinante. En algunos aspectos, los polipéptidos LINK_TSG6 que se describen en el presente documento no comprenden un marcador de polihistidina, tal como un marcador de 6His. En algunos aspectos, los polipéptidos LINK_TSG6 que se describen en el presente documento no comprenden un marcador de polihistidina en el extremo C-terminal del polipéptido.

Los polipéptidos LINK_TSG6 para su uso en la divulgación también pueden producirse usando aminoácidos D. En dichos casos los aminoácidos se unirán en secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es lo convencional en la técnica para producir dichos polipéptidos.

En la técnica, se conocen un número de dichas modificaciones de cadena y pueden realizarse a las cadenas laterales de los polipéptidos LINK_TSG6, a condición de que los polipéptidos conserven la actividad de curación de defectos corneales.

*Trastornos de la superficie ocular*

La presente divulgación se refiere al tratamiento o la prevención de trastornos de la superficie ocular. Los trastornos de la superficie ocular incluyen la enfermedad del ojo seco (EOS), epiteliopatía corneal persistente (defectos epiteliales que no se curación) asociada a queratopatía diabética, queratopatía neurotrófica, queratopatía por exposición o deficiencia limbal; erosiones epiteliales inducidas por lentes de contacto/colirio; enfermedad del injerto contra hospedador (EICH); síndrome de Stevens Johnson (SSJ); necrólisis epidérmica tóxica (NET), disfunción de la superficie ocular en pacientes con glaucoma, heridas corneales resultantes de cirugía de glaucoma, erosión corneal recurrente, queratitis punteada superficial, queratoconjuntivitis límbica superior.

*Enfermedad del ojo seco*

La presente divulgación se refiere al tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco. La enfermedad del ojo seco (también conocida como síndrome del ojo seco o queratoconjuntivitis seca) es la condición de tener los ojos secos, y afecta al 7-33 % de la población mundial. La enfermedad del ojo seco se produce cuando no se producen suficientes lágrimas (enfermedad del ojo seco por deficiencia acuosa) o cuando las lágrimas se evaporan demasiado deprisa (enfermedad del ojo seco evaporativo). Las causas incluyen el envejecimiento (que se sabe que provoca atrofia e inflamación del gran lagrimal), la infección, la exposición a irritantes ambientales tales como humo, el uso de lentes de contacto, la disfunción de las glándulas de meibomio, las alergias, el embarazo, el síndrome de Sjögren, la deficiencia de vitamina A, el tratamiento ocular con láser o como resultado de medicamentos tales como antihistamínicos, medicación para la tensión arterial, terapia hormonal sustitutiva y algunos antidepresivos. En algún caso, la enfermedad del ojo seco se produce a partir de actividades que se asocian a una tasa de parpadeo reducida, tal como el uso de pantallas tales como monitores de ordenador, teléfonos inteligentes o tabletas, televisiones o conducción. La enfermedad del ojo seco puede dar como resultado pequeñas abrasiones en la superficie de los ojos (es decir, defectos en el epitelio corneal. La enfermedad del ojo seco puede dar como resultado cambios patológicos en el epitelio corneal, tales como metaplasia escamosa y pérdida de células caliciformes, en casos graves que conducen a erosión corneal, ulceración, neovascularización y cicatrización, o adelgazamiento y perforación. El diagnóstico de la enfermedad del ojo seco puede implicar un cuestionario estandarizado sobre el ojo seco (el Índice de enfermedad de la superficie ocular, u OSDI, por sus siglas en inglés), una escala de 12 puntos para la evaluación de los síntomas relacionados con la enfermedad del ojo seco y su efecto sobre la visión.

La enfermedad del ojo seco es una enfermedad resultado de una lesión por desecación de la superficie ocular o de un daño inflamatorio de la glándula lagrimal. Es clínicamente distinto de otros traumatismos oculares inducidos por traumatismos, tales como quemaduras químicas o traumatismos resultantes de la exposición directa de la superficie ocular a sustancias químicas (tales como alcohol), desbridamiento físico o químico, traumatismo ocular por fuerza contundente, lesión ocular penetrante u otra herida ocular, aunque estas afecciones oculares inducidas por traumatismos pueden dar como resultado el desarrollo posterior de la enfermedad del ojo seco.

Los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco incluyen irritación, enrojecimiento, secreción, ojos fácilmente fatigados y visión borrosa. Los signos y síntomas varían de leves y ocasionales a graves y continuos, y pueden producirse cicatrices en la córnea si no se trata.

Como se divulga en el presente documento, el péptido LINK_TSG6 puede usarse para tratar o impedir la enfermedad del ojo seco. La administración de LINK_TSG6 puede dar como resultado una curación de los defectos epiteliales corneales, un aumento de la producción de lágrimas, la supresión de la inflamación y/o un aumento/conservación del número de células caliciformes conjuntivales. La curación de los defectos epiteliales corneales puede dar como resultado una reducción del número de defectos epiteliales corneales o del tamaño de los defectos epiteliales corneales. Preferentemente, la curación de los defectos epiteliales corneales da como resultado una reducción de la proporción de la superficie corneal que comprende defectos epiteliales corneales.

Los defectos epiteliales corneales son áreas de pérdida epitelial (capa corneal más externa) y pueden deberse a traumatismos mecánicos, sequedad corneal, córnea neurotrófica, cambios posquirúrgicos o cualquiera de una diversidad de etiologías. LINK_TSG6 puede usarse para reducir o reparar defectos epiteliales corneales. La presencia o ausencia de defectos epiteliales corneales puede determinarse mediante puntuación. Los defectos epiteliales corneales pueden visualizarse mediante tinción. Por ejemplo, a través del uso de colorante verde de lisamina o fluoresceína. La tinción se aplica a la córnea y se tiñe el área del defecto epitelial, permitiendo de este modo la visualización de un defecto.

Puede determinarse un aumento de la producción de lágrimas mediante el ensayo de Schirmer o el ensayo del hilo rojo de fenol.

El número de células caliciformes en la conjuntiva puede determinarse mediante citología de impresión. Se aplica con presión un papel de filtro de acetato de celulosa a la superficie conjuntival para la recogida de la capa superficial y se somete a tinción con PAS para teñir células caliciformes secretoras de mucina. El número de células caliciformes se calcula en el portaobjetos teñido con PAS.

La presencia, la ausencia o la cantidad de inflamación en la superficie ocular puede determinarse mediante la observación de enrojecimiento conjuntival o de defectos epiteliales conjuntivales. La inflamación puede provocar la interrupción del epitelio corneal y conjuntival.

El nivel de citocinas inflamatorias puede determinarse en una muestra de lágrima del paciente. Las muestras de lágrima pueden obtenerse usando tiras de ensayo de lágrimas Schirmer. El ácido nucleico y/o la proteína pueden extraerse de la tira de lágrimas incubando la tira en bicarbonato de amonio y acetona. El nivel de citocinas inflamatorias puede cuantificarse o calificarse mediante RT-PCR o ELISA. Las citocinas inflamatorias pueden seleccionarse de IFN-γ, TNF-α, IL-1β e IL-6. En algunos casos, las citocinas inflamatorias pueden cuantificarse o calificarse mediante inmunoensayo. En algunos casos, el nivel de MMP9 se determina de manera semicuantitativa (positivo, traza o negativo) usando un kit "InflammaDry" en ojos humanos.

La córnea es la parte frontal transparente del ojo que cubre el iris, la pupila y la cámara anterior. La córnea, con la cámara anterior y el cristalino, refracta la luz, y la córnea representa aproximadamente dos tercios de la potencia óptica total del ojo. Aunque la córnea contribuye a la mayor parte de la potencia de enfoque del ojo, su enfoque es fijo. La córnea tiene extremos nerviosos no mielinizados sensibles al tacto, la temperatura y los productos químicos; un toque de la córnea provoca un reflejo involuntario de cierre del párpado. Debido a que la transparencia es primordial, la córnea sana no tiene ni necesita vasos sanguíneos dentro de ella. En su lugar, el oxígeno se disuelve en las lágrimas y después se difunde por toda la córnea para mantenerla sana. De forma similar, los nutrientes se transportan a través de difusión desde el fluido lagrimal a través de la superficie exterior y el humor acuoso a través de la superficie interior. Los nutrientes también llegan a través de las neurotrofinas suministradas por los nervios de la córnea. En los seres humanos, la córnea tiene un diámetro de aproximadamente 11,5 mm y un grosor de 0,5-0,6 mm en el centro y de 0,6-0,8 mm en la periferia. La transparencia, la avascularidad, la presencia de células inmunitarias residentes inmaduras y el privilegio inmunitario hacen de la córnea un tejido muy especial.

Los métodos que se divulgan en el presente documento se refieren en particular al epitelio corneal y al daño del mismo. El epitelio corneal es una capa de tejido epitelial multicelular extremadamente delgada (aproximadamente 50 µm) (epitelio escamoso estratificado no queratinizado) de células de crecimiento rápido y fácil regeneración, que se mantiene húmedo con lágrimas. El epitelio corneal se compone de células epiteliales y recubre la parte anterior de la córnea. Actúa como barrera de primera línea para proteger la córnea, resistiendo el flujo libre de fluidos procedentes de las lágrimas, e impide la entrada de bacterias en la córnea y en el interior del ojo. La irregularidad o los defectos del epitelio corneal alteran la suavidad de la interfaz aire/película lagrimal, el componente más significativo de la potencia refractiva total del ojo, reduciendo de este modo la agudeza visual. Es continuo con el epitelio conjuntival y se compone de aproximadamente 6 capas de células que se desprenden constantemente en la capa expuesta y se regeneran mediante multiplicación en la capa basal. En la enfermedad del ojo seco, el epitelio corneal con frecuencia resulta dañado.

En algunos métodos, aumenta la producción de lágrimas o el grosor de la película lagrimal que reviste el ojo. En algunos casos, disminuye la retención de lágrimas, de manera que las lágrimas se evaporan rápidamente del ojo. El lagrimeo (también conocido como lacrimación) es la secreción refleja de lágrimas en respuesta a irritantes externos o internos. Las lágrimas son un fluido corporal que puede servir para limpiar y lubricar los ojos en respuesta a la irritación. En ojos sanos de mamíferos, la córnea se mantiene continuamente húmeda y nutrida por las lágrimas basales. Éstas lubrican el ojo y ayudan a mantenerlo limpio de polvo. El fluido lagrimal contiene agua, mucina, lípidos, lisozima, lactoferrina, lipocalina, lacritina, inmunoglobulinas, glucosa, urea, sodio y potasio. Algunas de las sustancias del fluido lagrimal (tal como lisozima) luchan contra la infección bacteriana como parte del sistema inmunitario. La lisozima hace esto disolviendo una capa en el revestimiento exterior, llamada peptidoglicano, de determinadas bacterias. Las lágrimas son un fluido corporal típico con un contenido de sales similar al del plasma sanguíneo. Por lo general, en un período de 24 horas, se segregan de 0,75 a 1,1 gramos (0,03-0,04 onzas avoirdupois) de lágrimas; esta tasa disminuye con la edad. Además, las lágrimas basales se componen de antioxidantes tales como ascorbato, urato, cisteína, glutatión y tirosina. El ascorbato y el urato constituyen la mitad de las lágrimas.

Un segundo tipo de lágrimas es resultado de la irritación del ojo por partículas extrañas, o de la presencia de sustancias irritantes tales como vapores de cebolla, perfumes y otras fragancias, gas lacrimógeno o spray de pimienta en el entorno del ojo, incluyendo la córnea, conjuntiva o mucosa nasal, que activan los canales de TRP en el nervio oftálmico. También puede ocurrir con luz brillante y estímulos calientes o picantes en la lengua y la boca. También está relacionado con vómitos, tos y bostezos. Estas lágrimas reflejas intentan lavar las sustancias irritantes que puedan haber entrado en contacto con el ojo.

Los métodos que se divulgan en el presente documento pueden referirse a la conservación o la mejora de la producción de lágrimas, tales como lágrimas basales o lágrimas reflejas.

*Selección de pacientes*

De acuerdo con los métodos de la divulgación, los métodos pueden comprender adicionalmente la etapa de seleccionar un sujeto para el tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende o consiste en LINK_TSG6.

Los métodos pueden comprender evaluar a un sujeto o paciente para determinar la evidencia de, o la susceptibilidad a, un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco, tal como daños corneales (por ejemplo, la presencia de lesiones epiteliales corneales), producción inadecuada de lágrimas e inflamación (por ejemplo, enrojecimiento o hinchazón, o la presencia de uno o más marcadores biológicos de inflamación, tales como una o más de las citocinas proinflamatorias TNFα, IL-1β, IFN-γ o IL-6 y MMP9).

El método puede implicar un examen oftalmológico exhaustivo. Esto puede incluir: evaluación del historial médico para determinar los signos y síntomas del paciente y anotar cualquier problema de salud general, medicamentos o factores ambientales que puedan estar contribuyendo al problema del ojo seco; examen externo del ojo, incluyendo la estructura del párpado y la dinámica del parpadeo; evaluación de los párpados y la córnea usando luz brillante y aumento; o medición de la cantidad y calidad de las lágrimas para detectar cualquier anomalía.

Se puede determinar que un individuo tiene un defecto epitelial corneal, por ejemplo, a través de tinción con verde de lisamina, rosa de bengala o colorante de fluoresceína.

Puede determinarse que el individuo tiene una producción lagrimal inadecuada, por ejemplo, a través del uso del ensayo del hilo rojo de fenol o el ensayo de Schirmer.

En algunos casos que se describen en el presente documento, el individuo que ha de tratarse tiene una afección que se asocia a una mayor incidencia de trastornos de la superficie ocular, tal como la enfermedad del ojo seco. En algunos casos se trata de una enfermedad autoinmunitaria. La afección autoinmunitaria puede ser el síndrome de Sjögren. El individuo puede haber sido diagnosticado previamente como que tiene el síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren provoca una de las formas más graves de la enfermedad del ojo seco, caracterizada por destrucción inflamatoria de glándulas lagrimales y la superficie ocular. La inflamación de las glándulas lagrimales y la superficie ocular es una característica clave de la enfermedad del ojo seco, y desempeña un función importante en la patogenia de la enfermedad del ojo seco y el síndrome de Sjögren. En algunos casos, la enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide o la diabetes. En algunos casos, el individuo tiene diabetes de tipo 1 o diabetes de tipo 2.

En algunos casos, el trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco no implica inflamación. La enfermedad del ojo seco no asociada a inflamación puede estar asociada a inestabilidad de la película lagrimal y/o evaporación rápida de la lágrima.

*Tratamientos*

En el presente documento se divulgan métodos de tratamiento o prevención de trastornos de la superficie ocular tales como la enfermedad del ojo seco. Los métodos pueden implicar la reducción o eliminación de uno o más signos y síntomas de un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco, tal como una reducción de los defectos o lesiones epiteliales corneales, un aumento de la producción de lágrimas, un aumento o conservación del número de células caliciformes, una reducción de la expresión de una o más citocinas inflamatorias, o una reducción del enrojecimiento, o de la sensación de ardor, dolor o malestar, o una mejora de los signos y síntomas visuales tales como pérdida de visión o visión borrosa.

Los métodos pueden implicar el tratamiento o la prevención de defectos o lesiones epiteliales corneales. Los métodos pueden dar como resultado una disminución del número y/o la extensión de las lesiones epiteliales corneales. Los métodos pueden dar como resultado una disminución del número y/o la extensión de las lesiones epiteliales corneales en comparación con el número y/o la extensión de las lesiones epiteliales corneales antes del tratamiento. Los métodos pueden dar como resultado una disminución del número y/o la extensión de las lesiones epiteliales corneales en comparación con el número y/o la extensión de las lesiones epiteliales corneales en un control sin tratar, o en un control sin tratar con TSG-6 de longitud completa, tal como TSG-6 que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5. La extensión de las lesiones epiteliales corneales puede reducirse en al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 75 % o al menos el 100 % en comparación con el control. El tratamiento puede dar como resultado lesiones epiteliales corneales en el 0 %, menos del 10 %, menos del 20 %, menos del 30 %, menos del 40 % o menos del 50 % de la superficie corneal.

Los métodos pueden implicar el tratamiento o la prevención de la producción inadecuada de lágrimas. Estos métodos pueden dar como resultado un aumento de la producción de lágrimas, tal como un aumento del volumen de producción

de lágrimas. Los métodos pueden dar como resultado un aumento del volumen de lágrimas producidas en comparación con el volumen de lágrimas antes del tratamiento. Los métodos pueden dar como resultado un aumento del volumen de lágrimas producidas en comparación con el volumen de lágrimas de un control sin tratar, o de un control sin tratar con TSG-6 de longitud completa, tal como TSG-6 que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5. El volumen de lágrimas puede aumentar al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 % o más del 100 % en comparación con el control.

Los métodos pueden implicar aumentar o conservar el número de células caliciformes. En este contexto, aumentar o conservar el número de células caliciformes significa que el número de células caliciformes después del tratamiento con LINK_TSG6 no disminuye en la misma medida que la disminución observada en ausencia del tratamiento, tal como en un control sin tratar. En algunos casos, el número de células caliciformes aumenta o permanece invariable en comparación con el número de células caliciformes antes del tratamiento.

Los métodos pueden implicar una reducción de los niveles de una o más citocinas inflamatorias. Por ejemplo, el método puede dar como resultado una reducción de los niveles de ácidos nucleicos correspondientes a una o más citocinas inflamatorias. En algunos casos, el método da como resultado una reducción de los niveles de proteínas citocinas inflamatorias. Las citocinas inflamatorias pueden seleccionarse de TNFα, IL6, IFN-γ e IL-1β. Los niveles pueden disminuir el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con el nivel anterior al tratamiento, o en comparación con un control sin tratar.

El tratamiento puede dar como resultado la resolución completa de los signos y síntomas del trastorno de la superficie ocular, tal como la enfermedad del ojo seco.

La prevención puede impedir que aparezcan signos y síntomas de un trastorno de la superficie ocular, tal como la enfermedad del ojo seco, o puede significar que los signos y síntomas del trastorno de la superficie ocular, tal como la enfermedad del ojo seco, se desarrollen en menor medida que en ausencia de tratamiento.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden implicar la administración tópica de LINK_TSG6. LINK_TSG6 puede administrarse por vía tópica en el ojo (suministro ocular), preferentemente en la córnea, tal como la superficie de la córnea. En algunos casos, el LINK_TSG6 se administra en forma de colirio. El LINK_TSG6 puede formularse en forma de una formulación líquida tópica, tal como un colirio. LINK_TSG6 puede formularse mediante suspensión o emulsión.

La administración es preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de LINK_TSG6 puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el polipéptido; la edad, el peso y el estado del paciente que ha de tratarse; la vía de administración; y la pauta requerida. De nuevo, un médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria y la dosis para cualquier paciente particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz de LINK_TSG6 es una cantidad eficaz para mejorar uno o más signos y síntomas de un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco, tal como para reducir el nivel de daño corneal o lesiones corneales, aumentar la función lagrimal, o aumentar la producción de lágrimas lagrimales, o reducir la inflamación del ojo, tal como la inflamación de la córnea.

En algunos casos, LINK_TSG6 se administra a razón de 12 µg-15 µg por ojo, tal como entre 10 µg y 20 µg, o entre 12 y 15 µg. En algunos casos, LINK_TSG6 se administra a aproximadamente 8 µg por ojo, aproximadamente 9 µg por ojo, aproximadamente 10 µg por ojo, aproximadamente 11 µg por ojo, aproximadamente 12 µg por ojo, aproximadamente 13 µg por ojo, aproximadamente 14 µg por ojo o aproximadamente 15 µg por ojo.

En algunos casos, se desea una dosis mayor. En dichos casos, LINK_TSG6 se administra a aproximadamente 120 µg-150 µg por ojo. En algunos casos, la dosis de LINK_TSG6 es de al menos 80 µg, al menos 90 µg, al menos 100 µg, al menos 110 µg, al menos 120 µg, al menos 130 µg o al menos 140 µg por ojo. En algunos casos, la dosis de LINK_TSG6 es inferior a 170 µg, inferior a 160 µg, inferior a 150 µg, inferior a 140 µg, inferior a 130 µg o inferior a 120 µg por ojo.

En algunos casos, se desea una dosis aún mayor. Por ejemplo, la dosis de LINK_TSG6 puede ser de al menos 170 µg, al menos 180 µg, al menos 190 µg, al menos 200 µg, al menos 210 µg, al menos 220 µg, al menos 230 µg, al menos 240 µg, al menos 250 µg, al menos 260 µg, al menos 270 µg, al menos 280 µg, al menos 290 µg, al menos 300 µg, al menos 320 µg, al menos 340 µg, al menos 360 µg, al menos 380 µg, al menos 400 µg, al menos 420 µg, al menos 440 µg, al menos 460 µg, al menos 480 µg, al menos 500 µg, al menos 550 µg, al menos 600 µg, al menos 650 µg, al menos 700 µg, al menos 750 µg, al menos 800 µg, al menos 900 µg, al menos 1 mg, al menos 1,1 mg, al menos 1,2 mg, al menos 1,3 mg, al menos 1,4 mg, al menos 1,5 mg, al menos 1,6 mg o al menos 1,7 mg.

La administración puede ser una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, seis veces al día, siete veces al día, ocho veces al día, nueve veces al día, diez veces al día o más de diez veces al día. La administración es preferentemente dos veces al día. En algunos casos preferidos, la administración es más de dos veces al día, tal como tres o cuatro veces al día. En algunos casos preferidos, la administración es menos de

cuatro veces al día, o menos de tres veces al día, o dos veces al día o una vez al día. En casos particularmente preferidos, la administración es dos veces al día. En algunos casos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 una vez al día. En algunos casos, el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 con una frecuencia inferior a una vez al día, tal como una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada semana o una vez cada dos semanas.

La dosis, esquema, modo o curso temporal de administración del polipéptido de la divulgación puede modificarse de acuerdo con la respuesta a la terapia. Por ejemplo, la dosis y/o la frecuencia de la administración y/o el curso temporal de la administración pueden aumentarse si la respuesta a la terapia no es óptima. A la inversa, la dosis y/o la frecuencia de administración y/o el curso temporal de la administración pueden reducirse si la respuesta a la terapia es mejor de lo esperado.

En algunos casos, el tratamiento implica la coadministración de LINK_TSG6 con lágrimas artificiales, prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™) o cualquier combinación de los mismos. La administración puede ser secuencial o simultánea. Preferentemente, donde LINK_TSG6 se coadministra con uno o más de prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™) o lágrimas artificiales, la administración es simultánea o sustancialmente simultánea. Preferentemente, los agentes coadministrados se administran por la misma vía de administración, tal como mediante administración tópica en el ojo.

La evaluación de un sujeto por un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco puede producirse en cualquier momento antes, durante o después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de LINK_TSG6. En algunos aspectos, los métodos de la divulgación comprenden comenzar la administración, evaluar a un sujeto como anteriormente y, basándose en la evaluación, continuar, modificar o interrumpir la administración adicional. En algunos aspectos, alterar la administración comprende aumentar o disminuir la dosis y/o la frecuencia y/o el curso temporal de administración.

*Formulaciones*

Las formulaciones adecuadas para la administración ocular incluyen colirios en donde el compuesto activo se disuelve o se suspende en un portador adecuado, en especial un disolvente acuoso para el compuesto activo. En formulaciones preferidas, LINK_TSG6 se solubiliza en una solución salina. En algunas formulaciones, LINK_TSG6 se solubiliza en PBS (solución salina tamponada con fosfato). Como se describe en el presente documento, los inventores han descubierto que el polipéptido LINK_TSG6 tiene una alta solubilidad en solución salina en comparación con TSG6 de longitud completa. En el presente documento se describen composiciones, particularmente composiciones farmacéuticas, que comprenden concentraciones altas de LINK_TSG6.

La composición farmacéutica puede comprender el polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina. La composición farmacéutica puede comprender el polipéptido LINK_TSG6 solubilizado en solución salina tamponada con fosfato. En algunos aspectos, la composición farmacéutica comprende al menos 2000 µg/ml, 2100 µg/ml, 2200 µg/ml, 2300 µg/ml, 2400 µg/ml, 2500 µg/ml, 2600 µg/ml, 2700 µg/ml, 2800 µg/ml, 2900 µg/ml, 3000 µg/ml, 3100 pg/ml, 3200 µg/ml, 3300 µg/ml o más de 3300 µg/ml de LINK_TSG6. Preferentemente, la formación farmacéutica comprende al menos 2000 µg/ml de LINK_TSG6.

Las formulaciones de colirio como se han descrito pueden comprender además uno o más de un conservante, antioxidante, estabilizante, modificador de la tonicidad, modificador de la viscosidad o tampón. Preferentemente, la formulación de colirio es una formulación de colirio estéril. En algunos casos, la formulación de colirio contiene entre aproximadamente 240 µg/ml y aproximadamente 300 µg/ml de LINK_TSG6. Dichas formulaciones son útiles para suministrar entre aproximadamente 12 µg y aproximadamente 15µg de LINK_TSG6 por gota. Cada gota puede ser de aproximadamente 50 µl. La formulación de colirio puede comprender entre 200 µg/ml y 350 µg/ml, entre 200 µg/ml y 320 µg/ml, entre 220 µg/ml y 320 µg/ml, o entre 240 µg/ml y 300 µg/ml. Preferentemente, la formulación de colirio comprende entre aproximadamente 240 µg/ml y aproximadamente 300 µg/ml. La formulación de colirio puede contener al menos 200 µg/ml, al menos 220 µg/ml, al menos 230 µg/ml, al menos 240 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 260 µg/ml, al menos 270 µg/ml, al menos 280 µg/ml, al menos 290 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 310 µg/ml, al menos 320 µg/ml o más de 320 µg/ml del polipéptido LINK_TSG6.

En algunos casos, se desea una formulación de dosis más alta. Dichas formulaciones pueden contener entre 2400 y 3000 µg/ml de LINK_TSG6. Dichas formulaciones son útiles para suministrar entre aproximadamente 120 µg y aproximadamente 150 µg de LINK_TSG6 por gota. La formulación de colirio puede comprender entre 2000 µg/ml y 3500 µg/ml, entre 2000 µg/ml y 3200 µg/ml, entre 2200 µg/ml y 3200 µg/ml, o entre 2400 µg/ml y 3000 µg/ml. Preferentemente, la formulación de colirio comprende entre aproximadamente 2400 µg/ml y aproximadamente 3000 µg/ml. La formulación de colirio puede contener al menos 2000 µg/ml, al menos 2200 µg/ml, al menos 2300 µg/ml, al menos 2400 µg/ml, al menos 2500 µg/ml, al menos 2600 µg/ml, al menos 2700 µg/ml, al menos 2800 µg/ml, al menos 2900 µg/ml, al menos 3000 µg/ml, al menos 3100 µg/ml, al menos 3200 µg/ml o más de 3200 µg/ml del polipéptido LINK_TSG6.

En algunos casos, la formulación de colirio puede comprender además lágrimas artificiales. Las lágrimas artificiales

son colirios lubricantes. Las lágrimas artificiales pueden contener uno o más agentes seleccionados de carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hialuronano, agua, sales y polímeros, tales como polietilenglicol o polipropilenglicol.

En algunos casos, la formulación de colirio puede comprender además prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™) o una combinación de prednisolona y ciclosporina, prednisolona y Lifitegrast (Xiidra™), ciclosporina y Lifitegrast (Xiidra™), o prednisolona, ciclosporina y Lifitegrast (Xiidra™).

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas usando un "portador" farmacéuticamente aceptable compuesto por materiales que se consideran seguros y eficaces. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que "generalmente se consideran seguras", por ejemplo, que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción adversa alérgica o similar, tal como molestias gástricas, pérdida, o cambio, del gusto (ageusia) y similares, cuando se administran a un ser humano. En algunos aspectos, este término se refiere a entidades moleculares y composiciones aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de los EE. UU., como la lista GRAS en virtud de los artículos 204(s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Fármacos y Cosméticos, que está sujeta a revisión y aprobación previa a la comercialización por parte de la FDA o listas similares, la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "portador" se refiere a diluyentes, aglutinantes, lubricantes y disgregantes. Aquellos con experiencia en la técnica están familiarizados con dichos portadores farmacéuticos y métodos de preparación de composiciones farmacéuticas usando dichos portadores.

Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en el presente documento pueden incluir uno o más excipientes, por ejemplo, disolventes, potenciadores de la solubilidad, agentes de suspensión, agentes tamponantes, agentes isotónicos, antioxidantes o conservantes antimicrobianos. Cuando se usan, los excipientes de las composiciones no afectarán negativamente a la estabilidad, la biodisponibilidad, la seguridad y/o la eficacia de los principios activos, es decir, LINK_TSG6 utilizado en la composición. Por lo tanto, el experto en la materia apreciará que se proporcionan composiciones en donde no existe incompatibilidad entre ninguno de los componentes de la forma farmacéutica. Los excipientes pueden seleccionarse del grupo que consiste en agentes tamponantes, agentes solubilizantes, agentes de tonicidad, agentes quelantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos y conservantes. Las pomadas se preparan normalmente a partir del compuesto activo y una base de pomada parafínica o miscible en agua.

Las cremas se preparan normalmente a partir del compuesto activo y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol, y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir, a ser posible, un compuesto que potencie la absorción o la penetración del compuesto activo a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

Las emulsiones se preparan normalmente a partir del compuesto activo y una fase oleosa, que puede comprender opcionalmente simplemente un emulsionante (también conocido como emulgente), o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el emulsionante (o emulsionantes) con o sin el estabilizante (o estabilizantes) constituyen la denominada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y/o la grasa constituyen la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema.

Los emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetoestearílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio. La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas, puesto que la solubilidad del compuesto activo en la mayoría de los aceites que probablemente han de usarse en formulaciones de emulsión farmacéutica puede ser muy baja. Por lo tanto, la crema debería ser preferiblemente un producto no graso, que no manche y lavable, con la consistencia adecuada para evitar la filtración desde tubos u otros recipientes. Pueden usarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, mono o dibásicos tales como di-isoadipato, estearato de isocetilo, diéster propilenglicólico de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una combinación de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, siendo los tres últimos los ésteres preferidos. Estos pueden usarse solos o en combinación, dependiendo de las propiedades necesarias. Como alternativa, pueden usarse lípidos de punto de fusión alto tales como parafina blanca blanda y/o parafina líquida, u otros aceites minerales.

Las características divulgadas en la descripción anterior o en las reivindicaciones a continuación o en los dibujos adjuntos, expresadas en sus formas específicas o en términos de un medio para realizar la función divulgada o un método o proceso para obtener los resultados divulgados, según sea apropiado, pueden utilizarse, por separado, o en cualquier combinación de dichas características, para realizar la divulgación en diversas formas de las mismas.

Aunque la divulgación se ha descrito en conjunto con los aspectos de ejemplo descritos anteriormente, muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán evidentes para los expertos en la materia cuando reciban la presente divulgación. En consecuencia, los aspectos de ejemplo de la divulgación expuestas anteriormente se consideran ilustrativas y no limitantes.

Para evitar cualquier duda, cualesquier explicaciones teóricas proporcionadas en el presente documento se proporcionan con el fin de mejorar la comprensión del lector. Los inventores no desean quedar ligados a ninguna de estas explicaciones teóricas.

Cualesquier encabezados de sección utilizados en el presente documento tienen fines solamente organizativos y no deben considerarse limitantes de la materia objeto descrita.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones a continuación, a menos que el contexto requiera otra cosa, las palabras "comprender" e "incluir", y variaciones tales como "comprende", "que comprende" y "que incluye" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Cabe señalar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En el presente documento, los intervalos pueden expresarse como desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otro aspecto incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular constituye otro aspecto. El término "aproximadamente" con respecto a un valor numérico es opcional y significa, por ejemplo, +/- 10 %.

***Ejemplos***

*EJEMPLO 1: LINK TSG6 es más soluble que TSG-6 de longitud completa*

Se compararon la solubilidad y el estado de agregación de TSG-6 de longitud completa y LINK_TSG6 en PBS usando espectrofotometría UV y dispersión dinámica de la luz (DLS) en un intervalo de concentraciones. El LINK_TSG6 era totalmente soluble a 2 mg/ml y no mostraba ninguna agregación a 0,4, 0,8, 1,6 o 3,2 mg/ml. La proteína de longitud completa tenía una solubilidad mucho menor, con menos del 40 % de la proteína restante en solución a 0,4, 0,8, 1,6 y 3,2 mg/ml. La proteína completa también estaba muy agregada a 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 y 3,2 mg/ml. Las mediciones de DLS estaban fuera de intervalo para TSG-6 de longitud completa a 1,6 y 3,2 mg/ml, lo que indica que se estaban formando agregados de más de 25 millones de Da.

*EJEMPLO 2: LINK TSG6 mejora los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco en un modelo de ratón*

Anteriormente se ha demostrado que TSG-6 tópica es tan eficaz en la enfermedad del ojo seco mediada por inflamación como los colirios de ciclosporina (Kim *et al.,* 2016). Para someter a ensayo si el polipéptido LINK_TSG6 era útil en esta indicación, los presentes inventores investigaron sus efectos en el modelo en ratón NOD.B10 del síndrome de Sjögren ocular primario (enfermedad espontánea del ojo seco sin diabetes).

Se trataron ratones NOD.B10.H2$^{b}$ (12 semanas de edad, Jackson Lab), un modelo para el síndrome de Sjögren ocular primario (enfermedad del ojo seco sin diabetes) con LINK_TSG6 administrado por vía tópica durante 7 días. Se usaron ratones C57BL/6 como control negativo, ya que no desarrollan ojo seco espontáneo. Los ratones se trataron mediante la aplicación tópica de 1 µg de LINK_TSG6, en 10 µl de PBS, 4 veces al día (4.V.D.) durante 7 días. Los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de zolazepam-tiletamina (Zoletil®, Virbac, Carros, Francia) y se administraron 10 µl de LINK_TSG6 o de PBS usando una pipeta. Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento de la siguiente manera:

1) Grupo 1 (Control negativo): ratones C57BL/6, 12 semanas de edad (n = 6, 12 ojos), sin tratar

2) Grupo 2 (Control positivo): NOD.B10, 12 semanas de edad (n = 6, 6 ojos) + 10 µl de PBS 4.V.D.

3) Grupo 3 (Grupo experimental): NOD.B10, 12 semanas de edad (n = 8, 8 ojos) + 1 µg de LINK_TSG6 (en 10 µl de PBS) 4.V.D.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la enfermedad del ojo seco, los presentes inventores realizaron los siguientes ensayos:

1) Defectos epiteliales corneales mediante tinción vital (con verde de lisamina) de los sitios defectuosos y puntuación. Después de aplicar una gota de Verde de lisamina B al 3 % en el saco conjuntival lateral inferior de un

ratón, la tinción de la superficie corneal se calificó con ocultación por dos oftalmólogos según el siguiente sistema de puntuación de tinción ocular: puntuación 0 si no hay tinción punteada; puntuación 1 cuando menos de un tercio de la superficie corneal estaba teñida; puntuación 2 cuando dos tercios o menos estaban teñidos; y puntuación 3 cuando más de dos tercios estaban teñidos;

2) Producción de lágrimas lagrimales examinada mediante el ensayo del hilo rojo de fenol;

3) Expresión de citocinas inflamatorias mediante RT PCR en tiempo real en la córnea y la glándula intraorbital; y

4) Recuento de células caliciformes conjuntivales en el fondo de saco conjuntival teñido con PAS. Se contó el número de células teñidas con PAS por 100 µm en cuatro secciones diferentes del ojo del mismo animal y se determinó el recuento promedio en cada ojo como densidad de células caliciformes.

Como se muestra en la Figura 2A, después del tratamiento con LINK_TSG6, los defectos epiteliales corneales se redujeron significativamente ($p < 0,01$). Se produjo una mejora significativa de los defectos epiteliales corneales entre los grupos tratados con PBS y Link_TSG6 ($p < 0,001$).

Como se muestra en la Figura 2B, la producción de lágrimas aumentó significativamente mediante el tratamiento con LINK_TSG6 ($p < 0,01$). Se produjo una mejora significativa de la producción de lágrimas entre los grupos tratados con PBS y LINK_TSG6 ($p < 0,001$).

La Figura 2C muestra que el tratamiento con LINK_TSG6 suprimió significativamente los niveles de ARNm de IFN-γ, TNF-α e IL-1β en la córnea y la glándula intraorbital. Los ojos tratados con LINK_TSG6 tenían niveles de citocinas similares a los de los ratones C57BL/6 de control.

2D muestra que el tratamiento con LINK_TSG6 aumentó significativamente el número de células caliciformes conjuntivales (estas células producen los componentes de la mucina en las lágrimas).

En términos generales, estos resultados demuestran que LINK_TSG6 suprimió significativamente la inflamación, redujo los defectos epiteliales corneales, aumentó la producción de lágrimas y aumentó las células caliciformes conjuntivales en ratones NOD.B10 con ojo seco.

*EJEMPLO 3: Los efectos de LINK TSG6 sobre la enfermedad del ojo seco son dependientes de la dosis*

A los presentes inventores les interesaba saber si los efectos observados en el ejemplo 1 eran dependientes de la dosis. Con este fin, los presentes inventores aplicaron 1, 0,1 o 0,01 µg de LINK_TSG6, en 5 µl de PBS, por vía tópica 4.V.D. durante 7 días a ratones NOD.B10.H2b de 12 semanas de edad (Jackson Lab).

Los ratones se asignaron aleatoriamente a los siguientes grupos de tratamiento:

1) Grupo 1 (Control negativo): ratones C57BL/6, 12 semanas de edad (n = 6, 12 ojos) sin tratar

2) Grupo 2 (Control positivo): NOD.B10 (n = 8, 8 ojos) + 5 µl de PBS 4.V.D.

3) Grupo 3 (Grupo experimental): NOD.B10 (n = 8, 8 ojos) + 1 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl PBS) 4.V.D.

4) Grupo 4 (Grupo experimental): NOD.B10 (n = 8, 8 ojos) + 0,1 µg de LINK_TSG6 4.V.D.

5) Grupo 5 (Grupo experimental): NOD.B10 (n = 8, 8 ojos) + 0,01 µg de LINK_TSG6 4.V.D.

El efecto del tratamiento se determinó según el ejemplo 1.

Como se muestra en la Figura 3A, se cuantificaron los defectos epiteliales corneales en córneas teñidas con verde de lisamina. 1 µg y 0,1 µg de LINK_TSG6 resultaron eficaces para reducir los defectos epiteliales corneales, pero 0,01 µg de LINK_TSG6 no mejoró significativamente los defectos epiteliales corneales.

En la Figura 3B, el ensayo del hilo rojo de fenol indicó que 1 µg y 0,1 µg de LINK_TSG6 fueron eficaces para aumentar la cantidad de producción de lágrimas, pero 0,01 µg de LINK_TSG6 no mejoró significativamente la cantidad de producción de lágrimas.

Como se muestra en las Figuras 3C y D, la dosis más alta de LINK_TSG6 sometida a ensayo, 1 µg, fue más eficaz para suprimir la expresión de TNF-α.

En términos generales, estos resultados demuestran una mejora dependiente de la dosis de los parámetros del ojo seco mediante la aplicación por vía tópica del polipéptido LINK_TSG6 (1 µg más eficaz y 0,01 µg menos eficaz).

Estos efectos también se observaron con dosis más altas de LINK_TSG6. Como se muestra en la Figura 4A, las dosis más altas (1 µg y 10 µg) de LINK_TSG6 presentaron un daño epitelial corneal significativamente menor en comparación con los ratones tratados con PBS. A la dosis más alta, muchos de los ojos tratados con LINK_TSG6 no tienen lesiones corneales (puntuación de 0), igual que los ratones C57BL/6 de control negativo sin tratar. Esto demuestra que LINK_TSG6 puede promover la curación o reparación de lesiones epiteliales.

También se observaron respuestas dependientes de la dosis con respecto a la producción de lágrimas (Figura 4B - obsérvese que incluso la dosis más baja de LINK_TSG6 sometida a ensayo tiene un efecto significativo sobre la producción de lágrimas), la inflamación (Figura 4C) y los números de células caliciformes conjuntivales (Figura 4D).

*EJEMPLO 4: Comparación de los efectos de la proteína TSG-6 de longitud completa y LINK TSG6 sobre la enfermedad del ojo seco*

Los experimentos de los presentes inventores revelaron que el polipéptido LINK_TSG6 era eficaz en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco. A los presentes inventores les interesaba saber cómo se comparaba con TSG-6 de longitud completa (FL) (TSG6 FL). Los presentes inventores compararon dosis molares equivalentes de TSG6 FL y LINK_TSG6, administradas 2x/día (2.V.D).

Se asignaron ratones NOD.B10 y C57BL/6 de 12 semanas de edad aleatoriamente a los siguientes grupos de tratamiento:

1) Grupo 1 NOD.B10 + 5 µl de PBS 2.V.D durante 7 días (control positivo);

2) Grupo 2 NOD.B10 + 5 µl de TSG-6 de longitud completa (TSG6 FL) (R&D Systems) (3,27, 0,327, 0,0327 µg) 2.V.D durante 7 días;

3) Grupo 3 NOD.B10 + 5 µl de LINK_TSG6 (1, 0,1, 0,01 µg) 2.V.D durante 7 días; y

4) Grupo 4 ratones C57BL/6 (control negativo, sin ojo seco).

Se eligieron dosificaciones de 0,01, 0,1 y 1,0 microgramos de LINK_TSG6 según el ejemplo 2. Se usó espectrometría de masas para determinar el peso molecular de la TSG-6 humana recombinante (R&D Systems) como 35,7 kDa. Basándose en esta determinación, los presentes inventores calcularon dosis equimolares de 0,037, 0,37 y 3,7 microgramos para la TSG-6 de longitud completa (TSG6 FL).

Los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco se determinaron según los ejemplos anteriores, en concreto:

1) Tinción verde de lisamina y puntuación del daño epitelial corneal. Después de aplicar una gota de Verde de Lisamina B al 3 % en el saco conjuntival lateral inferior de un ratón, la tinción de la superficie corneal se calificó con ocultación por dos oftalmólogos según el siguiente sistema de puntuación de tinción ocular: puntuación 0 si no hay tinción punteada; puntuación 0,5 para la tinción traza; puntuación 1 cuando menos de un tercio de la superficie corneal estaba teñida; puntuación 2 cuando dos tercios o menos estaban teñidos; y puntuación 3 cuando más de dos tercios estaban teñidos;

2) Ensayo del hilo rojo de fenol para la secreción de lágrimas lagrimales

3) Histología (tinción con PAS conjuntival, inmunotinción con CD3 de la glándula lagrimal)

Como se muestra en la Figura 5A, LINK_TSG6 dio como resultado una reducción significativa en las lesiones epiteliales corneales en comparación con una concentración equimolar de TSG-6 de longitud completa.

Las Figuras 5B, 5C y 5D muestran que la dosis más alta sometida a ensayo, 1 µg de LINK_TSG6, provocó un aumento de la producción de lágrimas, conservó las células caliciformes y redujo el número de focos inflamatorios teñidos con CD3 en la glándula intraorbital, en comparación con una dosis equimolar (3,27 µg) de TSG-6 de longitud completa.

*EJEMPLO 5: Evaluación de LINK TSG6 en un modelo de ojo seco inducido por lesión por desecación y comparación con Restasis.*

Habiendo demostrado la eficacia de LINK_TSG6 en el modelo en ratón NOD.B10 del síndrome de Sjögren ocular primario (enfermedad espontánea del ojo seco sin diabetes), a los presentes inventores les interesaba saber si LINK_TSG6 también era eficaz en el tratamiento de individuos con el trastorno del ojo seco evaporativo ambiental prevalente.

Los presentes inventores usaron un modelo de desecación que emula mejor un ojo seco evaporativo, que es la forma más prevalente de ojo seco, en comparación con el ojo seco similar al síndrome de Sjogren, menos prevalente. Se mantuvo a ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad en una cámara seca y se les inyectó escopolamina por vía

intraperitoneal tres veces al día durante 10 días para inducir lesión por desecación. El flujo de aire procedente de un ventilador eléctrico se introdujo en la jaula a través de la criba durante 24 h y la humedad se mantuvo en un 30-35 % en el interior de la jaula. Los ratones se dividieron en grupos de tratamiento de la siguiente manera:

1) Sin lesiones por desecación (control negativo, 2 ratones, 4 ojos)

2) Grupo 1 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 5 µl de PBS 2.V.D durante 10 días (control positivo)

3) Grupo 2 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 0,1 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días

4) Grupo 3 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 1 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días

5) Grupo 4 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 10 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días

6) Grupo 5 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 5 µl de Restasis (ciclosporina A al 0,05 %) 2.V.D durante 10 días

Después de 10 días, los signos y síntomas del ojo seco se evaluaron de la siguiente manera;

1) Tinción con fluoresceína y puntuación para el daño epitelial corneal (los ratones C57BL/6 son negros y la tinción con fluoresceína es mejor para la visualización que el verde de lisamina)

2) Ensayo del hilo rojo de fenol para la secreción de lágrimas lagrimales

3) Histología (tinción con PAS conjuntival, inmunotinción con CD3 de la glándula lagrimal)

4) Ensayo molecular de la superficie ocular y las glándulas lagrimales (RT-PCR en tiempo real para citocinas inflamatorias)

La lesión por desecación indujo significativamente defectos epiteliales corneales en ratones C57BL/6 ($p < 0,01$), como se muestra en la Figura 6A (predesecación y pretratamiento, que muestra que los animales seleccionados para el tratamiento no tenían lesiones corneales al inicio del estudio) y 6B (postdesecación y postratamiento), y 1 µg de LINK_TSG6 fue eficaz para disminuir los defectos epiteliales corneales con desecación ($p < 0,001$). De manera interesante, Restasis no redujo significativamente los defectos epiteliales corneales en este modelo y 1 µg de LINK_TSG6 fue mejor para disminuir los defectos epiteliales corneales que Restasis ($p < 0,05$).

Como se muestra en la Figura 6C (predesecación y pretratamiento) y 6D (postdesecación y postratamiento), la lesión por desecación redujo significativamente la producción de lágrimas en ratones C57BL/6 ($p < 0,0001$). Al igual que con el modelo en ratón del síndrome de Sjögren ocular primario, 1 µg y 10 µg de LINK_TSG6 fueron eficaces para conservar la producción de lágrimas con desecación ($p < 0,0001$), e incluso 0,1 µg de LINK_TSG6 conservó la producción de lágrimas ($p = 0,0552$). Aunque Restasis fue eficaz para conservar la producción de lágrimas con desecación ($p < 0,05$), es interesante señalar que 1 µg de LINK_TSG6 fue mejor que Restasis para conservar la producción de lágrimas ($p < 0,001$).

Se sabe bien que los linfocitos Th1 y Th17 aumentan en los ganglios linfáticos cervicales de drenaje (DLN, por sus siglas en inglés) con estrés por desecación y que estas células son responsables de inducir el ojo seco. Por lo tanto, los presentes inventores realizaron un análisis por FACS en los ganglios linfáticos cervicales para determinar el nivel de linfocitos Th1 (células IFN-$\gamma^+CD4^+$) y Th17 (células $IL17A^+CD4^+$) en respuesta a los diversos tratamientos. Como se muestra en las Figuras 6E y 6F, LINK_TSG6 también fue eficaz en la supresión de los linfocitos Th1 y Th17 en los ganglios linfáticos cervicales. Restasis no tuvo un efecto supresor de este tipo.

Por lo tanto, estos datos indican que LINK_TSG6 también es eficaz en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco, incluyendo en individuos con el ojo seco evaporativo ambiental prevalente.

*EJEMPLO 6: Evaluación de LINK TSG6 en el ojo seco inducido por lesión por desecación establecido*

Habiendo demostrado que LINK_TSG6 es eficaz en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco, incluyendo en individuos con el ojo seco evaporativo ambiental prevalente, a los presentes inventores les interesaba saber si LINK_TSG6 también era eficaz en el tratamiento de individuos con ojo seco establecido, para revertir los efectos de la enfermedad.

Los presentes inventores usaron el mismo modelo de desecación que en el Ejemplo 5, permitiendo esta vez que la enfermedad del ojo seco se establezca durante una semana antes del tratamiento con LINK_TSG6. LINK_TSG6 se

aplicó a la superficie ocular después de que se hubiera ejercido una lesión por desecación en la superficie ocular. Después, se mantuvo a los ratones en la cámara seca con inyecciones de escopolamina durante los otros 10 días en los que se administraron los tratamientos.

Se mantuvo a ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad en una cámara seca y se les inyectó escopolamina por vía intraperitoneal tres veces al día durante 7 días para establecer el ojo seco. Los ratones se dividieron en grupos de tratamiento de la siguiente manera:

1) Sin lesiones por desecación (control negativo, 2 ratones, 4 ojos)

2) Grupo 1 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 5 µl de PBS 2.V.D durante 10 días (control positivo)

3) Grupo 2 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 0,1 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días

4) Grupo 3 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 1 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días

5) Grupo 4 (5 ratones, 10 ojos): Lesión por desecación + 10 µg de LINK_TSG6 (en 5 µl de PBS) 2.V.D durante 10 días.

Los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco se determinaron según los ejemplos anteriores, en concreto:

1) Tinción con fluoresceína y puntuación para el daño epitelial corneal (los ratones B6 son negros y la tinción con fluoresceína es mejor para la visualización que el verde de lisamina).;

2) Ensayo del hilo rojo de fenol para la secreción de lágrimas lagrimales; y

3) Histología (tinción con PAS conjuntival, inmunotinción con CD3 de la glándula lagrimal).

Como se muestra en la Figura 7A LINK_TSG6 fue eficaz para disminuir los defectos epiteliales corneales en todas las concentraciones sometidas a ensayo. Como se muestra en la Figura 7B, en todas las concentraciones sometidas a ensayo, LINK_TSG6 fue eficaz para aumentar la producción de lágrimas acuosas. Se observaron cambios significativos incluso en la concentración más baja sometida a ensayo.

La Figura 7C demuestra que 1 µg y 10 µg de LINK_TSG6 dieron como resultado un aumento del número de células caliciformes en comparación con el control, restaurándose a niveles comparables a los observados en ausencia de desecación.

Así mismo, como se muestra en la Figura 7D, el tratamiento con LINK_TSG6 fue eficaz para suprimir el nivel de ARNm de MMP-9 en la superficie ocular.

Por lo tanto, estos datos indican que LINK_TSG6 es eficaz en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco establecido, además de reducir la gravedad de las lesiones por desecación. Estos datos respaldan el uso de LINK_TSG6 para el tratamiento de individuos con trastorno del ojo seco, incluyendo en individuos con el ojo seco evaporativo ambiental prevalente.

*EJEMPLO 7: Evaluación de LINK TSG6 en un modelo de ojo seco y comparación con Restasis.*

Habiendo demostrado la superioridad de LINK_TSG6 frente a Restasis en el tratamiento del ojo seco evaporativo, los presentes inventores estaban interesados en comparar LINK_TSG6 con Restasis en el modelo en ratón NOD.B10 del síndrome de Sjögren ocular primario (enfermedad del ojo seco espontánea sin diabetes), como se usa en el Ejemplo 4.

Se asignaron ratones NOD.B10 y C57BL/6 de 12 semanas de edad aleatoriamente a los siguientes grupos de tratamiento:

1) Grupo 1 ratones C57BL/6 (control negativo, sin ojo seco/desecación).

2) Grupo 2 NOD.B10 + 5 µl de PBS 2.V.D durante 7 días (control positivo);

3) Grupo 3 NOD.B10 + 5 µl de LINK_TSG6 (0,1, 1, 10 µg/5 µl) 2.V.D durante 7 días; y

4) Grupo 4 NOD.B10 + 5 µl de Restasis 2.V.D durante 7 días;

Los signos y síntomas de la enfermedad del ojo seco se determinaron según los ejemplos anteriores, en concreto:

1) Tinción verde de lisamina y puntuación del daño epitelial corneal.

2) Ensayo del hilo rojo de fenol para la secreción de lágrimas lagrimales

3) Histología (tinción con PAS conjuntival, inmunotinción con CD3 de la glándula lagrimal)

Como se muestra en la Figura 8B y D, y de acuerdo con los estudios de los presentes inventores del Ejemplo 4, LINK_TSG6 dio como resultado una reducción significativa de las lesiones epiteliales corneales y un aumento de la producción de lágrimas en el modelo en ratón NOD.B10 del síndrome de Sjogren ocular primario. Así mismo, LINK_TSG6 promovió la curación en mayor medida que Restasis tanto en la dosis de 1 como en la de 10 µg, dando como resultado la reducción de lesiones corneales, la conservación del número de células caliciformes y la reducción del número de focos inflamatorios teñidos con CD3 en la glándula intraorbital, en comparación con Restasis. Esto demuestra que incluso a las dosis más bajas sometidas a ensayo, LINK_TSG6 fue mejor que Restasis en el tratamiento del ojo seco en el modelo en ratón NOD.B10 de síndrome de Sjögren ocular primario (enfermedad espontánea del ojo seco sin diabetes), como se observó previamente en la prevención del desarrollo del ojo seco evaporativo o en el tratamiento del establecido. Estos datos respaldan adicionalmente el uso de LINK_TSG6 para el tratamiento de individuos con trastorno del ojo seco.

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido LINK_TSG6 para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco, en donde el polipéptido LINK_TSG6 consiste en (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9, o (ii) una secuencia de aminoácidos de hasta 100 aminoácidos de longitud que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9.

2. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento o la prevención de un trastorno de la superficie ocular tal como la enfermedad del ojo seco comprende uno o más efectos seleccionados del grupo que consiste en:

la curación de los defectos epiteliales corneales;
el aumento de la producción de lágrimas;
la supresión de la inflamación; y
un mayor número de células caliciformes conjuntivales.

3. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el tratamiento comprende la administración tópica del polipéptido LINK_TSG6 en el ojo.

4. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 dos veces al día, opcionalmente en donde el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 más de dos veces al día, opcionalmente en donde el tratamiento comprende administrar el polipéptido LINK_TSG6 menos de cuatro veces al día.

5. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el polipéptido LINK_TSG6 se formula en forma de colirio.

6. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde LINK_TSG6 se coadministra con uno o más de prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast (Xiidra™) o lágrimas artificiales.

7. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se administran aproximadamente 10 µg-200 µg de polipéptido LINK_TSG6 por ojo, preferentemente se administran 120 µg-150 µg del polipéptido LINK_TSG6 por ojo.

8. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la supresión de la inflamación comprende una disminución de la producción de uno o más citocinas proinflamatorias en la córnea o en las glándulas lagrimales intraorbitales, las citocinas proinflamatorias seleccionadas opcionalmente de TNF-α, IL-6, IFN-γ e IL-1β.

9. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco comprende la curación de defectos epiteliales corneales, el aumento de la producción de lágrimas, la supresión de la inflamación o el aumento del número de células caliciformes conjuntivales en comparación con los defectos epiteliales corneales, la producción de lágrimas, la inflamación o el número de células caliciformes conjuntivales antes de la administración del polipéptido LINK_TSG6.

10. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el tratamiento o la prevención de la enfermedad del ojo seco comprende la curación de defectos epiteliales corneales, el aumento de la producción de lágrimas, la supresión de la inflamación o el aumento del número de células caliciformes conjuntivales en comparación con los defectos epiteliales corneales, la producción de lágrimas, la inflamación o el número de células caliciformes conjuntivales de un individuo de control tratado con proteína TSG-6 de longitud completa.

11. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el individuo que se está tratando tiene el síndrome de Sjögren.

12. El polipéptido LINK_TSG6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende la administración de un colirio que comprende LINK_TSG6.

13. Una formulación de colirio que comprende el polipéptido LINK_TSG6, en donde el polipéptido LINK_TSG6 consiste en (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9, o (ii) una secuencia de aminoácidos de hasta 100 aminoácidos de longitud que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 9.

14. La formulación de colirio de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende entre 240 µg/ml y 3000 µg/ml, preferentemente entre 2400 µg/ml y 3000 µg/ml de polipéptido LINK_TSG6.

15. La formulación de colirio de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14 que comprende además prednisolona, ciclosporina, Lifitegrast o lágrimas artificiales.

| SEQ ID NO | Descripción | Secuencia |
|---|---|---|
| 1 | Secuencia de ácido nucleico que codifica la variante alotípica de Q144 de longitud completa de TSG-6 humano. | cagtcacatt tcagccactg ctctgagaat ttgtgagcag cccctaacag gctgttactt 60<br><br>cactacaact gacgat atg atc atc tta att tac tta ttt ctc ttg cta tgg 112<br>Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp<br>1 5 10<br><br>gaa gac act caa gga tgg gga ttc aag gat gga att ttt cat aac tcc 160<br>Glu Asp Thr Gln Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser<br>15 20 25<br><br>ata tgg ctt gaa cga gca gcc ggt gtg tac cac aga gaa gca cgg tct 208<br>Ile Trp Leu Glu Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser<br>30 35 40<br><br>ggc aaa tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt 256<br>Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe<br>45 50 55 60<br><br>gaa ggc ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc aga aaa 304<br>Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys<br>65 70 75<br><br>att gga ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc aga gtt 352<br>Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val<br>80 85 90<br><br>gga tac ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act 400<br>Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr<br>95 100 105<br><br>ggc att att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa aga tgg gat 448<br>Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp<br>110 115 120<br><br>gcc tat tgc tac aac cca cac gca aag gag tgt ggt ggc gtc ttt aca 496<br>Ala Tyr Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr<br>125 130 135 140<br><br>gat cca aag caa att ttt aaa tct cca ggc ttc cca aat gag tac gaa 544<br>Asp Pro Lys Gln Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu<br>145 150 155<br><br>gat aac caa atc tgc tac tgg cac att aga ctc aag tat ggt cag cgt 592<br>Asp Asn Gln Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg<br>160 165 170<br><br>att cac ctg agt ttt tta gat ttt gac ctt gaa gat gac cca ggt tgc 640<br>Ile His Leu Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys<br>175 180 185<br><br>ttg gct gat tat gtt gaa ata tat gac agt tac gat gat gtc cat ggc 688<br>Leu Ala Asp Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly<br>190 195 200<br><br>ttt gtg gga aga tac tgt gga gat gag ctt cca gat gac atc atc agt 736<br>Phe Val Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser<br>205 210 215 220<br><br>aca gga aat gtc atg acc ttg aag ttt cta agt gat gct tca gtg aca 784<br>Thr Gly Asn Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr<br>225 230 235<br><br>gct gga ggt ttc caa atc aaa tat gtt gca atg gat cct gta tcc aaa 832<br>Ala Gly Gly Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys<br>240 245 250<br><br>tcc agt caa gga aaa aat aca agt act act tct act gga aat aaa aac 880<br>Ser Ser Gln Gly Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn<br>255 260 265 |

| | | |
|---|---|---|
| | | ttt tta gct gga aga ttt agc cac tta taa aaaaaaaaaa aaggatgatc 930<br>Phe Leu Ala Gly Arg Phe Ser His Leu<br>270 275<br><br>aaaacacaca gtgtttatgt tggaatcttt tggaactcct ttgatctcac tgttattatt 990<br><br>aacatttatt tattattttt ctaaatgtga aagcaataca taatttaggg aaaattggaa 1050<br><br>aatataggaa actttaaacg agaaaatgaa acctctcata atcccactgc atagaaataa 1110<br><br>caagcgttaa catttccata ttttttcctt tcagtcattt ttctatttgt ggtatatgta 1170<br><br>tatatgtacc tatatgtatt tgcatttgaa attttggaat cctgctctat gtacagtttt 1230<br><br>gtattatact ttttaaatct tgaactttat aaacattttc tgaaatcatt gattattcta 1290<br><br>caaaaacatg attttaaaca gctgtaaaat attctatgat atgaatgttt tatgcattat 1350<br><br>ttaagcctgt ctctattgtt ggaatttcag gtcattttca taaatattgt tgcaataaat 1410<br><br>atcctttgaac acaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440 |
| 2 | Secuencia de aminoácidos de la variante alotípica de Q144 de longitud completa de TSG-6 humano. Esta variante alotípica tiene un resto glutamina (Q) en la posición 144. Es la variante alotípica más común y se encuentra en aproximadamente el 86 % de la población caucásica (Nentwich *et al.* (2002) 277, 15354-15362). | Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp Glu Asp Thr Gln<br>1 5 10 15<br><br>Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu<br>20 25 30<br><br>Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys<br>35 40 45<br><br>Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His<br>50 55 60<br><br>Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His<br>65 70 75 80<br><br>Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile<br>85 90 95<br><br>Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp<br>100 105 110<br><br>Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr<br>115 120 125<br><br>Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Gln<br>130 135 140<br><br>Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile<br>145 150 155 160<br><br>Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser<br>165 170 175<br><br>Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr<br>180 185 190<br><br>Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg<br>195 200 205<br><br>Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val<br>210 215 220<br><br>Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe<br>225 230 235 240<br><br>Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly<br>245 250 255<br><br>Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly<br>260 265 270<br><br>Arg Phe Ser His Leu<br>275 |

| | | |
|---|---|---|
| 3 | La secuencia de aminoácidos de la variante alotípica de Q144 de TSG-6 humano sin la secuencia señal (corresponde a los restos 18-277 de la SEQ ID NO: 2). | Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu Arg<br>1 5 10 15<br><br>Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu<br>20 25 30<br><br>Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu<br>35 40 45<br><br>Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val<br>50 55 60<br><br>Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile Val<br>65 70 75 80<br><br>Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp Tyr<br>85 90 95<br><br>Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr Asn<br>100 105 110<br><br>Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Gln Ile<br>115 120 125<br><br>Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile Cys<br>130 135 140<br><br>Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser Phe<br>145 150 155 160<br><br>Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr Val<br>165 170 175<br><br>Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg Tyr<br>180 185 190<br><br>Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val Met<br>195 200 205<br><br>Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe Gln<br>210 215 220<br><br>Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly Lys<br>225 230 235 240<br><br>Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly Arg<br>245 250 255<br><br>Phe Ser His Leu<br>260 |
| 4 | La secuencia de ácido nucleico que codifica la variante alotípica de R144 de longitud completa de TSG-6 humano. | cagtcacatt tcagccactg ctctgagaat ttgtgagcag cccctaacag gctgttactt 60<br><br>cactacaact gacgat atg atc atc tta att tac tta ttt ctc ttg cta tgg 112<br>Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp<br>1 5 10<br><br>gaa gac act caa gga tgg gga ttc aag gat gga att ttt cat aac tcc 160<br>Glu Asp Thr Gln Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser<br>15 20 25<br><br>ata tgg ctt gaa cga gca gcc ggt gtg tac cac aga gaa gca cgg tct 208<br>Ile Trp Leu Glu Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser<br>30 35 40<br><br>ggc aaa tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt 256<br>Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe<br>45 50 55 60<br><br>gaa ggc ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc aga aaa 304<br>Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys<br>65 70 75<br><br>att gga ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc aga gtt 352<br>Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val |

| | | |
|---|---|---|
| | | 80 85 90<br><br>gga tac ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act 400<br>Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr<br>95 100 105<br><br>ggc att att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa aga tgg gat 448<br>Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp<br>110 115 120<br><br>gcc tat tgc tac aac cca cac gca aag gag tgt ggt ggc gtc ttt aca 496<br>Ala Tyr Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr<br>125 130 135 140<br><br>gat cca aag cgg att ttt aaa tct cca ggc ttc cca aat gag tac gaa 544<br>Asp Pro Lys Arg Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu<br>145 150 155<br><br>gat aac caa atc tgc tac tgg cac att aga ctc aag tat ggt cag cgt 592<br>Asp Asn Gln Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg<br>160 165 170<br><br>att cac ctg agt ttt tta gat ttt gac ctt gaa gat gac cca ggt tgc 640<br>Ile His Leu Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys<br>175 180 185<br><br>ttg gct gat tat gtt gaa ata tat gac agt tac gat gat gtc cat ggc 688<br>Leu Ala Asp Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly<br>190 195 200<br><br>ttt gtg gga aga tac tgt gga gat gag ctt cca gat gac atc atc agt 736<br>Phe Val Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser<br>205 210 215 220<br><br>aca gga aat gtc atg acc ttg aag ttt cta agt gat gct tca gtg aca 784<br>Thr Gly Asn Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr<br>225 230 235<br><br>gct gga ggt ttc caa atc aaa tat gtt gca atg gat cct gta tcc aaa 832<br>Ala Gly Gly Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys<br>240 245 250<br><br>tcc agt caa gga aaa aat aca agt act act tct act gga aat aaa aac 880<br>Ser Ser Gln Gly Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn<br>255 260 265<br><br>ttt tta gct gga aga ttt agc cac tta taa aaaaaaaaaa aaggatgatc 930<br>Phe Leu Ala Gly Arg Phe Ser His Leu<br>270 275<br><br>aaaacacaca gtgtttatgt tggaatcttt tggaactcct ttgatctcac tgttattatt 990<br><br>aacatttatt tattattttt ctaaatgtga aagcaataca taatttaggg aaaattggaa 1050<br><br>aatataggaa actttaaacg agaaaatgaa acttctcata atcccactgc atagaaataa 1110<br><br>caagcgttaa cattttcata ttttttttct tcagtcattt ttctatttgt ggtatatgta 1170<br><br>tatatgtacc tatatgtatt tgcatttgaa attttggaat cctgctctat gtacagtttt 1230<br><br>gtattatact tttaaaatct tgaactttat aaacattttc tgaaatcatt gattattcta 1290<br><br>caaaaacatg attttaaaca gctgtaaaat attctatgat atgaatgttt tatgcattat 1350<br><br>ttaagcctgt ctctattgtt ggaatttcag gtcatttttca taaatattgt tgcaataaat 1410<br><br>atcctttgaac acaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440 |
| 5 | La secuencia de aminoácidos de la variante alotípica de R144 | Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp Glu Asp Thr Gln<br>1 5 10 15<br><br>Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu<br>20 25 30<br><br>Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys |

| | | |
|---|---|---|
| | de longitud completa de TSG-6 humano. Esta variante alotípica tiene un resto arginina (R) en la posición 144. Es la variante alotípica menos común y se encuentra en aproximadamente el 14 % de la población caucásica (Nentwich *et al.* (2002) 277, 15354-15362). | 35 40 45<br>Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His<br>50 55 60<br>Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His<br>65 70 75 80<br>Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile<br>85 90 95<br>Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp<br>100 105 110<br>Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr<br>115 120 125<br>Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Arg<br>130 135 140<br>Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile<br>145 150 155 160<br>Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser<br>165 170 175<br>Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr<br>180 185 190<br>Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg<br>195 200 205<br>Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val<br>210 215 220<br>Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe<br>225 230 235 240<br>Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly<br>245 250 255<br>Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly<br>260 265 270<br>Arg Phe Ser His Leu<br>275 |
| 6 | La secuencia de aminoácidos de la variante alotípica de R144 de TSG-6 humano sin la secuencia señal (corresponde a los restos 18-277 de la SEQ ID NO: 5). | Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu Arg<br>1 5 10 15<br>Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu<br>20 25 30<br>Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu<br>35 40 45<br>Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val<br>50 55 60<br>Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile Val<br>65 70 75 80<br>Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp Tyr<br>85 90 95<br>Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr Asn<br>100 105 110<br>Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Arg Ile<br>115 120 125<br>Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile Cys<br>130 135 140<br>Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser Phe |

| | | |
|---|---|---|
| | | 145 150 155 160<br>Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr Val<br>165 170 175<br>Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg Tyr<br>180 185 190<br>Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val Met<br>195 200 205<br>Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe Gln<br>210 215 220<br>Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly Lys<br>225 230 235 240<br>Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly Arg<br>245 250 255<br>Phe Ser His Leu<br>260 |
| 7 | La secuencia de aminoácidos del módulo Link de TSG-6 humano (corresponde a los restos 37-128 de las SEQ ID NO: 2 y 5). | Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala<br>1 5 10 15<br>Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr<br>20 25 30<br>Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala<br>35 40 45<br>Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly<br>50 55 60<br>Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg<br>65 70 75 80<br>Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr<br>85 90 |
| 8 | Secuencia de ácido nucleico que codifica Link_TSG6 utilizada en los Ejemplos (Day *et al.* (1996) *Protein Expr. Pruif.* 8, 1-16). | aggagatata cat atg ggt gtg tac cac cgt gaa gca cgg tct ggc aaa 49<br>Met Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys<br>1 5 10<br>tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt gaa ggc 97<br>Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly<br>15 20 25<br>ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc cgt aaa att gga 145<br>Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly<br>30 35 40<br>ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc cgt gtt gga tac 193<br>Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr<br>45 50 55 60<br>ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act ggc att 241<br>Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile<br>65 70 75<br>att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa cgt tgg gat gcc tat 289<br>Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr<br>80 85 90<br>tgc tac aac cca cac gca aag taa gaattc 319<br>Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys<br>95 |
| 9 | La secuencia de aminoácidos de Link_TSG6 utilizada en los Ejemplos. | Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu Thr<br>Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu Ala<br>Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val Cys<br>Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile Val Lys |

| | | |
|---|---|---|
| | Restos 2-93 de la SEQ ID NO: 9 corresponden a la SEQ ID NO: 7 (restos 37-128 de las SEQ ID NO: 2 y 5). | Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp Tyr Gly<br>Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr Asn Pro<br>His Ala Lys |

***Figura 1***

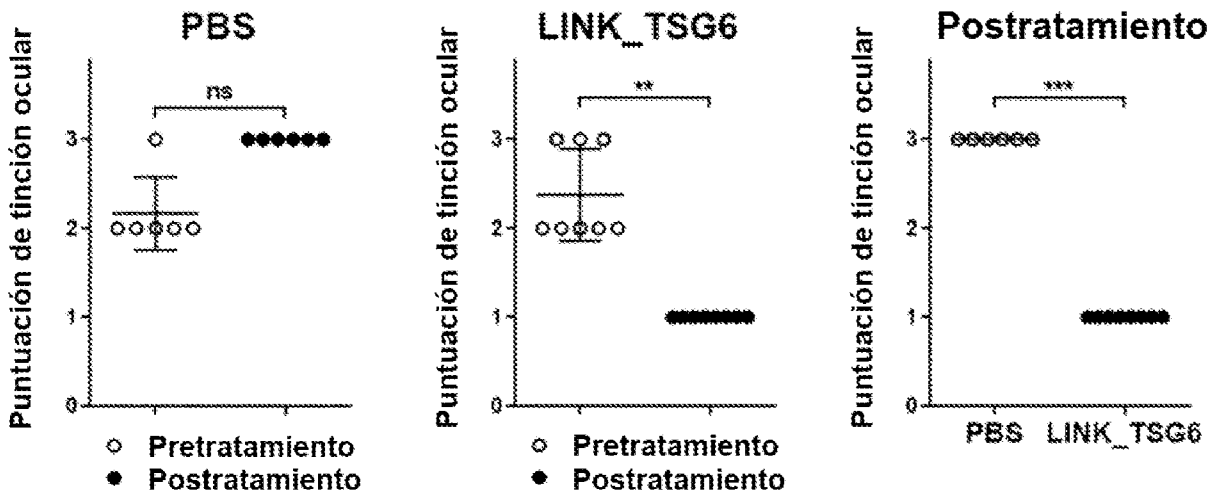



*Figura 2A*

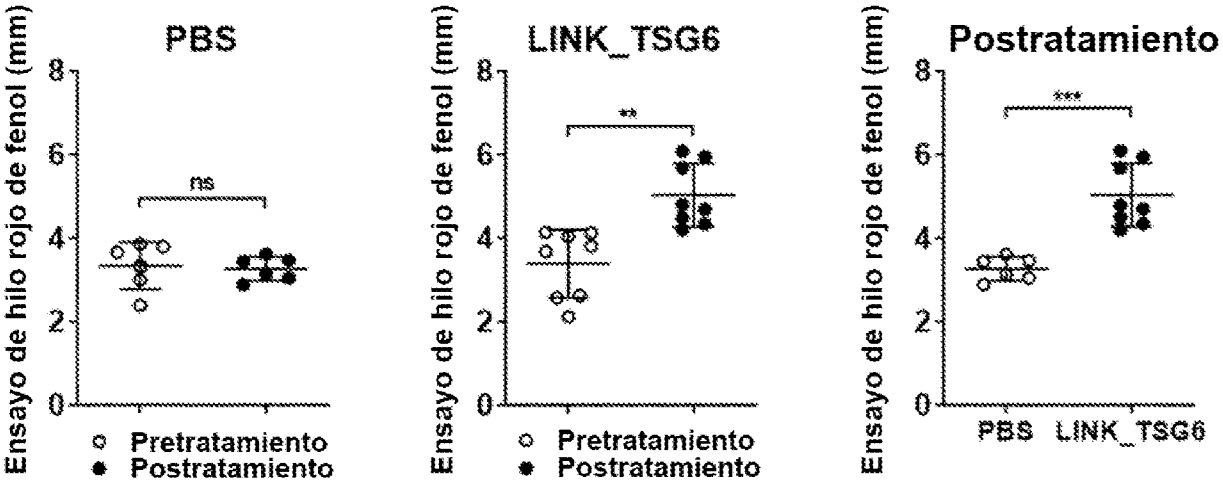



*Figura 2B*

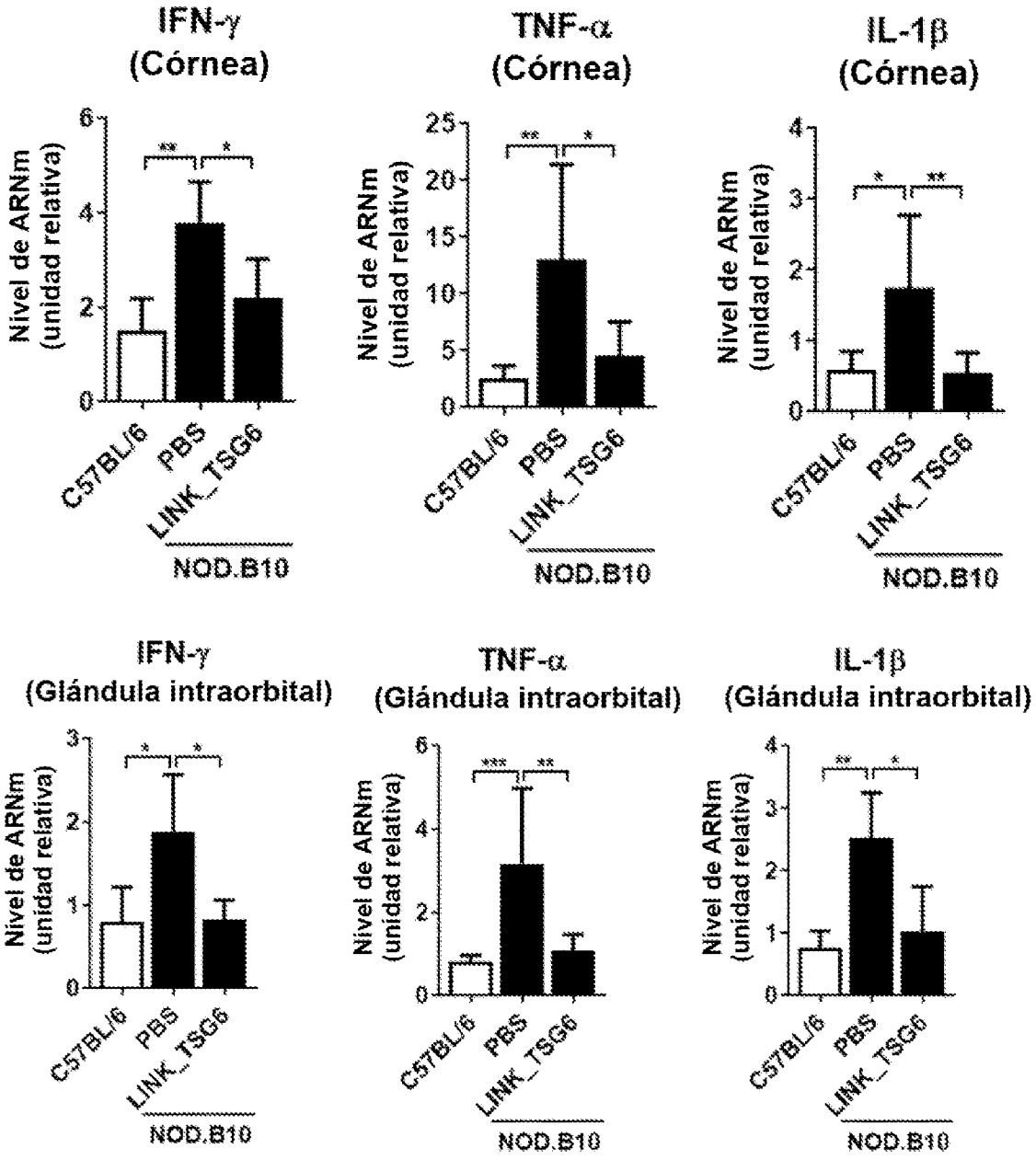

IFN-γ
(Córnea)
TNF-α
(Córnea)
IL-1β
(Córnea)
Nivel de ARNm
(unidad relativa)
C57BL/6
PBS
LINK_TSG6
NOD.B10
IFN-γ
(Glándula intraorbital)
TNF-α
(Glándula intraorbital)
IL-1β
(Glándula intraorbital)

***Figura 2C***

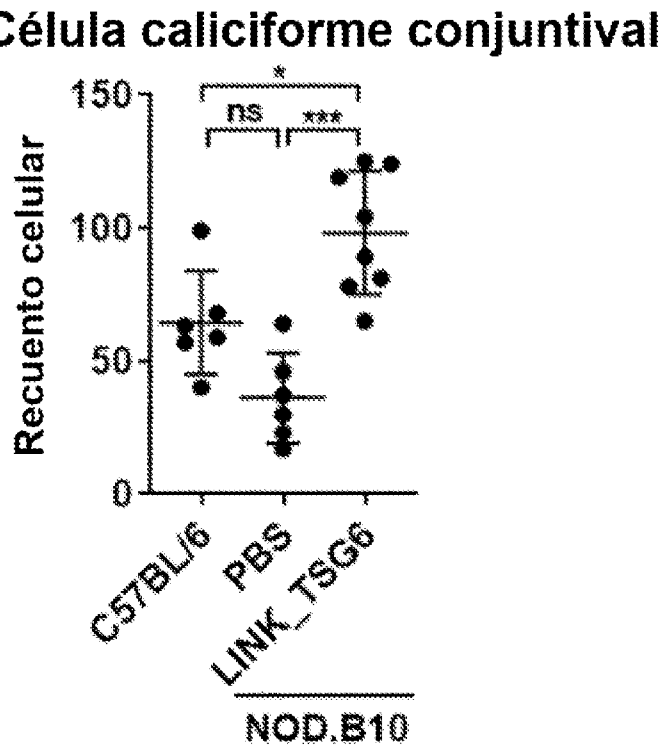

Célula caliciforme conjuntival
Recuento celular
150
100
50
0
*
ns
***
C57BL/6
PBS
LINK_TSG6
NOD.B10

*Figura 2D*

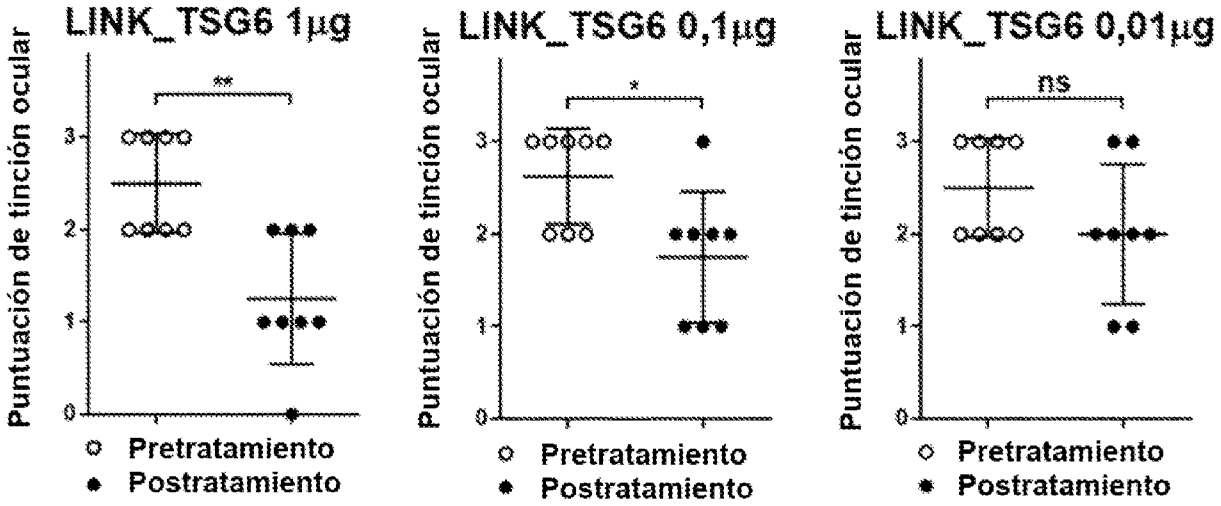



*Figura 3A*

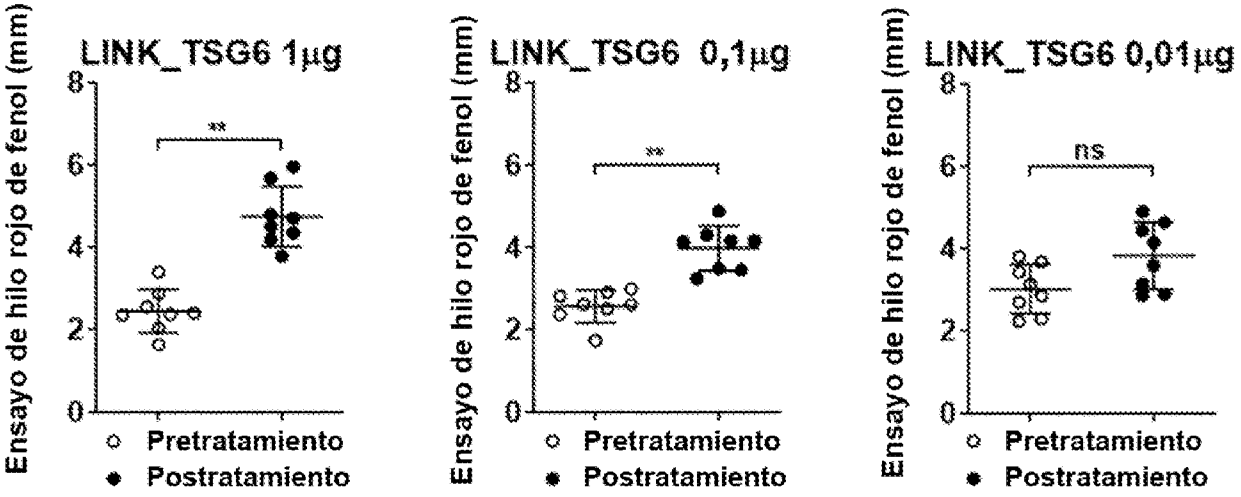



*Figura 3B*

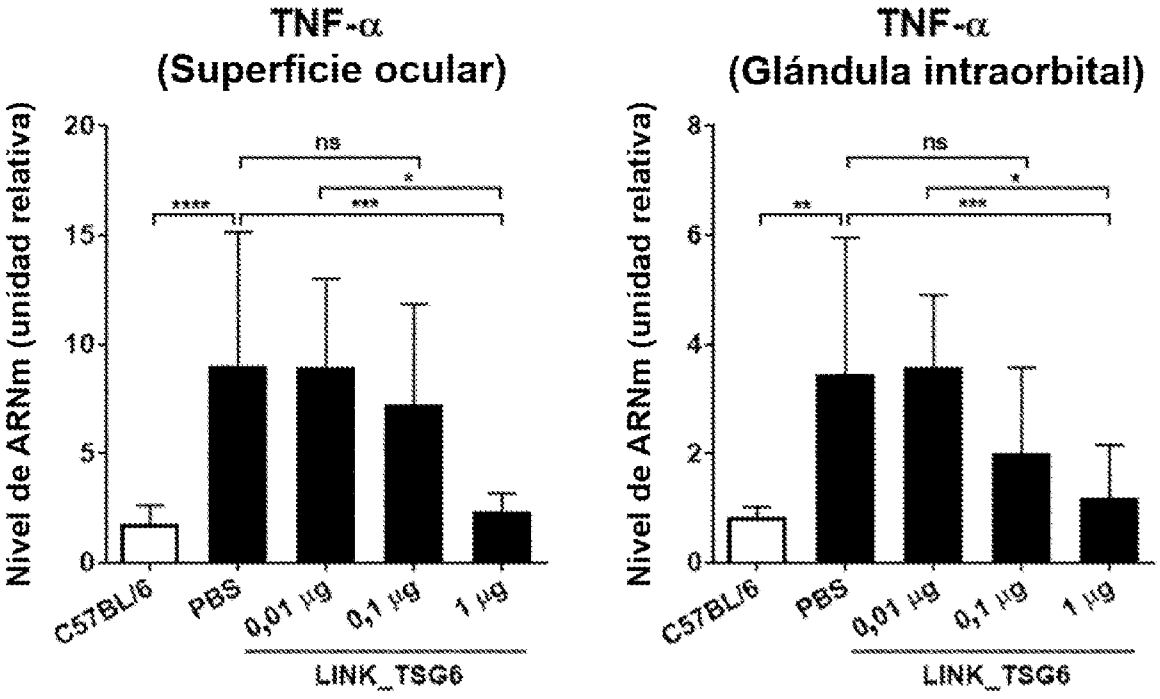

TNF-α
(Superficie ocular)
Nivel de ARNm (unidad relativa)
20
15
10
5
0
ns
*
****
***
C57BL/6
PBS
0,01 µg
0,1 µg
1 µg
LINK_TSG6
TNF-α
(Glándula intraorbital)
Nivel de ARNm (unidad relativa)
8
6
4
2
0
ns
*
**
***
C57BL/6
PBS
0,01 µg
0,1 µg
1 µg
LINK_TSG6

***Figura 3C***

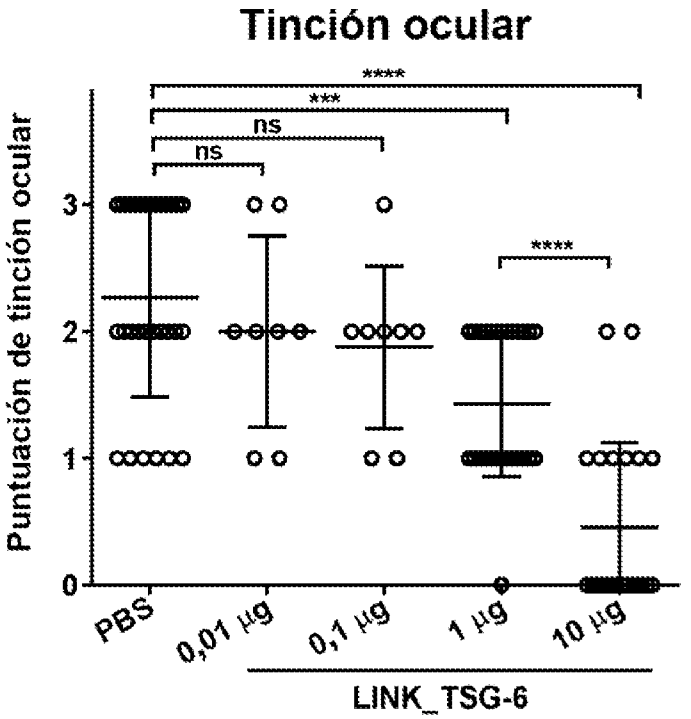



*Figura 4A*

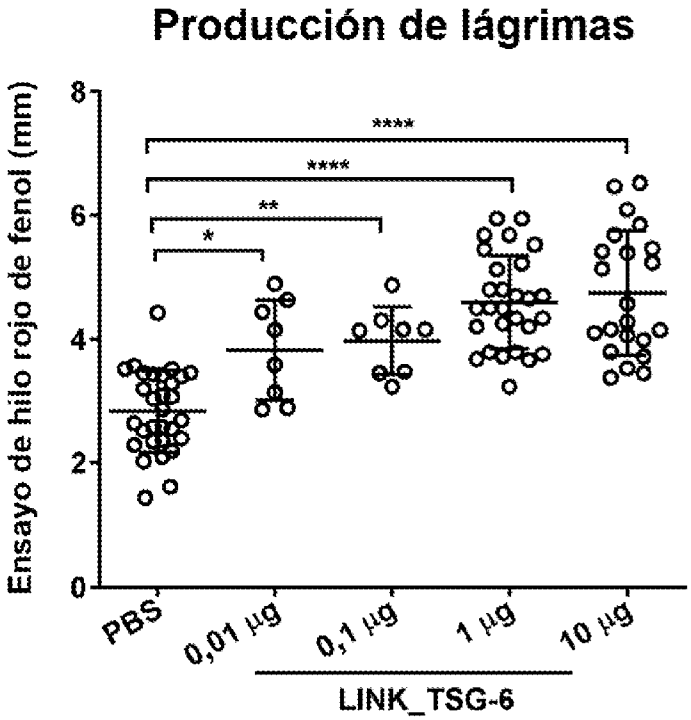



*Figura 4B*

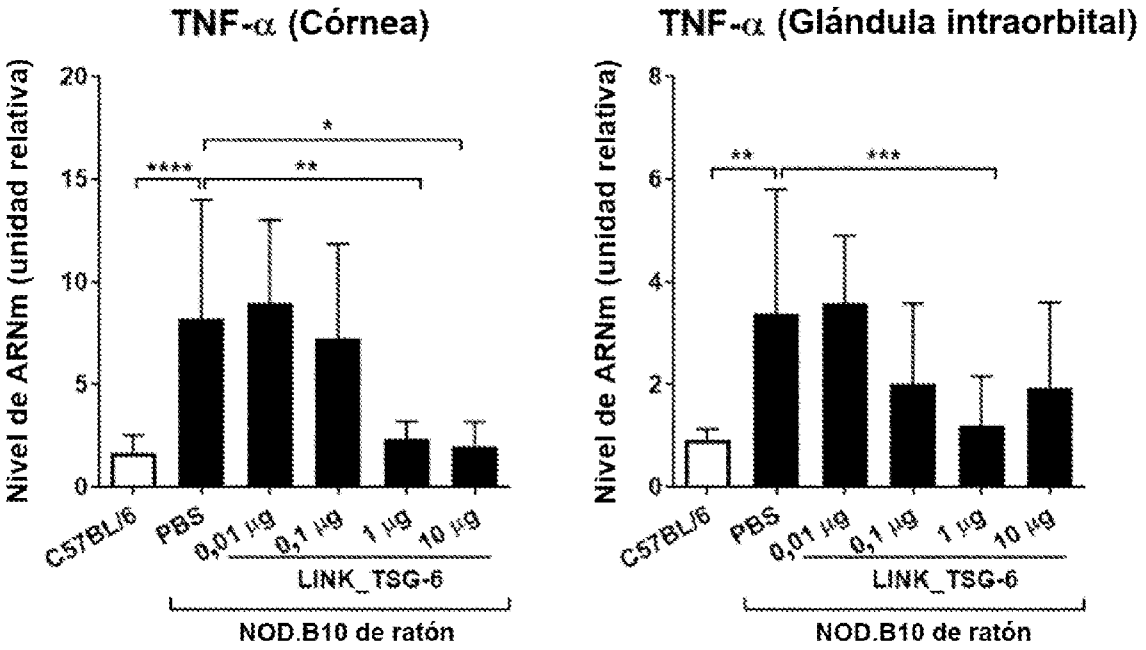



*Figura 4C*

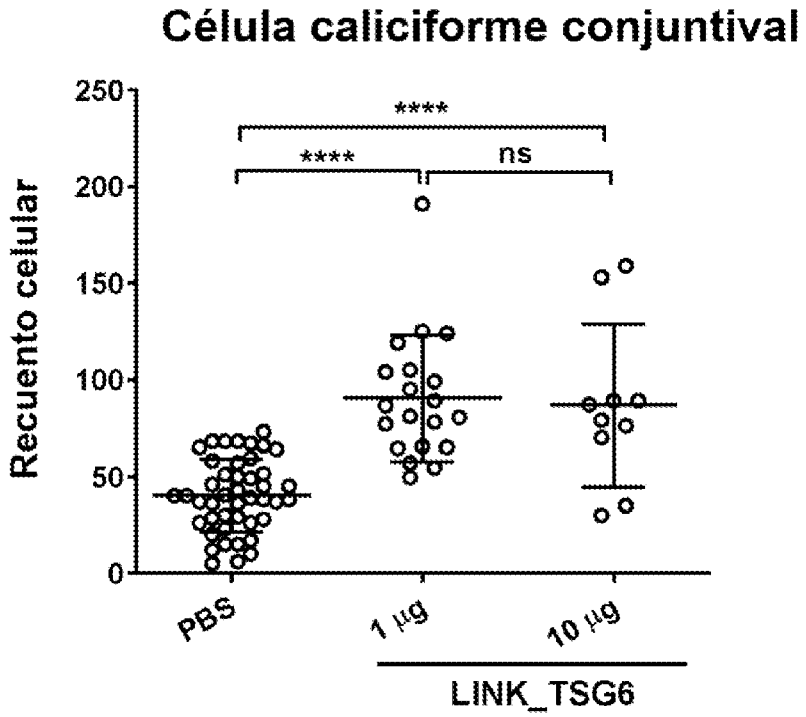



*Figura 4D*

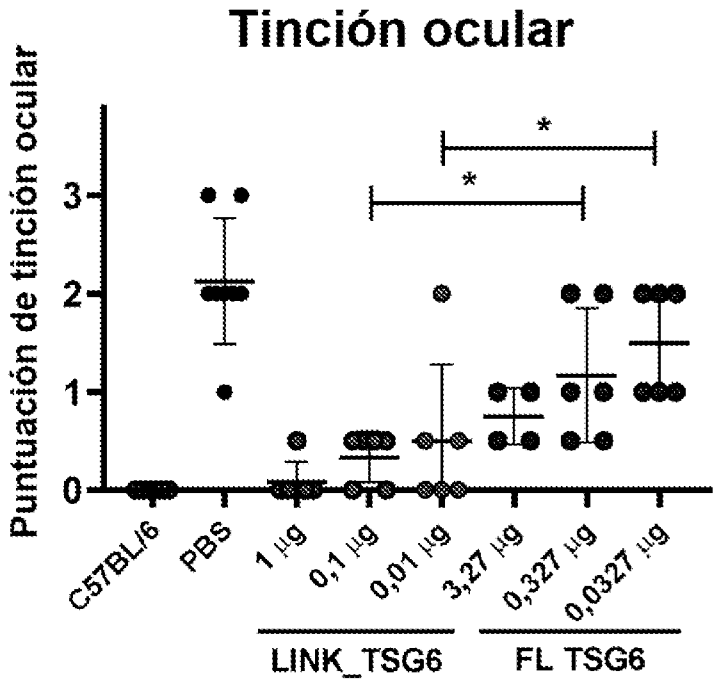



*Figura 5A*

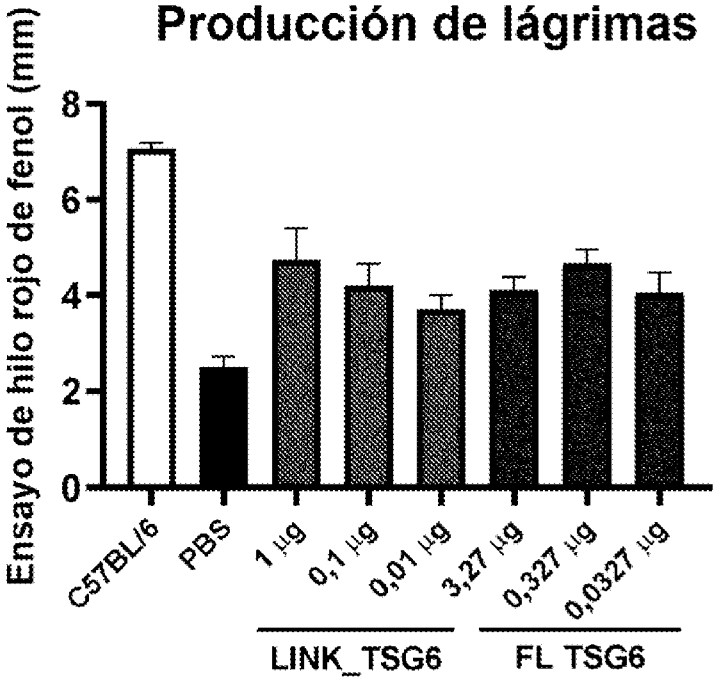



*Figura 5B*

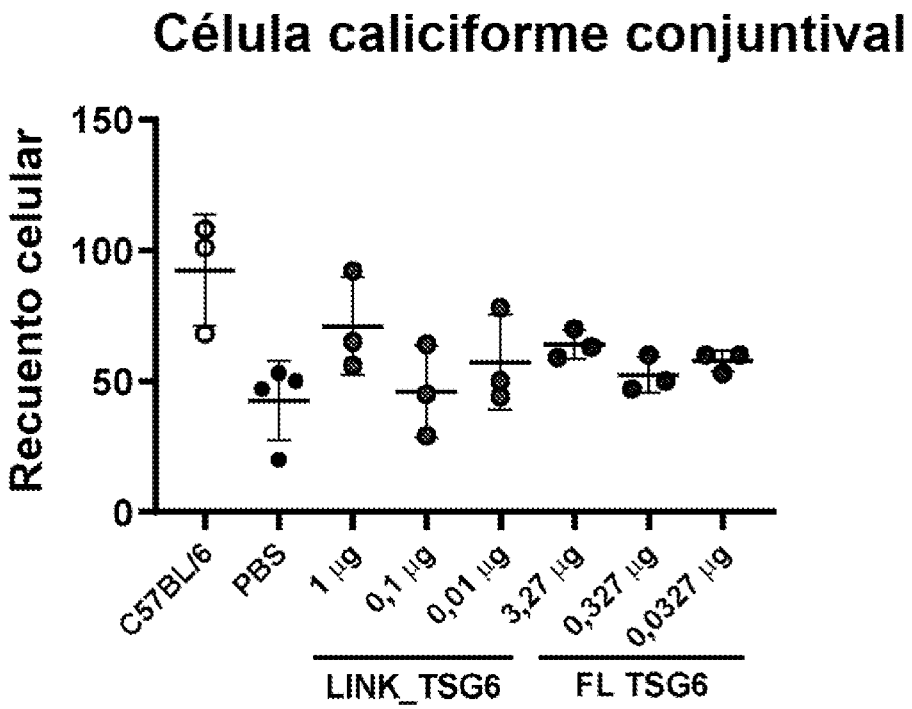



*Figura 5C*

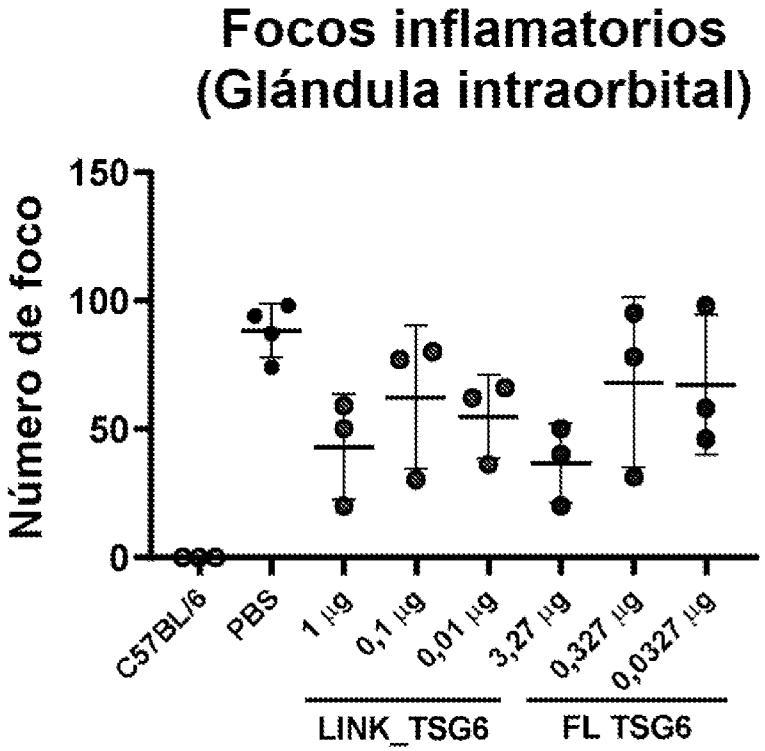



*Figura 5D*

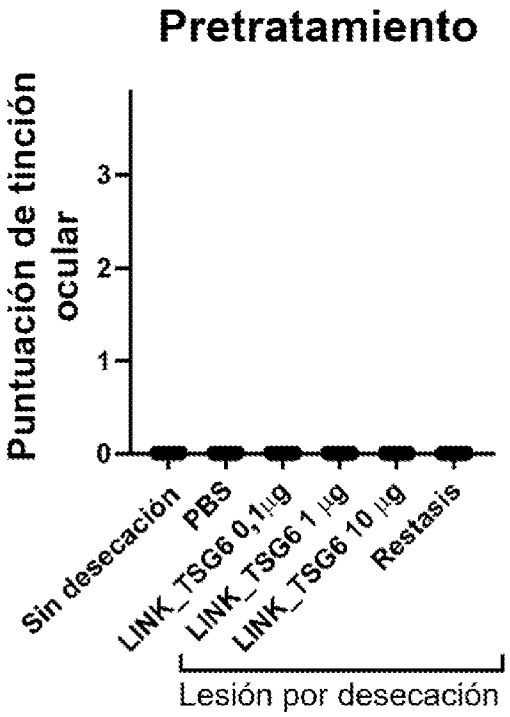



*Figura 6A*

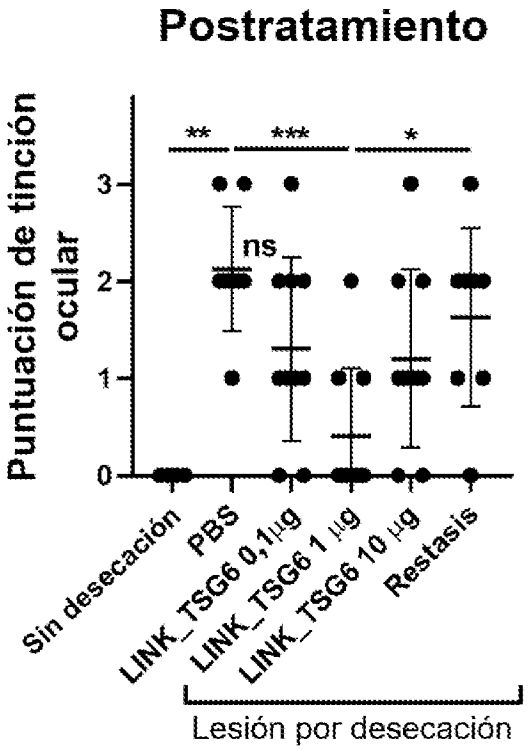



*Figura 6B*

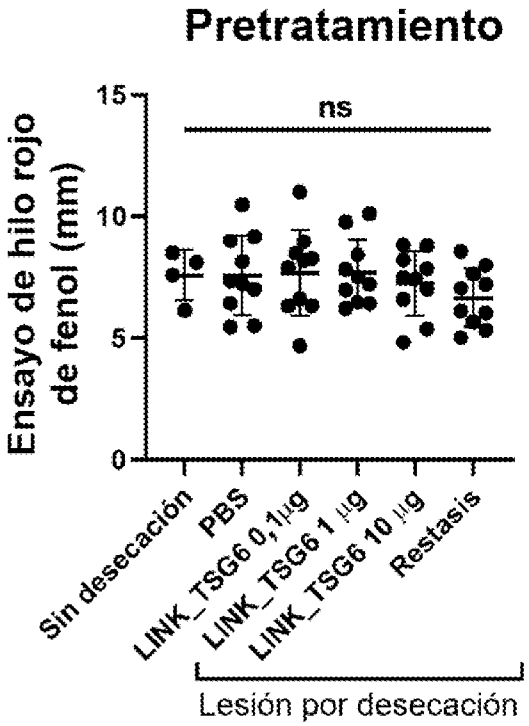



*Figura 6C*

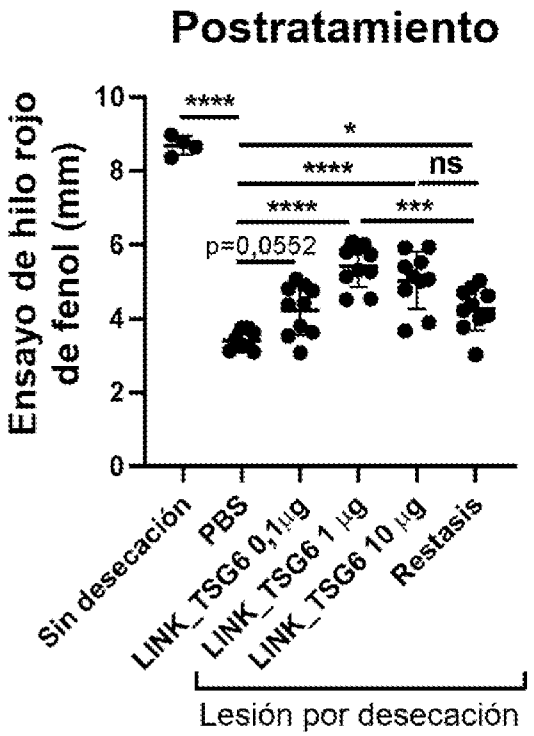



*Figura 6D*

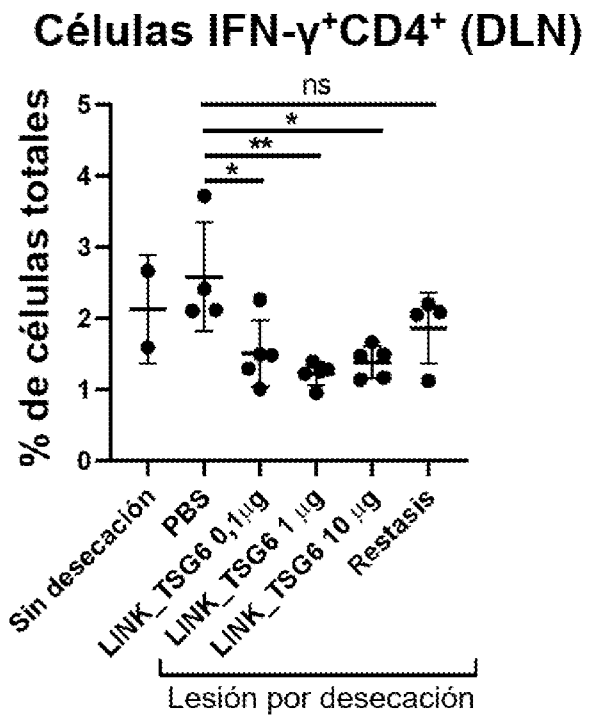



*Figura 6E*

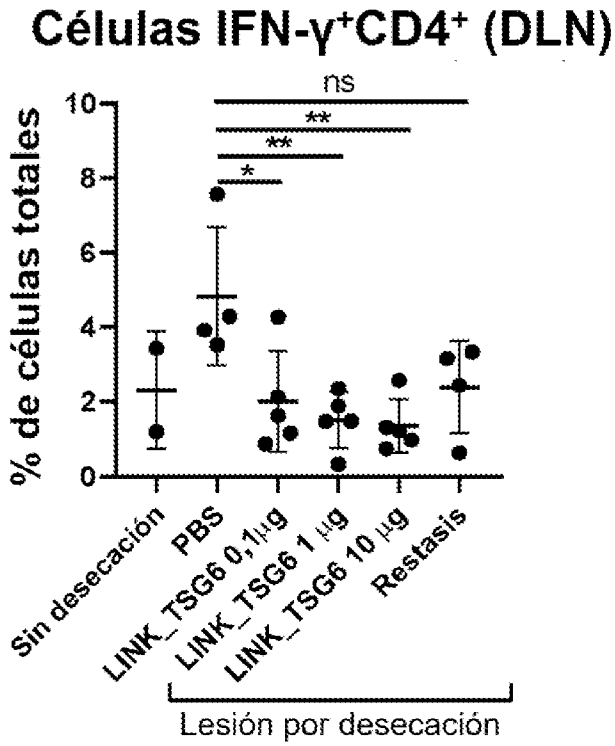



*Figura 6F*

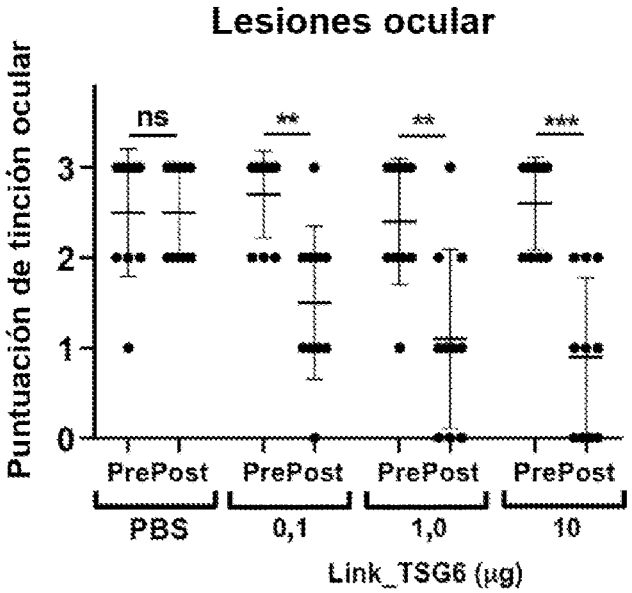



*Figura 7A*

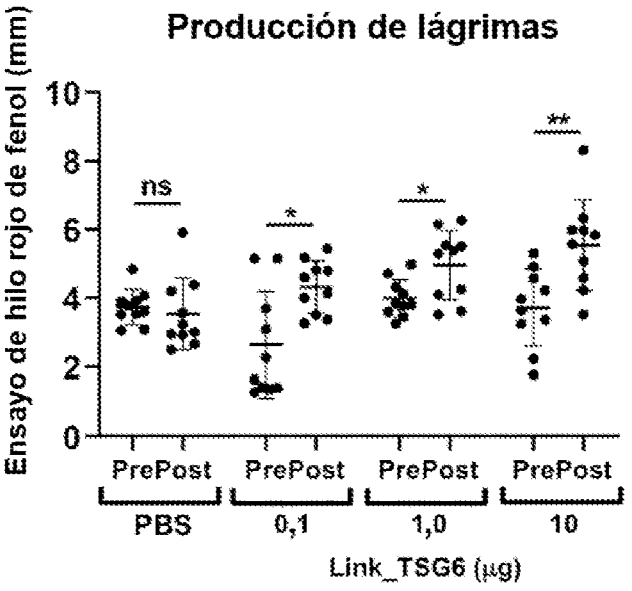



*Figura 7B*

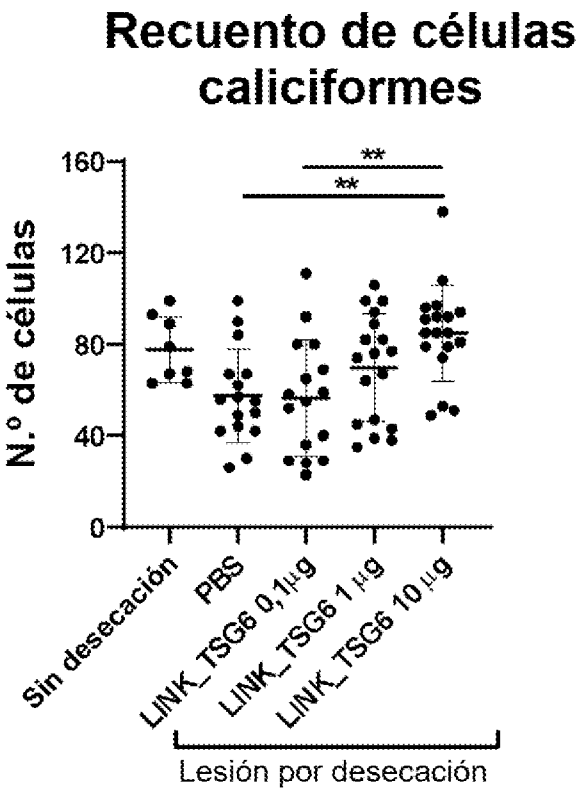



*Figura 7C*

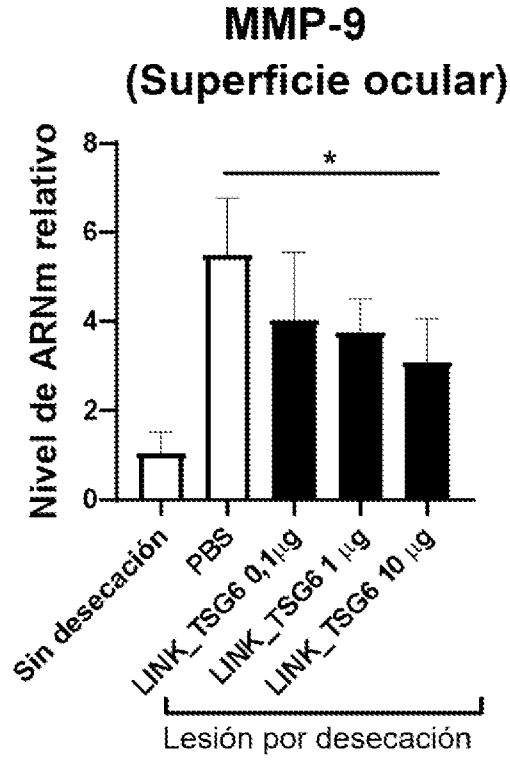



*Figura 7D*

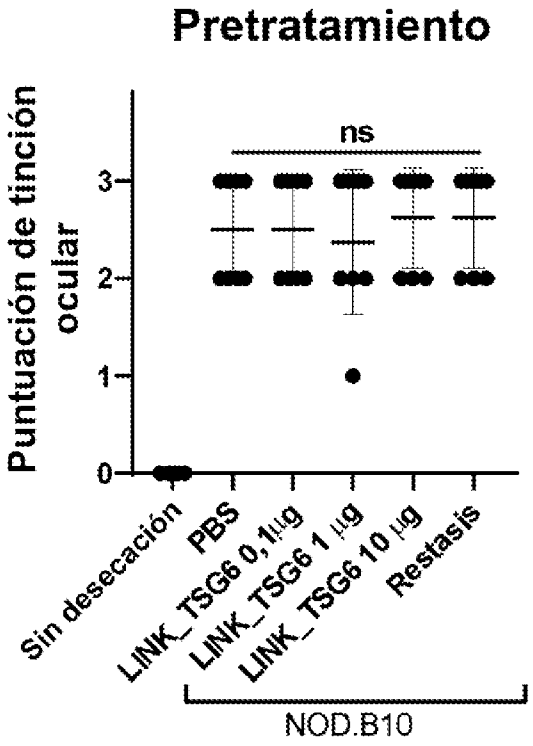



*Figura 8A*

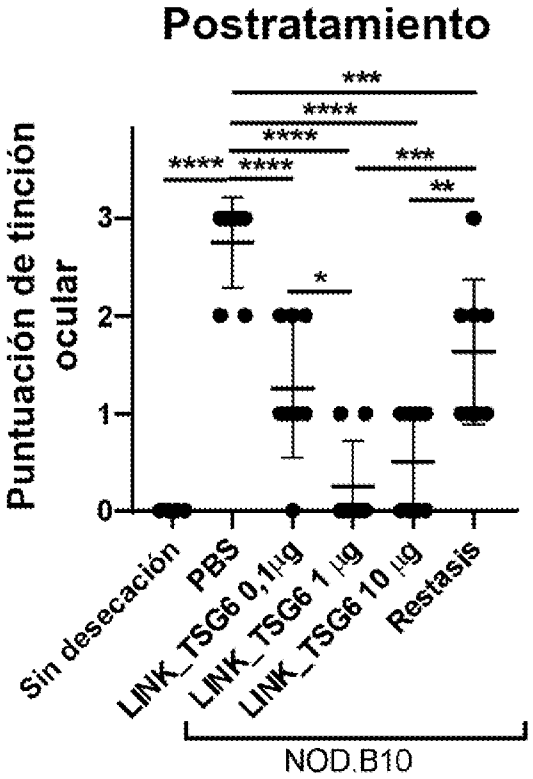



*Figura 8B*

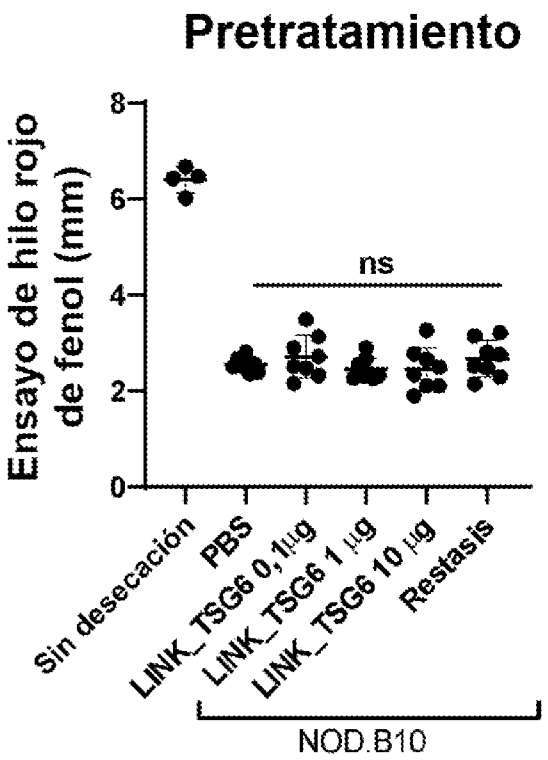



*Figura 8C*

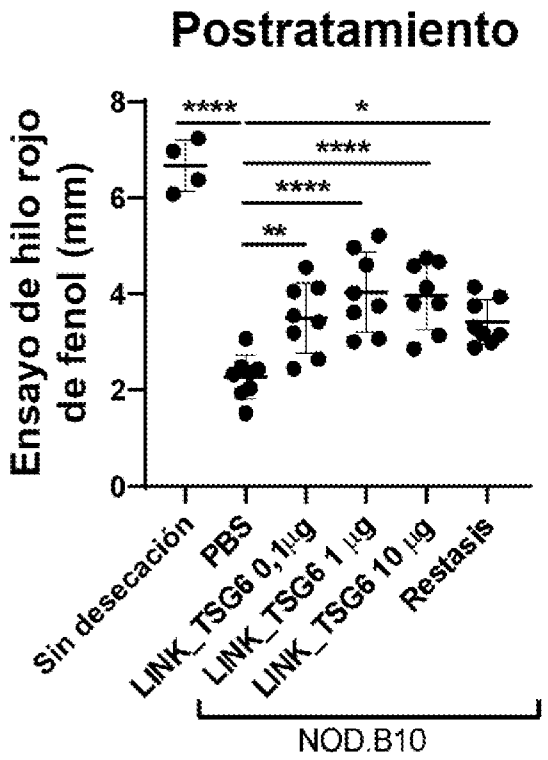



*Figura 8D*

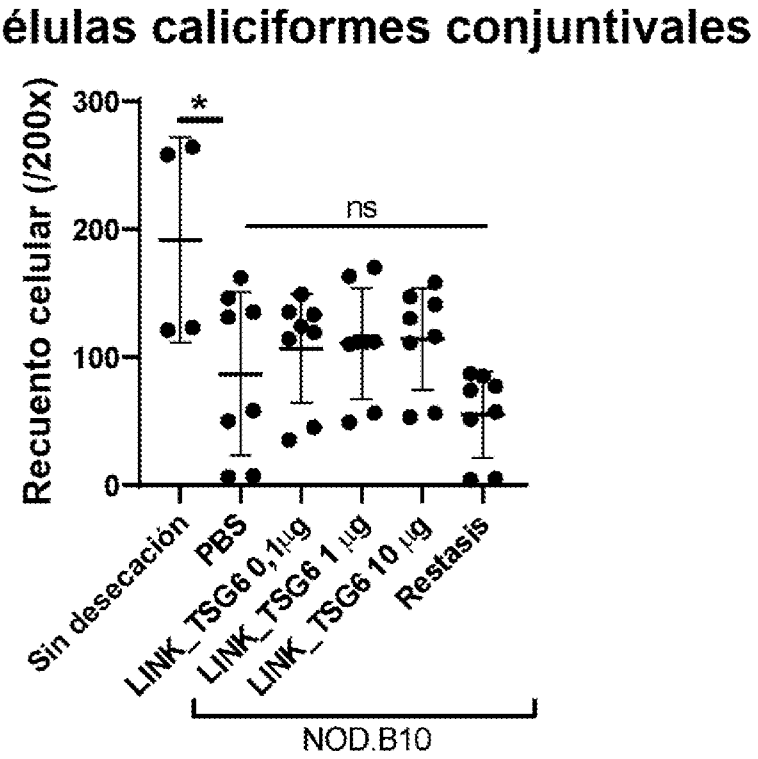



*Figura 8E*

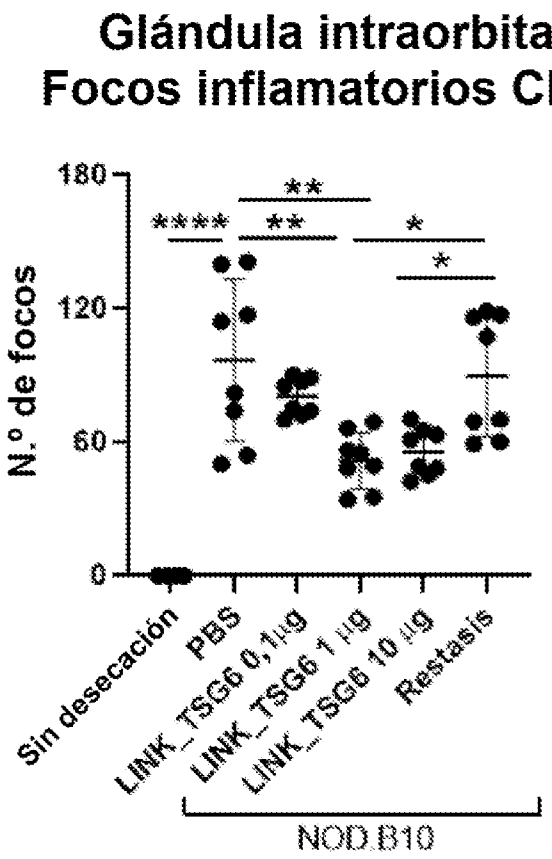



*Figura 8F*