

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 723**

51 Int. Cl.:

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 27/04** (2006.01)

**A61K 31/568** (2006.01)

**A61K 38/13** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09743204 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2285364**

54 Título: **Reposición y enriquecimiento terapéuticos de la lubricación de la superficie ocular**

30 Prioridad:

**07.05.2008 US 51112 P**

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

**04.03.2015**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**

**1111 Franklin Street, 12th Floor**

**Oakland, CA 94607, US y**

**SCHEPENS EYE RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SULLIVAN, BENJAMIN;**

**SCHMIDT, TANNIN, A. y**

**SULLIVAN, DAVID, A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 530 723 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Reposición y enriquecimiento terapéuticos de la lubricación de la superficie ocular

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional U.S. No. 61/051.112 presentada el 7 de mayo, 2008.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la gestión de la lubricación ocular. En particular, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas con la lubricación comprometida en las superficies corneales y conjuntivales.

**Antecedentes**

El gen del proteoglicano 4 (*prg4*) codifica proteínas altamente glicosiladas denominadas factor estimulante de megacariocitos (MSF), lubricina, y proteína de zona superficial (SZP) (1)). La lubricina se aisló en primer lugar del fluido sinovial y demostró una capacidad lubricante *in vitro* similar al fluido sinovial en la interfase cartílago-vidrio (2). La lubricina se identificó posteriormente como un producto de los fibroblastos sinoviales (3) y también se mostró que posee capacidad lubricante por capa límite en una interfase látex-vidrio por Jay *et al.* (3-9). Se mostró posteriormente que los oligosacáridos  $\beta(1-3)\text{Gal-GalNAc}$  unidos por O en un dominio grande semejante a mucina de 940 aminoácidos (10), codificados por el exón 6, median, en parte, esta capacidad lubricante por capa límite (8). SZP se localizó en primer lugar en la superficie de cartílago de explante de la zona superficial y se aisló del medio condicionado (11). SZP también demostró capacidad lubricante en la interfase cartílago-vidrio (12). Estas moléculas se refieren colectivamente como PRG4. También se mostró que PRG4 estaba presente en la superficie del sinovio (58), tendón (13), y menisco (14). Además, se ha mostrado que PRG4 contribuye, tanto a concentraciones fisiológicas como patofisiológicas, a la lubricación por capa límite de superficies de cartílago articular opuestas (59).

La importancia funcional de *prg4* se mostró por mutaciones que causan el síndrome de la enfermedad camptodactilia-artropatía-coxa vara-percarditis (CACP) en los seres humanos. CACP se manifiesta por camptodactilia, artropatía no inflamatoria, y sinovitis hipertrófica, con deformidad coxa vara, percarditis, y efusión pleural (15). También, en ratones nulos para PRG4, se observaron deterioro del cartílago, y posterior fallo articular (16). Por lo tanto, la expresión de PRG4 es un componente necesario de las articulaciones sinoviales sanas.

PRG4 es un miembro de la familia de las mucinas, que generalmente son abundantes en los recubrimientos epiteliales y proporcionan muchas funciones, incluyendo lubricación y protección frente a los microorganismos invasores (17). Las propiedades funcionales de las mucinas se determinan generalmente por patrones especializados de glicosilación y su capacidad para formar multímeros a través de enlaces disulfuro intermoleculares (18), estando los dos alterados en enfermedades crónicas (por ejemplo, fibrosis quística, asma) (17). La caracterización bioquímica de PRG4 aislado del fluido sinovial (2, 19) mostró heterogeneidad molecular en la O-glicosilación, lo que parece influir en las propiedades lubricantes (8). Recientemente, se ha mostrado que PRG4 de fluido sinovial bovino existe como dímeros unidos por disulfuro, además de las formas monoméricas, como se sugiere por los dominios ricos en cisteína conservados en los extremos N y C, junto con una cisteína no emparejada en el extremo C (20).

En tejidos tales como las articulaciones sinoviales, los modos físico-químicos de lubricación se han clasificado como por película de fluido o por capa límite. Los modos operativos de lubricación dependen de las fuerzas normal y tangencial en los tejidos articulares, de la velocidad relativa del movimiento tangencial entre estas superficies, y del historial de tiempo tanto de carga como de movimiento. El coeficiente de fricción,  $\mu$ , proporciona una medida cuantitativa, y se define como la proporción de fuerza de fricción tangencial respecto a la fuerza normal. Un tipo de modo de lubricación mediado por fluido es hidrostático. Al inicio de la carga y típicamente durante una duración prolongada, el fluido intersticial en el cartílago se presuriza, debido a la naturaleza bifásica del tejido; el fluido también puede verse forzado en las asperezas entre las superficies articulares a través de un mecanismo de supuración. El fluido intersticial presurizado y los combinados de lubricante atrapados pueden por lo tanto contribuir significativamente a soportar carga normal con una resistencia pequeña a la fuerza de cizalla, facilitando un  $\mu$  muy bajo. También, al inicio de la carga y/o movimiento, ocurren tipos de lubricación por película de fluido, película de presión, hidrodinámico, y elastohidrodinámico, con presurización, movimiento, y deformación actuando para dirigir el lubricante viscoso desde y/o a través del hueco entre dos superficies en movimiento relativo.

El grado relevante en el que ocurre la lubricación por presión de película de fluido frente a la de por capa límite depende clásicamente de un número de factores (31). Cuando la película de lubricante puede fluir entre las superficies deslizantes adecuadas, que pueden deformarse elásticamente, ocurre la lubricación elastohidrodinámica. La presión, rugosidad de la superficie, y velocidad relativa de deslizamiento determinan cuando empieza a fallar la lubricación del fluido completa y la lubricación entra en nuevos regímenes. Al disminuir más la velocidad, las películas de lubricante adherentes a las superficies articulares empiezan a contribuir y ocurre un régimen mixto de lubricación. Si la velocidad disminuye incluso más y sólo permanece una capa de lubricante ultra-fina compuesta por

5 unas pocas moléculas, ocurre la lubricación por capa límite. Un modo de lubricación por capa límite está indicado por lo tanto por un coeficiente de fricción (proporción de la fuerza de fricción medida entre dos superficies en contacto en movimiento relativo respecto a la fuerza normal aplicada) durante deslizamiento estacionario no alterándose con factores que influyen en la formación de una película de fluido, tal como velocidad relativa de deslizamiento y carga axial (35). Para el cartílago articular, se ha concluido que es seguro que ocurre la lubricación por capa límite, aunque complementada por la presurización del fluido y otros mecanismos (36-39).

10 En la lubricación por capa límite, la carga es soportada por el contacto superficie a superficie, y las propiedades friccionales asociadas están determinadas por moléculas de la superficie lubricantes. Se ha propuesto que este modo es importante porque las capas de cartílago opuestas se ponen en contacto sobre ~ 10% del área total, y aquí puede ser donde ocurre la mayor parte de la fricción (30). Además, con un tiempo de carga y disipación de la presión hidrostática crecientes, las superficies recubiertas por lubricante soportan una parte cada vez mayor de la carga respecto al fluido presurizado y, consecuentemente, este modo puede volverse cada vez más dominante (31, 32). La lubricación por capa límite, en esencia, mitiga el movimiento por adherencia-deslizamiento ("stick-slip") (31), y por lo tanto se manifiesta como una resistencia disminuida tanto para el movimiento estacionario como el inicio del movimiento. La última situación es relevante para superficies articulares que soportan carga después de una carga compresiva prolongada (por ejemplo, sentado o de pie *in vivo*) (33). Los patrones de deterioro típicos de superficies de cartílago (34) también sugieren que la lubricación por capa límite del cartílago articular es crítica para la protección y mantenimiento de la estructura de la superficie articular.

20 Con un tiempo de carga y disipación de la presión hidrostática crecientes, las superficies recubiertas por lubricante soportan una parte cada vez mayor de la carga respecto al fluido presurizado y, consecuentemente,  $\mu$  puede estar dominado de manera creciente por este modo de lubricación. Un modo de lubricación por capa límite está indicado por valores de  $\mu$  durante el deslizamiento estacionario que no se alteran por factores que influyen en la formación de una película de fluido, tal como velocidad relativa de deslizamiento y carga axial. La lubricación por capa límite, en esencia, mitiga el movimiento por adherencia-deslizamiento, y por lo tanto se manifiesta como una resistencia disminuida tanto para el movimiento estacionario como el inicio del movimiento.

30 La acumulación de PRG4 en el fluido sinovial y en la superficie articular, son probablemente determinantes funcionales clave de la capacidad lubricante por capa límite de PRG4. Recientemente, se demostró que una secreción significativa, de tres veces, de PRG4 resultaba de la carga de cizalla dinámica de explantes de cartílago cultivados, comparado con cultivos con hinchamiento libre o comprimidos estáticamente (27). Esta síntesis y secreción de PRG4 por los condrocitos podría contribuir significativamente a la concentración de PRG4 en el fluido sinovial, tanto en condiciones homeostáticas como patológicas en las que están presentes reguladores fisiológicos (23). Aunque la cantidad de PRG4 unido a la superficie no parece correlacionarse con las velocidades de secreción, estudios previos sugieren que el PRG4 unido a la superficie puede intercambiarse con PRG4 endógeno en el fluido sinovial (25), especialmente bajo la influencia de perturbación mecánica (26, 27). La clarificación de los aspectos espacial y temporal del metabolismo de PRG4 en la articulación, particularmente en la superficie articular, haría que avanzara la comprensión de la contribución de PRG4 en las propiedades de baja fricción del cartílago articular, y posiblemente daría lugar a tratamientos para prevenir la pérdida de esta función (40, 41). Queda más por determinar acerca del procesamiento, y las funciones adicionales o alternativas potenciales de varias moléculas de PRG4 de diferente peso molecular (10, 27, 28, 61). Además, la combinación de factores químicos y mecánicos para estimular la expresión de PRG4 en condrocitos cerca de la superficie articular puede ser útil para crear cartílago preparado por ingeniería de tejidos a partir de sub-poblaciones aisladas (29) con una superficie que es bioactiva y funcional en la lubricación.

45 Actualmente, se desconocen los mecanismos precisos de la lubricación por capa límite en interfases biológicas. Sin embargo, el proteoglicano 4 (PRG4) puede jugar un papel crítico como un lubricante por capa límite en las articulaciones articulares. Se piensa que esta glicoproteína secretada protege a las superficies cartilaginosas frente a las fuerzas friccionales, adhesión celular y deposición de proteínas. Se han aislado y caracterizado varias proteínas de lubricina nativas y recombinantes e isoformas. US 2007/275032 describe un efecto lubricante de PRG4 en el cartílago. Se dice que PRG4 aislado de cartílago de articulación humano actúa como una molécula condro-protectora, proporcionando protección para las células de cartílago inferiores.

50 Las Patentes U.S. Nos. 5.326.558; 6.433.142; 7.030.223 y 7.361.738 describen una familia de factores estimuladores de megacariocitos (MSF) humanos y composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de dichos MSF para tratar estados patológicos o trastornos, tales como una deficiencia de plaquetas. Las Patentes U.S. Nos. 6.960.562 y 6.743.774 también describen un polipéptido lubricante, tribonectina, que comprende un fragmento sustancialmente puro de MSF, y métodos para lubricar articulaciones u otros tejidos mediante la administración de tribonectina sistémicamente o directamente en los tejidos.

55 US 2007/249557 describe que PRG4 expresado por condrocitos de superficie participa en la lubricación por capa límite de articulaciones cartilaginosas.

**Resumen de la invención**

La presente invención proporciona, en varias realizaciones, composiciones farmacéuticas para la gestión de la lubricación ocular, incluyendo la reposición y enriquecimiento terapéuticos de moléculas lubricantes por capa límite en la superficie ocular. En determinadas realizaciones de la presente invención se describe la observación de que el ARNm de PRG4 es expresado en células epiteliales corneales y conjuntivales humanas, así como en las glándulas lacrimal y meibomio de ratón, lo que indica que la proteína PRG4 está presente en estos tejidos en la superficie ocular. En determinados casos de la presente invención se describe la observación de que el papel de la proteína PRG4 sirve en la superficie ocular para proteger la córnea y conjuntiva frente a fuerzas de cizalla significativas generadas durante el parpadeo, uso de lentes de contacto, y otras condiciones no deseadas. El impacto de la película lagrimal, incluyendo el impacto de la inflamación, citoquinas proinflamatorias, desequilibrio de esteroides sexuales y proteasas en la composición y función de las películas, sugiere un curso de terapia para los problemas oculares que estimula la lubricación por capa límite.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una deficiencia en la lubricación ocular, una afección que está asociada con o causa deficiencia en la lubricación ocular o síntomas asociados con ésta en un individuo, siendo adecuada la composición para aplicación tópica en una superficie ocular y que comprende una concentración terapéuticamente efectiva de una proteína PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención también puede comprender uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, excipiente oftálmicamente aceptable, astringente oftálmicamente aceptable, vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, y emoliente oftálmicamente aceptable.

Los demulcentes oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, carboximetilcelulosa de sodio (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 2,5% p/p), hidroxietil celulosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 2,5% p/p), hipromelosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 2,5% p/p), metilcelulosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 2,5% p/p), dextrano 70 (por ejemplo, aproximadamente 0,1% p/v), gelatina (por ejemplo, aproximadamente 0,01% p/v), glicerina (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 1% p/v), polietilén glicol 300 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 1% p/v), piletilén glicol 400 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 1% p/v), polisorbato 80 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 1% p/v), propilén glicol (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a 1% p/v), polivinil alcohol (por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 4% p/v), povidona (por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 2% p/v). Los excipientes/emolientes oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, lanolina anhidra (por ejemplo, aproximadamente 1 a 10% p/v), lanolina (por ejemplo, aproximadamente 1 a 10% p/v), aceite mineral ligero (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 50% p/v), aceite mineral (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 50% p/v), parafina (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 5% p/v), petrolato (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 100% p/v), pomada blanca (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 100% p/v), petrolato blanco (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 100% p/v), cera blanca (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 5% p/v), cera amarilla (por ejemplo,  $\leq$  aproximadamente 5% p/v). Un astringente oftálmicamente aceptable ejemplar contemplado en la presente invención incluye, pero no está limitado a, sulfato de cinc (por ejemplo, aproximadamente 0,25% p/v). Los vasoconstrictores oftálmicamente aceptables ejemplares contemplados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, hidrocloreto de efedrina (por ejemplo, aproximadamente 0,123% p/v), hidrocloreto de nafazolina (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,03% p/v), hidrocloreto de fenilefrina (por ejemplo, aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,2% p/v), e hidrocloreto de tetrahidrozolina (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05% p/v).

En algunas de estas realizaciones, los demulcentes, excipientes, astringentes, vasoconstrictores, emolientes y electrolitos proporcionan un medio para administrar la proteína PRG4 de una manera oftálmicamente aceptable. Las composiciones oftálmicamente aceptables son adecuadas para aplicación tópica en la superficie ocular si carecen de toxicidad, quemazón, picor, viscosidad, visión borrosa, etc. inaceptables para el ojo, después de la aplicación.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero no limitado a, hialuronato de sodio, ácido hialurónico, y fosfolípido. El fosfolípido ejemplar incluye, pero no está limitado a, L- $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica para el uso de la invención que es adecuada para aplicación tópica en una superficie ocular y que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de proteína PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable comprende al menos tres electrolitos, incluyendo, pero no limitado a, cloruro de sodio (NaCl) 0,64%, cloruro de potasio (KCl) 0,075%, cloruro de calcio dihidrato ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,048%, cloruro de magnesio hexahidrato ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,03%, acetato de sodio trihidrato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 0,39%, citrato de sodio dihidrato ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,17%, hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,5) con una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/L.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica para el uso de la presente invención adecuada para aplicación tópica en una superficie ocular y que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de proteína PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, está comprendida por sodio ( $\text{Na}^+$ )

de aproximadamente 128 mM, potasio (K<sup>+</sup>) de aproximadamente 24 mM, cloro (Cl<sup>-</sup>) de aproximadamente 113 mM, calcio (Ca<sup>2+</sup>) de aproximadamente 0,4 mM, magnesio (Mg<sup>2+</sup>) de aproximadamente 0,3 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de aproximadamente 5 mM, citrato de aproximadamente 1 mM, fosfato de aproximadamente 14 mM, acetato de aproximadamente 15 mM, e hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH a aproximadamente 7,5) con una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/L.

El presente documento describe además un método para tratar deficiencia en la lubricación ocular, o síntomas asociados con ésta, en un individuo que lo necesita. El método comprende administrar tópicamente en la superficie ocular del individuo que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de una proteína PRG4. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende la proteína PRG4 se administra en combinación con una formulación oftálmicamente aceptable que comprende uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, excipiente oftálmicamente aceptable, astringente oftálmicamente aceptable, vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, y emoliente oftálmicamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende la proteína PRG4 para el uso de la presente invención se administra en combinación con una disolución oftálmicamente aceptable que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de hialuronato de sodio o ácido hialurónico, o un fosfolípido activo de superficie, como se ha discutido anteriormente. En determinadas realizaciones más, la composición farmacéutica que comprende la proteína PRG4 se administra en combinación con una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende uno o más electrolitos, como se ha discutido anteriormente.

El presente documento describe un método para tratar una deficiencia en la lubricación ocular, o síntomas asociados con ésta, debida a pérdida lagrimal o película lagrimal inestable en el bucle ocular por capa límite, tal como deficiencia de andrógenos, síndrome de Sjögren y queratoconjuntivitis seca (KCS). Dicho método comprende administrar tópicamente en la superficie ocular de un paciente que lo necesita la composición farmacéutica para el uso de la presente invención.

En determinadas realizaciones, el presente documento describe además un método para abordar y tratar las afecciones asociadas con una lubricación ocular no favorable o deficiente. Las afecciones ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula de meibomio, terapia de reemplazo de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, alergia, tiempo de rotura de la película lagrimal reducido, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento.

### Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 representa bucles de retroalimentación en la lubricación por capa límite de la superficie ocular.

La Figura 2 ilustra la expresión de ARNm de PRG4 en células epiteliales corneales humanas. Las células epiteliales corneales humanas se aislaron de los bordes corneoesclerales de donantes masculinos y femeninos. Las muestras amplificadas se cribaron para la presencia de productos PRG4 usando un Bioanalizador Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: L. escalera de MW; 1. No control de molde; 2. Tejido corneal de una mujer de 33 años; 4. Células epiteliales corneales cultivadas de una mujer de 70 años; 6. Células epiteliales corneales cultivadas de un hombre de 53 años.

La Figura 3 ilustra la expresión de ARNm de PRG4 en células epiteliales conjuntivales humanas. Las células epiteliales corneales humanas se aislaron de los bordes corneoesclerales de donantes masculinos y femeninos. Las muestras amplificadas se cribaron para la presencia de productos PRG4 usando electroforesis en gel de agarosa. Los carriles verticales contienen: 1. escalera de MW; 2. No control de molde; 4. Conjuntiva de mujer humana; 5. Conjuntiva de hombre humana.

La Figura 4 ilustra la expresión de ARNm de PRG4 en muestras de tejido de bodes corneoesclerales humanas. L. Las células epiteliales corneales humanas se aislaron de los bordes corneoesclerales de donantes masculinos y femeninos. Las muestras amplificadas se cribaron para la presencia de productos PRG4 usando un Bioanalizador Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: Escalera de MW; 1. estándar de ADNc de hígado humano; 2. Tejido de borde corneoescleral de una mujer de 24 años; 3. Tejido de borde corneoescleral de una mujer de 51 años; 4. Células epiteliales conjuntivales humanas.

La Figura 5 ilustra la expresión de ARNm de PRG4 en muestras de citología de impresión conjuntival humanas. Las muestras de citología de impresión conjuntival se aislaron de donantes masculinos y femeninos. Las muestras amplificadas se cribaron para la presencia de productos PRG4 usando un Bioanalizador Agilent 2100. Los carriles verticales contienen: L. Escalera de MW; 1-9. Muestras de citología de impresión conjuntival; 10. Repetición de células epiteliales conjuntivales humanas (Carril 4 en la Figura 3).

La Figura 6 ilustra un esquema del ensayo de fricción. La superficie ocular corneal (605) se fijó al extremo esférico de un tapón de cilindro de goma semi-rígido no permeable inerte (603) (radio  $r = 6$  mm). El tapón de cilindro (603) se unió al activador rotacional de la máquina de ensayo mecánica (Bose ELF 3200) formando la superficie articular inferior. Se perforó un anillo (601) (radio exterior= 3,2 mm, radio interior= 1,5 mm) del párpado (604). El anillo (601) se unió al activador lineal acoplado con una carga axial (N) y células de carga de torsión ( $\tau$ ), formando la superficie articulante superior. Se formó un baño de lubricante (602) asegurando un tubo inerte alrededor del tapón de cilindro (603).  $\omega$  es la frecuencia angular.

La Figura 7 ilustra la reducción de fricción cinética del párpado/córnea *in vitro* con la adición de proteína PRG4 (lubricina).

La Figura 8 ilustra la reducción de fricción cinética del párpado/córnea *in vitro* medida 1 minuto después de la adición de proteína PRG4 (lubricina).

La Figura 9 ilustra la reducción de fricción cinética del párpado/córnea *in vitro* medida 5 minutos después de la adición de proteína PRG4 (lubricina).

La Figura 10 ilustra la reducción de fricción cinética del párpado/córnea *in vitro* con el tiempo, después de la adición de proteína PRG4 (lubricina).

### Descripción detallada de la invención

En determinadas realizaciones de la presente memoria, se proporciona una composición farmacéutica para tratar deficiencia en la lubricación ocular (por ejemplo, deficiencia en la lubricación ocular por capa límite), o síntomas asociados con ésta, en un individuo que lo necesita, siendo adecuada la composición para aplicación tópica en una superficie ocular y que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable. En algunas realizaciones de la presente memoria también se describen composiciones farmacéuticas que comprenden proteína PRG4 en una formulación oftálmicamente aceptable. En realizaciones específicas, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, también puede estar en combinación con uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, un excipiente oftálmicamente aceptable, un astringente oftálmicamente aceptable, un vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, y un emoliente oftálmicamente aceptable.

En algunas realizaciones de la presente memoria, se proporcionan composiciones farmacéuticas para el uso de la presente invención para tratar una deficiencia en la lubricación ocular en la superficie ocular (por ejemplo, una deficiencia de, tal como disminuida o no deseable, de la lubricación ocular por capa límite). Una composición farmacéutica para el uso de determinadas realizaciones de la presente invención comprende una proteína PRG4 aislada o purificada suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable en combinación con uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente, excipiente, astringente, vasoconstrictor y emoliente oftálmicos. En algunas realizaciones, cualquier composición farmacéutica para el uso proporcionado en la presente memoria comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en hialuronato de sodio, fosfolípidos activos de superficie, y electrolitos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para administración tópica.

La presente invención proporciona, en determinadas realizaciones, una nueva estrategia para gestionar la lubricación ocular, incluyendo la reposición y enriquecimiento terapéuticos de las moléculas lubricantes por capa límite en la superficie ocular. Debe indicarse que la importancia y el mecanismo de la lubricación ocular por capa límite no se ha reconocido hasta ahora en la comunidad oftálmica. Durante años, el consenso científico en la comunidad de investigación ortopédica fue que la lubricación hidrodinámica era con mucho el modo dominante de lubricación para el cartílago articular, y que la lubricación por capa límite sólo era una opción adicional. Además, los investigadores que estudiaban la lubricación por capa límite en las superficies del cartílago sugieren que la lubricación por capa límite probablemente sólo es importante bajo "alta carga y baja velocidad", lo que es opuesto a las condiciones en la superficie ocular, donde existen cargas axiales relativamente bajas y velocidades de deslizamiento relativamente rápidas. Véase, por ejemplo, (54). Además, la lubricación por capa límite que implica el glicocáliz corneal no se ha considerado hasta ahora. Jay et al. compararon factor lubricante purificado de fluido sinovial bovino con "glicoproteína mucinosa de saliva submandibular humana y lágrimas estimuladas" y concluyeron que "la mucina secretada por la glándula lacrimal no lubricaba", pasando por alto la posibilidad de que el epitelio corneal era una fuente de lubricante o que la lubricación por capa límite era un contribuyente importante en la superficie ocular. Véase, por ejemplo, (55). Los modelos matemáticos más recientes de dinámica de película lagrimal también ignoran la posibilidad de la lubricación por capa límite, reivindicando una "aproximación a la lubricación" para la altura de la película lagrimal de manera que "la capa mucosa en la córnea puede tomarse para proporcionar una superficie no deslizante para la película acuosa" y que "debe indicarse que el modelo sólo predice la evolución antes de que el espesor [de la película lagrimal] alcance un valor críticamente delgado en el que el modelo falla". Véase, por ejemplo, (57).

Existe una necesidad de gestionar la lubricación ocular y proteger la córnea y la conjuntiva frente a las fuerzas de cizalla significativas generadas de las condiciones no deseables descritas en la presente memoria, incluyendo, como ejemplo no limitativo, enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula meibomiana, terapia de reemplazo de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, alergia, tiempo de rotura de la película lagrimal reducido, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento.

En algunos casos, la carga de la córnea y la conjuntiva está dominada probablemente por fuerzas de cizalla. En determinados casos, el parpadeo, así como el uso de lentes de contacto, genera una tensión significativa en las células epiteliales de la superficie ocular, y esto es especialmente cierto en presencia de una película lagrimal comprometida. Como se muestra en la Figura 1, se sugiere que la tensión de cizalla incrementada da lugar a la inestabilidad de la película lagrimal, pérdida de lágrima evaporativa, hiperosmolaridad, cambios en la presión de hinchamiento y una elevación por retroalimentación en la tensión de cizalla. En algunos casos, también se piensa que la tensión de cizalla incrementada estimula la inflamación, deficiencia de andrógenos, y expresión disminuida de proteoglicanos. En determinados casos la tensión de cizalla incrementada y sus secuelas pueden, con el tiempo, dar lugar a una pérdida de la lubricación por capa límite en la superficie ocular.

Una deficiencia en la lubricación ocular y los síntomas asociados con ésta pueden determinarse por cualquier método adecuado. En algunos casos, una deficiencia en la lubricación ocular y los síntomas asociados con ésta se define bien cualitativamente (por ejemplo, un sentimiento de lubricación baja, ojo seco, malestar, etc.) o cuantitativamente (por ejemplo, medido mediante métodos mecánicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos u otros de ensayos cuantitativos).

En determinados casos, en afecciones no deseables para la lubricación ocular por capa límite, tales como las que resultan de enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca, deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula meibomiana, terapia de reemplazo de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, alergia, tiempo de rotura de la película lagrimal reducido, alergia, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento, existirá una película lagrimal comprometida. En algunas de estas situaciones, la evaporación incrementada puede descartar la lubricación eficaz por película de fluido, pero permite la lubricación por capa límite y un mecanismo molecular protector para reducir la tensión de cizalla en la superficie celular. Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan que la reposición y enriquecimiento terapéuticos de las moléculas lubricantes por capa límite en la superficie ocular interrumpirían el bucle de retroalimentación mediante el cual las afecciones desfavorables asociadas con una deficiencia en la lubricación ocular estimulan el estrés de la superficie ocular.

En determinados casos, y como se proporciona en la presente memoria, la proteína PRG4 juega un papel crítico en el ojo como un lubricante por capa límite. En algunos casos, esta glicoproteína secretada protege la superficie ocular para proteger la córnea y la conjuntiva frente a fuerzas de cizalla significativas generadas durante un parpadeo, uso de lentes de contacto, y cualquier otra lubricación ocular por capa límite indeseable causada por la inflamación crónica e hiperosmolaridad que resultan de la enfermedad de ojo seco, deficiencia de andrógenos, terapia de reemplazo de estrógenos, película lagrimal comprometida alergia, envejecimiento, enfermedades de la superficie ocular y niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular. Dada la relación entre la presión osmótica y las interacciones electromecánicas en las moléculas cargadas, la presente invención proporciona, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica para el uso de la invención para gestionar una deficiencia en la lubricación ocular mediante la modulación de la hiperosmolaridad u osmolaridad en la superficie ocular mediante la interrupción de los mecanismos de retroalimentación que previenen que los componentes secretados reduzcan los coeficientes de fricción y mitiguen la tensión de cizalla.

En otra realización ejemplar, la presente invención presenta un mecanismo de protección para la lubricación ocular por capa límite, mediante el cual los receptores unidos a la superficie se unen reversiblemente a una o más construcciones formadoras de gel o tensioactivas. En algunos casos, las construcciones formadoras de gel o tensioactivas se despegan durante un evento de cizalla, previniendo de esta manera que la tensión de cizalla alcance (o reduciendo el alcance de la tensión de cizalla) la superficie epitelial. En determinadas realizaciones, después del evento de cizallamiento temporal, las construcciones formadoras de gel y tensioactivas, a las que se permite volver a su equilibrio inalterado, se vuelven a unir a los receptores unidos a la superficie. En algunas realizaciones, la construcción completa puede despegarse durante el cizallamiento. Se podría imaginar, en determinados casos, que la termodinámica de este equilibrio incrementaría la probabilidad de liberación del receptor con amplitud de cizallamiento creciente, pero que una asociación cualquiera es fácilmente reversible.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención que comprende una proteína PRG4 suspendida en una disolución equilibrada oftálmicamente aceptable se aplica tópicamente en la superficie ocular, en la que la proteína PRG4 se asocia o se une a ella. En determinados casos de esta realización, PRG4 actúa como el receptor unido a la superficie que se deja interaccionar con proteínas endógenas y proteoglicanos en la película lagrimal para establecer un mecanismo protector para reducir la fricción

durante los parpadeos en la superficie ocular, prevenir la adsorción de proteínas en la superficie ocular, y reducir las manchas secas causadas por la inestabilidad de la película lagrimal.

En otra realización de la presente invención, PRG4 se aplica tópicamente y se asocia o se une a la superficie ocular, en combinación con uno o más de construcciones de ácido hialurónico y fosfolípido. En determinados casos de esta realización, PRG4 actúa como el receptor unido a la superficie que interacciona con el ácido hialurónico y/o fosfolípidos suministrados exógenamente para establecer el mecanismo protector para reducir la fricción durante los parpadeos en la superficie ocular, prevenir la adsorción de proteínas en la superficie ocular, y reducir las manchas secas causadas por la inestabilidad de la película lagrimal. En esta realización, las construcciones de ácido hialurónico y fosfolípido se disocian del PRG4 durante un evento de cizalla. En otra realización más, la construcción completa se despega durante el evento de cizallamiento para prevenir que la tensión de cizalla alcance el equilibrio.

En otra realización más, fragmentos funcionales, multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.), homólogos u ortólogos de PRG4 actúan como el receptor de superficie y/o las construcciones formadoras de gel en el mecanismo de protección. Los fragmentos y homólogos funcionales de PRG4 incluyen aquellos con menos repeticiones en el dominio de repetición KEPAPTT central semejante a mucina, formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína, variantes de corte y empalme, formas recombinantes, y semejantes. Un fragmento lubricante de PRG4 presenta al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ó 95% del efecto lubricante oftálmico de PRG4 humana, según se mide cualitativamente, mecánicamente, ópticamente, eléctricamente, o por un ensayo bioquímico.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término proteína "PRG4", "proteína PRG4" o "proteoglicano 4" se usa indistintamente con el término proteína "lubricina". PRG4 también se usa en la presente memoria para englobar el término factor estimulante de megacariocitos (MSF), que ha sido aceptado por la base de datos de Nomenclatura de Genes Humanos UCL/HGNC/HUGO y la proteína de la zona superficial (SZP). La proteína PRG4 o lubricina tal y como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier proteína lubricina nativa o recombinante, aislada o purificada, homólogos, fragmentos funcionales o restos, isoformas, y/o mutantes de ésta. En determinadas realizaciones, la proteína PRG4 aislada o purificada comprende una secuencia de aminoácidos para una proteína lubricina humana nativa o recombinante. En otras realizaciones, la proteína PRG4 aislada o purificada comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los exones del gen *prg4* que codifican la proteína PRG4 de longitud completa o estructuras primarias de isoformas. El gen del proteoglicano 4 (*prg4*) contiene 12 exones. La proteína PRG4 usada en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos codificada por los exones 1-12 del gen *prg4*, más preferiblemente, los exones 6-12, y lo más preferiblemente, los exones 9-12.

Tal y como se usa en la presente memoria, la proteína PRG4 incluye cualesquiera proteínas PRG4 conocidas actualmente, o descritas posteriormente. En determinadas realizaciones, una secuencia de aminoácidos preferida de la proteína PRG4 se proporciona en SEQ ID NO:1. La proteína PRG4 comparte la estructura primaria de aminoácidos de cualesquiera proteínas PRG4 o isoformas conocidas con al menos 60% de homología, preferiblemente 75% de homología, más preferiblemente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homología. En determinadas realizaciones, una proteína PRG4 preferida tiene una masa molar promedio de entre 50 kDa y 400 kDa, que comprende una o más partes biológicas activas de la proteína PRG4, o fragmentos funcionales, tales como un fragmento lubricante, o un homólogo de ésta.

Tal y como se usa en la presente memoria, la proteína PRG4 comprende una parte biológica activa de la proteína. Tal y como se usa en la presente memoria, una "parte biológicamente activa" de la proteína PRG4 incluye un fragmento funcional de una proteína que comprende secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas con, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína, que incluye menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, y presenta al menos una actividad de la proteína de longitud completa. Típicamente, una parte biológicamente activa comprende un dominio o resto funcional con al menos una actividad de la proteína. Una parte biológicamente activa de una proteína puede ser un polipéptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100, 200, o más aminoácidos. En una realización, una parte biológicamente activa de la proteína PRG4 puede usarse como un agente terapéutico solo o en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar lubricación ocular por capa límite indeseable o disminuida.

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de varias proteínas PRG4 o lubricina nativas y recombinantes, y la caracterización de las proteínas PRG4 y varias isoformas se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 5.326.558; 6.433.142; 7.030.223; 7.361.738 de Turner et al., y las Patentes U.S. Nos. 6.743.774 y 6.960.562 de Jay et al. La Publicación U.S. No. 20070191268 de Flannery et al. también describe moléculas de PGR4 o lubricina recombinantes útiles en la presente invención.

Los métodos para el aislamiento, purificación, y expresión recombinante de una proteína PRG4 son muy conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, el método empieza con la clonación y aislamiento de ARNm y ADNc que codifica proteínas PRG4 o isoformas usando técnicas estándar de biología molecular, tales como PCR o RT-PCR. El ADNc aislado que codifica la proteína PRG4 o isoforma se clona en un vector de expresión, y se transforma y expresa además en una célula huésped para producir proteína PRG4 recombinante.

Tal y como se usa en la presente memoria, "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otra manera *in vitro* (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), a métodos para usar polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. "Recombinante" también engloba la ligación de ácidos nucleicos que tienen varias regiones codificadoras o dominios o secuencias promotoras de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para la expresión, por ejemplo, inducible o constitutiva, de una proteína de fusión que comprende un dominio activo del gen PRG4 y una secuencia de ácido nucleico amplificada usando un cebador de la invención.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína PRG4 puede contener una o más mutaciones, deleciones, o inserciones. En dichas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína PRG4 es al menos 60% homólogo, preferiblemente 75% homólogo, más preferiblemente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homólogo, a un ácido nucleico que codifica la proteína PRG4 de tipo salvaje.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ADNc" incluye ADN que es complementario a moléculas de ARNm presentes en el ARNm de una célula u organismo que puede convertirse en ADNc con una enzima tal como la transcriptasa inversa. En determinadas realizaciones, el ADNc que codifica la proteína PRG4 se aísla de ARNm de PRG4 expresado en las células epiteliales corneales o conjuntivales humanas usando un método RT-PCR muy conocido en la técnica.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "polinucleótido", "ácido nucleico/nucleótido", y "oligonucleótido" se usan indistintamente, e incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, bien desoxirribonucleótido o ribonucleótidos, o análogos de éstos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ribozimas, ADN, ADNc, ADN genómico, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Los polinucleótidos pueden ser naturales, sintéticos, recombinantes o cualquier combinación de éstos.

Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos pueden impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes distintos de nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. El término también incluye moléculas tanto bi como monocatenarias. A no ser que se especifique o requiera otra cosa, cualquier realización de esta invención que es un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o predichas para preparar la forma bicatenaria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de polinucleótido" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótido: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) en lugar de timina cuando el polinucleótido es ARN, en lugar de ADN. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como, por ejemplo, genómica funcional y búsqueda de homología.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido/ADN aislado" incluye moléculas de polinucleótido que están separadas de otras moléculas de polinucleótido que están presentes en la fuente natural del polinucleótido. Por ejemplo, respecto al ADN genómico, el término "aislado" incluye moléculas de polinucleótido que están separadas del cromosoma con el que el ADN genómico está asociado naturalmente. Preferiblemente, un polinucleótido "aislado" carece de secuencias que flanquean naturalmente el polinucleótido (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido de interés) en el ADN genómico del organismo del que deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula de polinucleótido aislada que codifica la proteína PRG4 usada en la invención puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ó 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente la molécula de polinucleótido en el ADN genómico de la célula del que deriva el polinucleótido. Además, una molécula de polinucleótido "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede carecer sustancialmente de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o carecer sustancialmente de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "gen" incluye un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido o proteína particular después de ser transcrito y traducido. Cualquiera de las secuencias de polinucleótido descritas en la presente memoria también puede usarse para identificar secuencias de fragmentos mayores o codificadoras de longitud completa del gen con el que están asociados. Los métodos para aislar secuencias de fragmentos mayores son conocidos por los expertos en la técnica. Tal y como se usa en la presente memoria, una molécula de polinucleótido "nativa o natural" incluye, por

ejemplo, una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que ocurre en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" o "proteína" es intercambiable, e incluye un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos, o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y tanto los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se refiere comúnmente como un oligopéptido, Las cadenas peptídicas de más de tres o más aminoácidos se refieren como un polipéptido o proteína.

En determinadas realizaciones, la proteína PRG4 usada en la presente memoria se refiere a proteínas PRG4 o varios homólogos o isoformas de éstas, que se expresan naturalmente o recombinantemente en seres humanos u otras células huésped. Tal y como se usa en la presente memoria, "expresa" o "expresión" incluye el proceso por el que los polinucleótidos se transcriben en ARN y/o se traducen en polipéptidos. Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARN, si se selecciona un huésped eucariota apropiado. Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras para unir la ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para unión a ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano incluye un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la transcripción la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De manera similar, un vector de expresión eucariota incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación aguas abajo, el codón de inicio AUG, y un codón de terminación para la separación del ribosoma. Dichos vectores pueden obtenerse comercialmente o ensamblarse por las secuencias descritas en métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos más adelante para la construcción de vectores en general. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico auto-replicable que transfiere un polinucleótido insertado en y/o entre células huésped. Se pretende que el término incluya vectores que funcionan principalmente para la replicación de una molécula de ácido nucleico en una célula, vectores de replicación que funcionan principalmente para la replicación de ácido nucleico y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se pretenden vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "célula huésped" se pretende que incluya cualquier célula individual o cultivo celular que puede ser, o ha sido, receptora para vectores o para la incorporación de polinucleótidos y/o polipéptidos exógenos. También se pretende incluir la progenie de una única célula. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico o total) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Las células pueden ser procariotas o eucariotas, e incluyen pero no están limitadas a células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células animales, y células de mamífero, incluyendo pero no limitado a células murinas, de rata, de simio o humanas. Tal y como se usa en la presente memoria, una "célula huésped" también incluye células genéticamente modificadas. El término "células genéticamente modificadas" incluye células que contienen y/o expresan un gen o secuencia de polinucleótido extraño o exógeno que a su vez modifica el genotipo o fenotipo de la célula o su progenie. "Genéticamente modificada" también incluye una célula que contiene o expresa un gen o secuencia de polinucleótido que se ha introducido en la célula. Por ejemplo, en esta realización, a una célula genéticamente modificada se le ha introducido un gen, siendo este gen también endógeno para la célula. El término "genéticamente modificado" también incluye cualquier adición, delección, o interrupción de los nucleótidos endógenos de una célula. Tal y como se usa en la presente memoria, una "célula huésped" puede ser cualquier célula que expresa una proteína PRG4 humana.

Tal y como se usa en la presente memoria, "homólogos" se definen en la presente memoria como dos ácidos nucleicos o péptidos que tienen secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, respectivamente, similares, o sustancialmente idénticas. El término "homólogo" engloba además moléculas de ácido nucleico que se diferencian de una de las secuencias de nucleótidos debido a la degeneración del código genético y codifican así las mismas secuencias de aminoácidos. En una de las realizaciones preferidas, los homólogos incluyen variantes alélicas, ortólogos, paralogos, agonistas, y antagonistas de los ácidos nucleicos que codifican la proteína PRG4 (por ejemplo, SEQ ID NO:1).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ortólogos" se refiere a dos ácidos nucleicos de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican péptidos que tienen la misma función o funciones similares. En particular, los ortólogos de la invención presentarán generalmente al menos 80-85%, más preferiblemente 85-90% ó 90-95%, y lo más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, o incluso 99% de identidad, ó 100% de identidad de secuencia, con toda o parte de la secuencia de aminoácidos de cualesquiera proteínas PRG4 conocidas (por ejemplo, SEQ ID NO:1), isoformas, o análogos de éstas, y presentará una función similar a estos péptidos. También tal y como se usa en la presente memoria, el término "paralogos" se refiere a dos ácidos nucleicos que están relacionados por duplicación en un genoma. Los paralogos habitualmente tienen diferentes funciones, pero estas uncciones pueden estar relacionadas.

Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de un polipéptido para el alineamiento óptimo con el otro polipéptido o ácido nucleico). Se comparan entonces los residuos de aminoácidos en posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la otra secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El mismo tipo de comparación puede hacerse entre dos secuencias de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad de secuencia = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100). Preferiblemente, los homólogos de aminoácidos aislados incluidos en la presente invención son al menos aproximadamente 50-60%, preferiblemente al menos aproximadamente 60-70%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ó 90-95%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99%, o más idénticos a una secuencia de aminoácidos completa de cualquier proteína PRG4 conocida (por ejemplo, SEQ ID NO:1).

En determinadas realizaciones, un homólogo de ácido nucleico aislado que codifica la proteína PRG4 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 40-60%, preferiblemente al menos aproximadamente 60-70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, ó 90-95%, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica secuencias de aminoácidos de dicha proteína PRG4 (por ejemplo, SEQ ID NO:1).

La determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o péptido es muy conocida en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el paquete de software Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, Bethesda, MD) para determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de ácido nucleico o péptido. En este método, se usa una penalización por apertura de hueco de 15 y una penalización por extensión de hueco de 6,66 para determinar el porcentaje de identidad de dos ácidos nucleicos. Se usa una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1 para determinar el porcentaje de identidad de dos polipéptidos. Todos los demás parámetros se ajustan a los ajustes por defecto. Para propósitos de un alineamiento múltiple (algoritmo Clustal W), la penalización por apertura de hueco es 10, y la penalización por extensión de hueco es 0,05 con la matriz blosum62. Debe entenderse que para los propósitos de determinar la identidad de secuencia cuando se compara una secuencia de ADN con una secuencia de ARN, un nucleótido de timidina es equivalente a un nucleótido de uracilo.

Además, la proteína PRG4 usada en la presente memoria incluye proteína PRG4 codificada por un polinucleótido que hibrida con el polinucleótido que codifica la proteína PRG4 en condiciones astringentes. Tal y como se usa en la presente memoria, "hibridación" incluye una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. El enlace de hidrógeno puede ocurrir por emparejamiento de bases de Watson-Crick, enlace de Hoogstein, o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura de dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo multi-cadena, una única cadena que auto-hibrida, o cualquier combinación de éstas. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Las reacciones de hibridación pueden realizarse en diferentes condiciones astringentes. La presente invención incluye polinucleótidos capaces de hibridar en condiciones de astringencia reducida, más preferiblemente condiciones astringentes, y lo más preferiblemente condiciones altamente astringentes, con polinucleótidos que codifican la proteína PRG4 descrita en la presente memoria. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "condiciones astringentes" se refiere a la hibridación toda la noche a 60°C en disolución 10x de Denhart, 6xSSC, 0,5% SDS, y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las transferencias se lavan secuencialmente a 62°C durante 30 minutos cada vez en 3xSSC/0,1% SDS, seguido de 1xSSC/0,1% SDS, y finalmente 0,1xSSC/0,1% SDS. También tal y como se usa en la presente memoria, en determinadas realizaciones, la expresión "condiciones astringentes" se refiere a la hibridación en disolución 6xSSC a 65°C. En otras realizaciones, "condiciones altamente astringentes" se refiere a la hibridación toda la noche a 65°C en disolución 10x de Denhart, 6xSSC, 0,5% SDS y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las transferencias se lavan secuencialmente a 65°C durante 30 minutos cada vez en 3xSSC/0,1% SDS, seguido de 1xSSC/0,1% SDS, y finalmente 0,1xSSC/0,1% SDS. Los métodos para las hibridaciones de ácido nucleicos son muy conocidos en la técnica. De acuerdo con esto, las proteínas PRG4 codificadas por ácidos nucleicos usadas en la presente memoria incluyen ácido nucleico que tiene al menos 60% de homología, preferiblemente 75% de homología, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, lo más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con una secuencia de polinucleótido que codifica una proteína PRG4 humana (por ejemplo, SEQ ID NO:1) o una isoforma u homólogo específico de ésta.

Además, las proteínas PRG4 usadas en la presente memoria también pueden ser proteínas quiméricas o proteínas de fusión. Tal y como se usa en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende un primer polipéptido unido de manera operativa a un segundo polipéptido. Las proteínas quiméricas pueden comprender opcionalmente un tercer, cuarto o quinto u otro polipéptido unido de manera operativa a un primer o segundo polipéptido. Las proteínas quiméricas pueden comprender dos o más polipéptidos diferentes. Las proteínas

quiméricas pueden comprender múltiples copias del mismo polipéptido. Las proteínas quiméricas también pueden comprender una o más mutaciones en uno o más de los polipéptidos. Los métodos para preparar proteínas quiméricas son muy conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente invención, la proteína quimérica es una químera de proteína PRG4 con otras isoformas de la proteína PRG4.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, una proteína, polinucleótido o molécula "aislada" o "purificada" significa retirada del entorno en el que aparece naturalmente, o que carece sustancialmente de material celular, tal como otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido del que deriva la proteína, polinucleótido o molécula, o que carece sustancialmente de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje "que carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones separadas de  
10 componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente o sintetiza. En determinadas realizaciones, el lenguaje "que carece sustancialmente de material celular" incluye preparaciones de una proteína PRG4 que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de otras proteínas (también referidas en la presente memoria como "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20%, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de otras proteínas. Cuando la proteína o polinucleótido se produce recombinantemente, preferiblemente también carece sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de la proteína de interés.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica para el uso de la presente invención es adecuada para la administración tópica en una superficie ocular de un individuo que necesita una concentración farmacéuticamente eficaz de la proteína PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable, y en combinación con uno o más agentes oftálmicamente aceptables. Los agentes oftálmicamente aceptables pueden seleccionarse del grupo que consiste en un demulcente, excipiente, astringente, vasoconstrictor y emoliente oftálmicamente aceptables. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "concentración o cantidad eficaz" o "concentración o cantidad terapéuticamente eficaz" se pretende que signifique una concentración o cantidad no tóxica pero suficiente de una proteína PRG4 u otros agentes terapéuticos para proporcionar los efectos terapéuticos deseados. La concentración o cantidad que es eficaz variará entre sujetos, dependiendo de la edad y condición general del individuo, los agentes particulares, y semejantes. Así, no siempre es posible especificar una concentración o cantidad eficaz exacta. Sin embargo, una concentración o cantidad eficaz apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria. Además, la concentración o cantidad eficaz exacta de una proteína PRG4 y otro agente terapéutico incorporado en una composición o forma de dosificación de la presente invención no es crítica, siempre que la concentración esté en un intervalo suficiente para permitir la aplicación fácil de la disolución o formulación de manera que se administre una cantidad de la proteína PRG4 y otros agentes activos que esté en un intervalo terapéuticamente eficaz.

35 En determinadas realizaciones, la concentración farmacéuticamente eficaz de proteína PRG4 está en un intervalo de 10-10.000 µg/mL, preferiblemente 50-500 µg/mL. Tal y como se usa en la presente memoria, los agentes oftálmicamente aceptables que comprenden los demulcentes, excipientes, astringentes, vasoconstrictores y emolientes oftálmicamente aceptables están definidos completamente en el Code of Federal Regulations 21CFR349.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "administración tópica" se usa en su sentido convencional para significar la administración de la composición que comprende la proteína PRG4 y uno o más agentes oftálmicamente aceptables en el ojo. En general, la administración tópica se consigue mediante una formulación líquida para gotas oculares o lavado y proporciona un efecto local.

En determinadas realizaciones, cualquier composición farmacéutica descrita en la presente memoria comprende o los agentes oftálmicamente aceptables mencionados anteriormente se combinan o pueden combinarse con uno o más de carboximetilcelulosa de sodio (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,5% p/v), hidroxietil celulosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,5% p/v), hipromelosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,5% p/v), metilcelulosa (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2,5% p/v), dextrano 70 (por ejemplo, aproximadamente 0,1% p/v), gelatina (por ejemplo, aproximadamente 0,01% p/v), glicerina (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% p/v), polietileno glicol 300 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% p/v), polietileno glicol 400 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% p/v), polisorbato 80 (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% p/v), propileno glicol (por ejemplo, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% p/v), polivinil alcohol (por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4% p/v), povidona (por ejemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2% p/v) sulfato de cinc (por ejemplo, aproximadamente 0,25% p/v), lanolina anhidra (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10% p/v), lanolina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10% p/v), aceite mineral ligero (por ejemplo, ≤ aproximadamente 50% p/v), aceite mineral (por ejemplo, ≤ aproximadamente 50% p/v), parafina (por ejemplo, ≤ aproximadamente 5% p/v), petrolato (por ejemplo, ≤ aproximadamente 100% p/v), pomada blanca (por ejemplo, ≤ aproximadamente 100% p/v), petrolato blanco (por ejemplo, ≤ aproximadamente 100% p/v), cera blanca (por ejemplo, ≤ aproximadamente 5% p/v), cera amarilla (por ejemplo, ≤ aproximadamente 5% p/v), hidrocloreuro de efedrina (por ejemplo, aproximadamente 0,123% p/v), hidrocloreuro de nafazolina (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,03% p/v), hidrocloreuro de

fenilefrina (por ejemplo, aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,2% p/v), e hidrocloreto de tetrahidrozolina (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05% p/v). En determinados casos, las cantidades en porcentaje utilizadas en la presente memoria son cantidades en porcentaje en peso.

5 En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención que comprende una proteína PRG4 en combinación con uno o más agentes oftálmicamente aceptables discutidos anteriormente comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de ácido hialurónico o hialuronato de sodio en el intervalo de 10-100.000 µg/mL, preferiblemente 500-5.000 µg/mL. Además, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención comprende además uno o más fosfolípidos activos de superficie en el intervalo de 10-10.000 µg/mL, dichos fosfolípidos activos de superficie incluyen, pero no están limitados a, L-α-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (Sp), u otros lípidos neutros y polares.

15 La composición farmacéutica para el uso de la presente invención puede comprender además uno o más transportadores o vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden cualesquiera materiales aceptables, y/o uno cualquiera o más aditivos conocidos en la técnica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "transportadores" o "vehículo" se refiere a materiales transportadores adecuados para la administración tópica del fármaco. Los transportadores y vehículos útiles en la presente memoria incluyen cualesquiera de dichos materiales conocidos en la técnica, que no son tóxicos y no interaccionan con los demás componentes de la composición de una manera perjudicial. Pueden incluirse en la composición varios aditivos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, disolventes, incluyendo cantidades relativamente pequeñas de alcohol, pueden usarse para solubilizar determinadas sustancias fármacos. Otros aditivos opcionales incluyen opacificantes, antioxidantes, fragancia, colorante, agentes de gelificación, agentes espesantes, estabilizadores, tensioactivos, y semejantes. También pueden añadirse otros agentes, tales como agentes antimicrobianos, para prevenir el deterioro durante el almacenamiento, es decir, para inhibir el crecimiento de microbios tales como levaduras y hongos. Los agentes antimicrobianos adecuados se seleccionan típicamente del grupo que consiste en los ésteres de metilo y propilo de ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propil parabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidurea, y combinaciones de éstos. Los potenciadores de la permeación y/o aditivos que mitigan la irritación también pueden incluirse en la composición farmacéutica de la presente invención.

20 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica para el uso de la presente invención se prepara en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada osmóticamente de electrolitos lagrimales, incluyendo uno o más de cloruro de sodio en aproximadamente 44% a aproximadamente 54% de fracción molar, cloruro de potasio en aproximadamente 8% a aproximadamente 14% de fracción molar, bicarbonato de sodio en aproximadamente 8% a aproximadamente 18% de fracción molar, bicarbonato de potasio en aproximadamente 0% a aproximadamente 4% de fracción molar, cloruro de calcio en aproximadamente 0% a aproximadamente 4% de fracción molar, cloruro de magnesio en aproximadamente 0% a aproximadamente 4% de fracción molar, citrato de trisodio en aproximadamente 0% a aproximadamente 4% de fracción molar, y ácido clorhídrico en aproximadamente 0% a aproximadamente 20% de fracción molar o hidróxido de sodio en aproximadamente 0% a aproximadamente 20% de fracción molar. En determinadas realizaciones, el vehículo farmacéutico puede formularse para generar una disolución acuosa de electrolitos en el intervalo de aproximadamente 150-200 mM. Otras formulaciones adecuadas, tales como pomadas, cremas, geles, pastas, y semejantes, adecuadas para la administración tópica, también se contemplan en la presente invención. En determinadas realizaciones, los electrolitos proporcionan un equilibrio osmótico apropiado cuando se combinan con PRG4 para preparar una disolución oftálmicamente aceptable.

25 El presente documento describe además un método para tratar lubricación ocular por capa límite disminuida o indeseada, síntomas asociados con ésta, o una afección que está asociada con o causa una deficiencia en la lubricación ocular, en un individuo que la necesita, que comprende administrar tópicamente en la superficie ocular del individuo que lo necesita una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína PRG4. El método puede comprender administrar tópicamente una composición farmacéutica que comprende la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína PRG4 que está suspendida en una disolución salina tamponada con fosfato o una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable que comprende uno o más electrolitos. En otro aspecto más, el método comprende administrar tópicamente una composición farmacéutica que comprende la proteína PRG4 formulada en una formulación oftálmicamente aceptable que comprende uno o más agentes oftálmicamente aceptables adicionales como se ha discutido anteriormente.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratar o tratamiento" se refiere a la reducción de la gravedad y/o frecuencia de síntomas, eliminación de síntomas y/o causa subyacente, prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente; y mejora o remedio del daño. El término "tratar o tratamiento" también engloba tanto la prevención de un trastorno en un individuo predispuesto como el tratamiento del trastorno en un individuo clínicamente sintomático.

35 En determinadas realizaciones, la lubricación ocular por capa límite disminuida está causada por la pérdida lagrimal evaporativa incrementada o película lagrimal inestable en el bucle ocular de capa límite. Dicha lubricación ocular por capa límite disminuida o indeseada está asociada con enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, síndrome de Sjögren, queratoconjuntivitis seca (KCS), deficiencia de andrógenos, enfermedad de la glándula meibomiana, terapia

de reemplazo de estrógenos, uso de lentes de contacto, cirugía refractiva, alergia, tiempo de rotura de la película lagrimal reducido, película lagrimal comprometida, trastornos de la superficie ocular, niveles incrementados de proteasas en la película lagrimal y en la superficie ocular, inflamación crónica, hiperosmolaridad, y envejecimiento. Como se ha discutido anteriormente, la tensión de cizalla incrementada da lugar a inestabilidad de la película lagrimal, pérdida lagrimal evaporativa, hiperosmolaridad, cambios en la presión de hinchazón y una elevación por retroalimentación de la tensión de cizalla. La tensión de cizalla incrementada también estimula la inflamación, deficiencia de andrógenos y expresión disminuida de proteoglicanos. Con el tiempo, la tensión de cizalla incrementada y sus secuelas dan lugar a una pérdida de la lubricación por capa límite en la superficie ocular. De acuerdo con esto, el presente documento describe un método para reducir la tensión de cizalla mediante la reposición y enriquecimiento de la expresión de proteoglicanos, tales como proteína PRG4 en la superficie ocular, de manera que se previene o incrementa la lubricación ocular por capa límite.

También debe entenderse que lo anterior se refiere a realizaciones preferidas de la presente invención y que pueden hacerse numerosos cambios a ésta sin apartarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos siguientes, que no deben considerarse de ninguna manera como limitaciones impositivas en el alcance de ésta.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Expresión del ARNm de PRG4 en células epiteliales corneales y conjuntivales humanas

Se aislaron células epiteliales corneales humanas de los bordes corneoesclerales de donantes masculinos y femeninos. Las células se procesaron bien directamente (n= 8), o primero se cultivaron en medio sin suero de queratinocitos sin rojo fenol (n= 2). Las conjuntivas bulbares (n= 2), muestras de citología de impresión conjuntival (n= 9), células epiteliales conjuntivales humanas inmortalizadas después de cultivo (n= 1), glándulas lagrimales de ratón NOD (n= 5 ratones adultos/sexo, 10 glándulas/muestra), y glándulas meibomianas de ratón BALB/c (n= 7 ratones adultos/sexo, glándulas de 28 párpados/muestra) durante procedimientos quirúrgicos. Estas muestras se procesaron para el análisis de ARNm de PRG4 usando principalmente RT-PCR (n= 18 humano, todos ratón) y Affymetrix GeneChips (n=4 córneas humanas). Los cebadores de PRG4 para PCR abarcaron más de 1 kpb de secuencias intrón, con el fin de suprimir la amplificación de ADN cromosómico contaminante (Tabla 1). Las muestras amplificadas se cribaron para la presencia de productos de PRG4 usando electroforesis en gel de agarosa y un Bioanalizador Agilent 2100. Para confirmar la identidad de amplicones, se secuenciaron los productos de PCR de las muestras de córnea (n= 2), células epiteliales conjuntivales (n= 1) y un estándar de hígado humano (n= 1) con un Analizador Genético 3100 en el Massachusetts Eye and Ear Infirmary DNA Sequencing Center for Vision Research (Boston, MA) y los datos resultantes se analizaron con búsquedas BLAST de las bases de datos GenBank.

Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos diseñados para el análisis por RT-PCR del ARNm de PRG4

<u>Especie</u>	<u>Orientación</u>	<u>Secuencia de nucleótidos (5'-3')</u>	<u>Exones</u>
35 Amplicón			
	<u>Tamaño (pb)</u>		
Humano	Con sentido	<b>GATGCAGGGTACCCCAA (SEQ ID NO:2)</b>	9-12
526	Antisentido	<b>CAGACTTTGGATAAGGTCTGCC (SEQ ID NO:3)</b>	

40 Se demostró que el ARNm de PRG4 está presente en todas las muestras de células epiteliales corneales y conjuntivales humanas y de citología de impresión. La identidad de los productos de PCR de PRG4 se confirmó por el análisis de la secuencia del ADN (Tabla 2). Los resultados muestran que PRG4 se transcribe en las células epiteliales corneales y conjuntivales humanas.

Tabla 2. Identificación de secuencias de amplicón de muestras humanas de córnea, conjuntivales e hígado

45

ES 2 530 723 T3

	Secuenciación	Pares de Bases Alineados	Pares de Bases Totales	Búsqueda BLASTn
	<u>Dirección</u>	<u>A PRG4 Humano</u>	<u>de Amplicón</u>	<u>Identidad</u>
Estándar de Hígado Humano				
A	Directo	495	500	Humano
PRG4				
A	Inverso	488	491	Humano
PRG4				
B	Directo	496	499	Humano
PRG4				
B	Inverso	498	500	Humano
PRG4				
Córnea Humana (mujer de 24 años de edad)				
A	Directo	497	499	Humano
PRG4				
A	Inverso	490	492	Humano
PRG4				
B	Directo	500	504	Humano
PRG4				
B	Inverso	498	501	Humano
PRG4				
Córnea Humana (mujer de 51 años de edad)				
A	Directo	498	499	Humano
PRG4				
A	Inverso	474	489	Humano
PRG4				
B	Directo	496	498	Humano
PRG4				
B	Inverso	490	491	Humano
PRG4				
Células Epiteliales Conjuntivales Humanas				
A	Directo	496	499	Humano
PRG4				
A	Inverso	490	492	Humano
PRG4				

	Secuenciación	Pares de Bases Alineados	Pares de Bases Totales	Búsqueda BLASTn
	<u>Dirección</u>	<u>A PRG4 Humano</u>	<u>de Amplicón</u>	<u>Identidad</u>
B	Directo	495	499	Humano
PRG4				
B	Inverso	474	491	Humano
PRG4				

Se secuenciaron dos muestras diferentes (A y B) de cada preparación en direcciones directa e inversa. Las muestras de córnea humana eran células epiteliales de los bordes corneoesclerales de donantes femeninas. El número de registro del gen para PRG4 humano es NM\_005807.

## Ejemplo 2

### 5 Reducción de la fricción *in vitro* con la adición de PRG4 (lubricina)

A continuación se describe un ensayo de fricción *in vitro* con interfases clínicamente relevantes, tales como una interfase superficie ocular-párpado y superficie ocular-lente de contacto. Actualmente no existen métodos clínicamente relevantes capaces de evaluar cuantitativamente la capacidad lubricante de lágrimas artificiales. Los ensayos de fricción con superficies sintéticas (por ejemplo, látex y vidrio) o superficies "nativas" no oculares (por ejemplo, segmentos de la vena del cordón umbilical) pueden facilitar algunas, pero probablemente no todas, las interacciones moleculares que ocurren durante la articulación/parpadeo. De hecho, la relevancia de los datos obtenidos con interfases no tisulares no está clara.

Se ha mostrado que una configuración de ensayo con anillo en disco rotacional es ideal para estudiar la lubricación por capa límite en una interfase articular cartilago-cartilago. Un modo de lubricación por capa límite se indica porque la fricción cinética no se altera con factores que influyen en la formación de una película de fluido, incluyendo la velocidad de deslizamiento y la carga axial. Esto es porque se está produciendo el contacto superficie a superficie, y las moléculas unidas a la superficie contribuyen a la lubricación (disminuyendo la fricción y deterioro). Se ha descubierto que la lubricación por capa límite es un mecanismo crítico y operativo en la superficie ocular, como lo es en la superficie del cartilago articular. Por lo tanto, el ensayo de fricción *in vitro* desarrollado previamente y caracterizado para estudiar la lubricación por capa límite en una interfase articular cartilago-cartilago se modificó para el estudio de las interfases superficie ocular-párpado y superficie ocular-lente de contacto.

Para determinar las condiciones de ensayo en las que la lubricación por capa límite es dominante en las interfases superficie ocular-párpado y superficie ocular-lente de contacto, se examinó la dependencia de las propiedades friccionales en la carga axial y la velocidad de deslizamiento. Se obtuvieron superficies oculares humanas normales frescas (córneas reseccionadas con ~ 3 mm de esclera) del Lions Eye Bank de Alberta. Las córneas reseccionadas se almacenaron en Optisol-GS a 4°C y se usaron en 2 semanas. Los párpados (edad 60-80 años de edad) se obtuvieron de la University of Calgary Body Donation Program en 1-3 días después de la muerte y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20°C en disolución salina como máximo durante 2 semanas hasta el uso. Los lubricantes comparativos consistieron en Lens Plus Sterile Saline Solution (Advanced Medical Optics) como un control negativo; Systane® Lubricant Eye Drops (Alcon Laboratories), Refresh Tears Lubricant Eye Drops (Allergan), Aquify® Long Lasting Comfort Drops (CIBA Vision) y Blink® Tears Lubricant Eye Drops (Advanced Medical Optics) como lubricantes de ensayo.

El esquema del ensayo de fricción se muestra en la Figura 6. La superficie ocular corneal (605) se fijó al extremo esférico de un tapón de cilindro de goma semi-rígido no permeable inerte (603) (radio  $r = 6$  mm) aplicando super pegamento a la esclera. Este tapón de cilindro (603) se unió al activador rotacional de la máquina de ensayo mecánico (BoseELF 3200) formando así la superficie articular inferior. Se perforó un anillo (601) (radio exterior= 3,2 mm, radio interior= 1,5 mm) del párpado (604) y se unió al activador lineal acoplado con una carga axial (N) y célula de carga de torsión ( $\tau$ ), formando así la superficie articulante superior. Se formó un baño de lubricante 602 asegurando un tubo inerte alrededor del tapón de cilindro (603).

Las muestras se ensayaron en primer lugar en disolución salina, después en uno de los tres (3) lubricantes de ensayo. El baño de lubricante se rellenó con ~ 0,3 ml, y se dejó que las superficies articulares se equilibraran con el lubricante. Las superficies de las muestras se pusieron lentamente (0,05 mm/s) en contacto y se comprimieron hasta que el tapón esférico se aplanó y la superficie del párpado anular completa estuvo en contacto con la córnea (605). La tensión normal resultante (calculada de la carga axial como, en unidades de MPa, como  $N/(\pi[r_{\text{exterior}}^2 - r_{\text{interior}}^2])$ ) puede variarse usando tapones de goma con diferentes grados de rigidez para mimetizar las tensiones fisiológicas ~ 5 kPa. La secuencia del ensayo se inició preconditionando la muestra por rotación de +4 revoluciones (rev) y reajuste con -4 revoluciones a una velocidad de deslizamiento lineal eficaz fisiológicamente relevante,  $v_{\text{eff}} = 30$  mm/s (en la que  $v_{\text{eff}} = \omega R_{\text{eff}}$ ,  $\omega$  es la frecuencia angular, y  $R_{\text{eff}} = 2,4$  mm es el radio eficaz calculado integrando la

distribución de la tensión de cizalla sobre el área de contacto anular). Las muestras se ensayaron rotando +4 revoluciones, seguido inmediatamente de -4 revoluciones de reajuste a  $v_{eff} = 30, 10, 1, 0,3$  y entonces 30 mm/s, con un tiempo de permanencia de 12 segundos entre cada revolución. La secuencia de ensayo se repitió en la dirección de rotación opuesta.

- 5 Para evaluar las propiedades de lubricación de la superficie ocular, dos coeficientes de fricción ( $\mu$ ) de la forma  $\mu = \tau / (R_{eff} N)$  donde  $\tau$  es torque,  $R_{eff}$  es radio eficaz, y  $N$  es carga axial, descrito anteriormente. Un coeficiente de fricción estática, que refleja la resistencia al inicio del movimiento,  $\mu_{estática}$  se calculó como el valor del pico de  $\mu$ , justo después (en  $\sim 10^0$ ) del comienzo de la rotación. Un coeficiente de fricción cinética promedio, que refleja la resistencia a movimiento en estado estacionario,  $\langle \mu_{cinética} \rangle$  se calculó a partir de  $\mu$  promedio durante la tercera y
- 10 cuarta revolución de ensayo completa. Tanto  $\mu_{estática}$  como  $\langle \mu_{cinética} \rangle$  se promediaron para las revoluciones + y - en cada ensayo para tener en cuenta los efectos direccionales potenciales en las medidas de  $\tau$ . Los datos se recogieron a una frecuencia de 20 Hz.

- 15 Los resultados de lubricina (PRG4) añadida a la superficie corneal a una concentración en el intervalo de 100- 300  $\mu\text{g/mL}$  se muestran en la Figura 7. La lubricina tuvo un efecto de disminución de la fricción en la interfase del párpado, tanto en términos de fricción cinética como estática, a todas las velocidades. A una concentración 1/10 de la de ácido hialurónico fisiológico, la lubricina fue similar a Blink® Tears Lubricant Eye Drops, que contiene ácido hialurónico. En combinación, los dos lubricantes son mejores que cada uno de ellos solo.

- 20 La Figura 8 demuestra la reducción de la fricción cinética córnea/parpado *in vitro* medida durante el primer minuto después de la adición de lubricina, comparado con las gotas oculares Aquify®. Los lubricantes se lavaron concienzudamente de la superficie ocular usando disolución salina entre los ensayos. Fue evidente un efecto sinérgico ( $\mu_{cinética}$  reducido más que cada uno de ellos solo) cuando Aquify® (con ácido hialurónico) se combinó con lubricina. La repetición de disolución salina fue menor que el control de disolución salina original. Esto mostró una retención del efecto de la lubricina incluso después de lavar con disolución salina, sugiriendo que las moléculas se estaban uniendo a la superficie ocular, y que la lubricina demostró un tiempo de retención superior comparado con
- 25 hialuronato de sodio solo.

- 30 La Figura 9 demuestra la reducción de la fricción cinética córnea/parpado *in vitro* medida durante el 5º minuto después de la adición de lubricina, comparado con las gotas oculares Aquify®. Fue evidente un efecto sinérgico ( $\mu_{cinética}$  reducido más que cada uno de ellos solo) cuando Aquify® (con ácido hialurónico) se combinó con lubricina. El coeficiente de fricción de Aquify® había vuelto a equivalencia estadística con disolución salina después de 5 minutos, mientras la lubricina permaneció más baja, al igual que la combinación de lubricina y ácido hialurónico.

La Figura 10 muestra la reducción del coeficiente de fricción cinética con el tiempo, después de la adición de lubricina. De nuevo, la reducción continua sugirió unión a la superficie ocular.

### Ejemplo 3

Tratamiento de lubricación ocular por capa límite deficiente *in vivo*

- 35 Un paciente que se quejaba de irritación de la superficie ocular se examina para lubricación ocular o afecciones asociadas con una deficiencia en la lubricación ocular midiendo los síntomas mayores de 2 respuestas positivas en el cuestionario McMonnies, mayores de una puntuación de 5 en el Índice de Enfermedad de Superficie Ocular (OSDI), o a través de la evidencia de algunos síntomas en la Escala Analógica Visual, en combinación con signos objetivos incluyendo uno o más de tiempo de rotura de la película lagrimal reducido (menos de  $\approx 10$  segundos),
- 40 osmolaridad del menisco lagrimal lateral inferior mayor de 308 mOsm/L, valor de tira de Schirmer bajo (menos de  $\approx 10$  mm), tinción corneal o conjuntival con fluoresceína de sodio (puntuaciones  $> 0$  con macropunteados múltiples), restos significativos resultantes de la citología de impresión, disfunción de la glándula meibomiana determinada por cualquier medio, una disminución en la velocidad de desplazamiento post-parpadeo de una lente de contacto, un cambio en la función de transferencia espacio-temporal de una lente de contacto después de la aplicación de una
- 45 serie de impulsos de presión, una disminución en la velocidad de relajación de la película lagrimal interferométrica post-parpadeo, un incremento en la concentración de citoquinas proinflamatorias, una concentración reducida de lactoferrina o lisozima, o un incremento en la velocidad de decoherencia de la función de dispersión de punto post-parpadeo.

- 50 El paciente se administra 1 a 2 gotas en la superficie de cada ojo de una disolución que contiene 200  $\mu\text{g/mL}$  de proteína PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable. Se instruye al paciente que cierre sus ojos durante 10 segundos.

- 55 Las visitas de seguimiento pueden monitorizar una reducción en la osmolaridad lagrimal lateral inferior, tiempo de rotura de la película lagrimal incrementado, o los demás signos mencionados anteriormente. En particular, si la osmolaridad de la película lagrimal se reduce desde un valor anormal (quizá 330 mOsm/L) a un valor más normal (quizá 304 mOsm/L), la modulación y la reposición terapéutica de la lubricación de la superficie ocular se consideraría exitosa.

REFERENCIAS

1. G. D. Jay, *Curr Opin Orthop* 15, 355 (2004).
2. D. A. Swann, R. B. Hendren, E. L. Radin, S. L. Sotman, E. A. Duda, *Arthritis Rheum* 24, 22 (1981).
3. G. D. Jay, D. E. Britt, D.-J. Cha, *J Rheumatol* 27, 594 (2000).
4. G. D. Jay, *Connect Tissue Res* 28, 71 (1992).
5. G. D. Jay, B. P. Lane, L. Sokoloff, *Connect Tissue Res* 28, 245 (1992).
6. G. D. Jay, B.-S. Hong, *Connect Tissue Res* 28, 89 (1992).
7. G. D. Jay, K. Haberstroh, C.-J. Cha, *J Biomed Mater Res* 40, 414 (1998).
8. G. D. Jay, D. A. Harris, C.-J. Cha, *Glycoconj J* 18, 807 (2001).
9. G. D. Jay, U. Tantravahi, D. E. Britt, H. J. Barrach, C. J. Cha, *J Orthop Res* 19, 677 (2001).
10. C. R. Flannery et al., *Biochem Biophys Res Commun* 254, 535 (1999).
11. B. L. Schumacher, J. A. Block, T. M. Schmid, M. B. Aydelotte, K. E. Kuettner, *Arch Biochem Biophys* 311, 144 (1994).
12. T. Schmid, V. Soloveyichik, K. Kuettner, B. Schumacher, *Trans Orthop Res Soc* 26, 178 (2001).
13. S. G. Rees et al., *Matrix Biology* 21, 593 (2002).
14. Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL. Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res*. 2005 May;23(3):562-8.
15. J. Marcelino et al., *Nat Genet* 23, 319 (1999).
16. D. K. Rhee et al., *J Clin Invest* 115, 622 (2005).
17. B. Xia, J. A. Royall, G. Damera, G. P. Sachdev, R. D. Cummings, *Glycobiology* 15, 747 (Aug, 2005).
18. K. Godl et al., *J Biol Chem* 277, 47248 (Dec 6, 2002).
19. D. A. Swann, S. Sotman, M. Dixon, C. Brooks, *Biochem J* 161, 473 (1977).
20. Schmidt TA, Plaas AH, Sandy JD. Disulfide-bonded multimers of proteoglycan 4 (PRG4) are present in normal synovial fluids. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Mar 27.

21. K. A. Elsaid, G. D. Jay, M. L. Warman, D. K. Rhee, C. O. Chichester, *Arthritis Rheum* 52, 1746 (Jun, 2005).
22. G. D. Jay et al., *J Rheumatol* 31, 557 (2004).
23. A. M. Malfait et al., *J Rheumatol* 21, 314 (Feb, 1994).
24. T. A. Schmidt et al., en *Physical Regulation of Skeletal Repair* R. K. Aaron, M. E. Bolander, Eds. (American Academy of Orthopaedic Surgeons, Chicago, 2005) pp. 151-162.
25. Nugent-Derfus GE, Chan AH, Schumacher BL, Sah RL. PRG4 exchange between the articular cartilage surface and synovial fluid. *J Orthop Res*. 2007 Oct;25(10):1269-76.
26. T. A. Schmidt, B. L. Schumacher, G. E. Nugent, N. S. Gastelum, R. L. Sah, *Trans Orthop Res Soc* 30, 900 (2005).
27. Nugent GE, Aneloski NM, Schmidt TA, Schumacher BL, Voegtline MS, Sah RL. Dynamic shear stimulation of bovine cartilage biosynthesis of proteoglycan 4. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun;54(6):1888-96.
28. D. K. Rhee et al., *J Biol Chem* 280, 31325 (2005).
29. T. J. Klein et al., *Osteoarthritis Cartilage* 11, 595 (2003).
30. K. C. Morrell, W. A. Hodge, D. E. Krebs, R. W. Mann, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14819 (Oct 11, 2005).
31. E. Meyer, R. M. Overmey, K. Dransfeld, T. Gyalog, *Nanoscience: Friction and Rheology on the Nanometer Scale* (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, River Edge, Nueva Jersey, 2002), pp. 373.
32. C. W. McCutchen, *Fed Proceedings* 25, 1061 (1966).
33. T. Murakami, Y. Sawae, M. Ihara, *JSME Int J Series C-Mechanical Systems Machine Elements & Manufacturing* 46, 594 (2003).
34. G. Meachim, *Ann Rheum Dis* 31, 457 (1972).
35. D. Dowson, *Proc Inst Mech Eng [H]* 215, 335 (2001).
36. G. A. Ateshian, V. C. Mow, en *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology* V. C. Mow, R. Huiskes, Eds. (Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 2005) pp. 447-494.
37. F. Guilak. *Arthritis Rheum* 52, 1632 (Jun, 2005).
38. K. C. Morell, W. A. Hodge, D. E. Krebs, R. W. Mann, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14819 (Oct 11, 2005).
39. S. A. V. Swanson, en *Adult Articular Cartilage* M. A. R. Freeman, Ed. (Pitman Medical, Tunbridge Wells, Inglaterra, 1979) pp. 415-460

40. Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO. Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:108-116.
41. Elsaid KA, Jay GD, Warman ML, Rhee DK, Chichester CO. Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1746-1755.
42. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Serio B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:538-547.
43. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Pizzomi C, Paolino S, Serio B, Felli L, Straub RH. Anti-TNF and sex hormones. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:391-400.
44. Schmidt M, Naumann H, Weidler C, Schellenberg M, Anders S, Straub RH. Inflammation and sex hormone metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:236-246.
45. Rontzsch A, Thoss K, Petrow PK, Henzgen S, Brauer R. Amelioration of murine antigen-induced arthritis by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Inflamm Res* 2004;53:189-198.
46. Zierhut M, Dana MR, Stern ME, Sullivan DA. Immunology of the Lacrimal Gland and Ocular Tear Film. *Trends Immunol* 2002;23:333-335
47. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-416.
48. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4309-4315.
49. Sullivan DA, Sullivan BD, Evans JE, Schirra F, Yamagami H, Liu M, Richards SM, Suzuki T, Schaumberg DA, Sullivan RM, Dana MR. Androgen deficiency, meibomian gland dysfunction and evaporative dry eye. *Ann NY Acad Sci* 2002;966:211-222.
50. Sullivan DA. Tearful relationships? Sex, hormones and aqueous-deficient dry eye. *Ocular Surface* 2004;2:92-123.
51. Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA* 2001;286:2114-2119.
52. de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol.* 2006;7:R72. Epub 2006.
53. Schirra F, Suzuki T, Dickinson DP, Townsend DJ, Gipson IK, Sullivan DA. Identification of steroidogenic enzyme mRNAs in the human lacrimal gland, meibomian gland, cornea and conjunctiva. *Cornea* 2006;25:438-42.

54. Schwarz IM, Hills BA, Br. J. Rheum. 1998;37:21-26.
55. Jay GD, Hong BS. Connect Tissue Res, 1992; 28(1-2):89-98.
56. Matnelli F, Argüeso P, Curr Opin Allergy Clin Immuno, 2008; 8(5):477-483.
57. Jones MB. et. al. Mathematical Medicine and Biology 2005; 22, 265.
58. Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. J Orthop Res. 1999 Jan;17(1):110-20.
59. Schmidt TA, Gastelum NS, Nguyen QT, Schumacher BL, Sah RL. Boundary lubrication of articular cartilage: role of synovial fluid constituents. Arthritis Rheum. 2007 Mar;56(3):882-91.
60. Schmidt TA, Plaas AH, Sandy JD. Disulfide-bonded multimers of proteoglycan 4 (PRG4) are present in normal synovial fluids. Biochim Biophys Acta. 2009 Mar 27.
61. Sullivan DA. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). Ocular Surface. 2007 abr ;5(2):75-92.

LISTADO DE SECUENCIAS

**SEC ID NO: 1**

MAWKTLPIYLLLLLSVFVIQQVSSQDLSSCAGRCGEGYSRDATCNCQHY  
MECCPDFKRVTAEALSCKGRCFESFERGREDCDAQCKKYDKCCPDYESFCAE  
VHNPTSPSSKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKKTKKVIIESEEITEEHSVSE  
NQESSSSSSSSSSSSSTIRKIKSSKNSAANRELQKKLVKDNKKNRTKKKPTPKPP  
VVDEAGSGLDNGDFKVTTPTDSTTQHNVSTSPKITTAKPINRPSLPPNSDTSK  
ETSLTVNKETTIVETKETTITNKQTSTDGKEKTTSAKETQSIEKTSKDLAPTSK  
VLAKPTPKAETTTKGPALTPKEPTPTTPKEPASTTPKEPTPTTIKSAPTTPEPA  
PTTTKSAPTTPEPAPTTTKEPAPTTPEPAPTTTKEPAPTTTKSAPTTPEPAP  
TPKKPAPTTPEPAPTTPEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTPEPAPTTTKEPAP  
PKAPTTPEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAP  
EPSPTTTKEPAPTTPEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAP  
EPAPTTPEKAPTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTT  
PAPTTPKAAAPNTPEPAPTTPEPAPTTPEPAPTTPEKAPTTTPEKAPTTTPE  
EPAPTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAP  
APTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTT  
TTPKEPAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTTPEKAPTTT  
PKALENSPKEPGVPTTKTPAATKPEMTTAKDKTTERDLRTPPETTTAAPKMT  
KETATTTTEKTTESKITATTTQVTSTTTQDTPFKITTLKTTTLAPKVTTTKKTIT  
TEIMNKPEETAKPKDRATNSKATTPKPQKPTKAPKKPTSTKKPKTMPRVKPK  
TTPTPRKMTSTMPELNPTSRIAEAMLQTTTRPNQTPNSKLVEVNPKSEDAGGAE  
GETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLPRVNPQGIINPMLSDETNICNGKPV DGLT  
TLRNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPARRITEVWGIPSPIDTVFTRCNCEGKTF  
FKDSQYWRFTNDIKDAGYPKPIFKGFGGLTGQIVAALSTAKYKNWPESVYFFK  
RGGSIQQYIYKQEPVQKCPGRRPALNYPVYGETTQVRRRRFERAIGPSQHTIRI  
QYSPARLAYQDKGVLHNEVKVSILWRGLPNVVTSAISLPNIRKPDGYDYYAFS  
KDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQTLKVVWYNCP

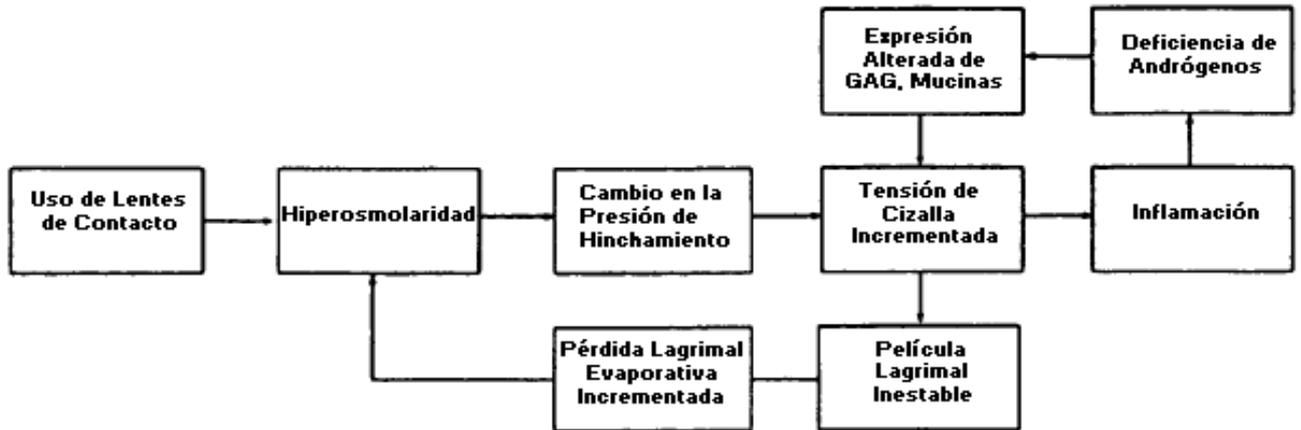
**SEC ID NO: 2:** GATGCAGGGTACCCCAA (humana, con sentido)

**SEC ID NO: 3:** CAGACTTTGGATAAGGTCTGCC (humana, antisentido)

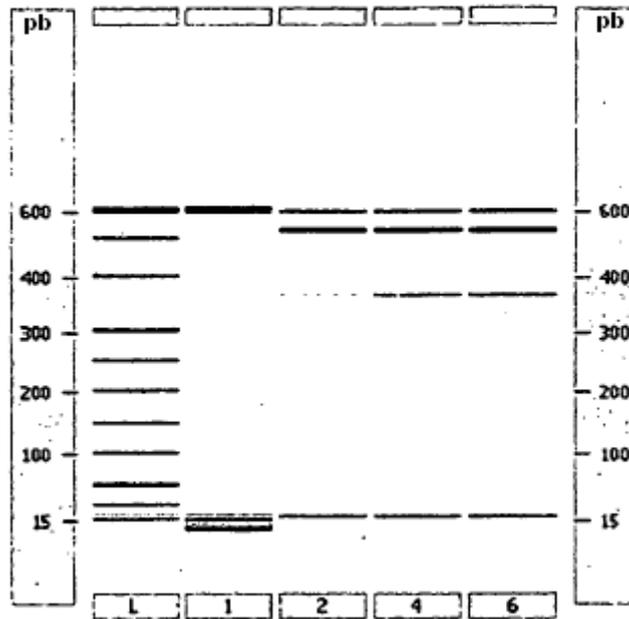
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, una afección que está asociada con o causa enfermedad de ojo seco acuoso o evaporativo, o síntomas asociados con ésta en un individuo, siendo la composición adecuada para aplicación tópica en una superficie ocular, y que comprende una concentración terapéuticamente eficaz de PRG4 suspendida en una disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, que comprende uno o más agentes oftálmicamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un demulcente oftálmicamente aceptable, un excipiente oftálmicamente aceptable, un astringente oftálmicamente aceptable, un vasoconstrictor oftálmicamente aceptable, un electrolito oftálmicamente aceptable, un hialuronato de sodio o ácido hialurónico oftálmicamente aceptable, un fosfolípido activo de superficie oftálmicamente aceptable, y un emoliente oftálmicamente aceptable.
- 15 3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que la composición farmacéutica comprende el PRG4 en la concentración terapéuticamente eficaz de 10-10.000 µg/mL.
- 15 4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que la composición farmacéutica comprende el PRG4 en la concentración terapéuticamente eficaz de 50-500 µg/mL.
- 20 5. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de hialuronato de sodio o ácido hialurónico.
- 20 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende hialuronato de sodio o ácido hialurónico en la concentración terapéuticamente eficaz de 10-100.000 µg/mL.
- 25 7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende hialuronato de sodio o ácido hialurónico en la concentración terapéuticamente eficaz de 500-5.000 µg/mL.
- 25 8. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una concentración terapéuticamente eficaz de fosfolípido activo de superficie seleccionado del grupo que consiste en L- $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina.
- 30 9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en la que la composición farmacéutica comprende el fosfolípido activo de superficie en la concentración terapéuticamente eficaz de 10-10.000 µg/mL.
- 30 10. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la disolución salina equilibrada oftálmicamente aceptable comprende al menos tres electrolitos diferentes seleccionados del grupo que consiste en fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, citrato de sodio, ácido clorhídrico, e hidróxido de sodio.
- 35 11. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el PRG4 es una proteína PRG4 purificada natural o recombinante que comprende un fragmento lubricante, multímero o un homólogo de ésta, tiene una masa molar promedio entre 50 kDa y 400 kDa.
- 35 12. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la composición farmacéutica comprende la PRG4 en la concentración terapéuticamente eficaz de 100-300 µg/mL.

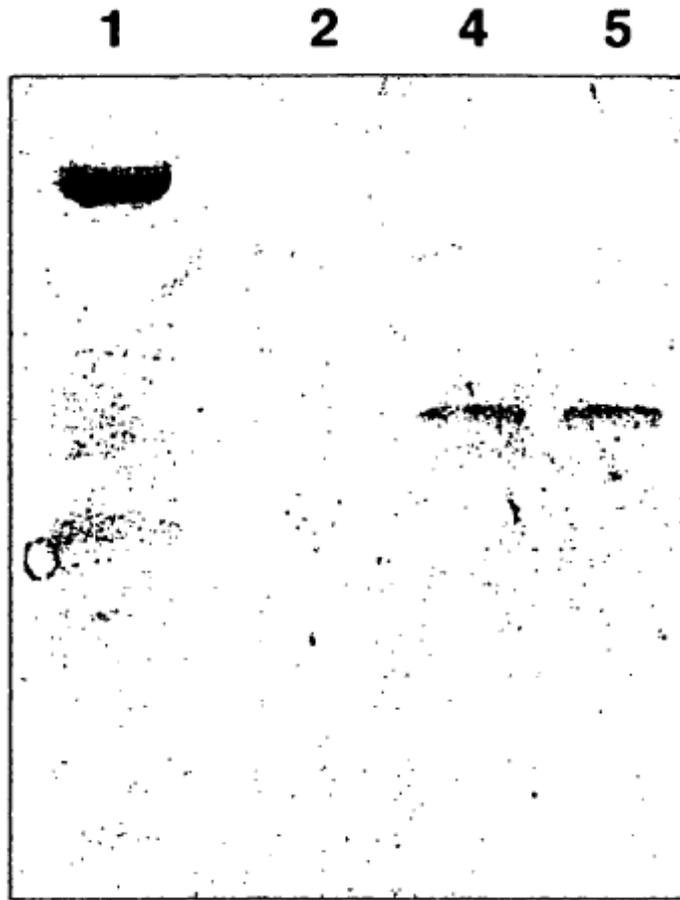
Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

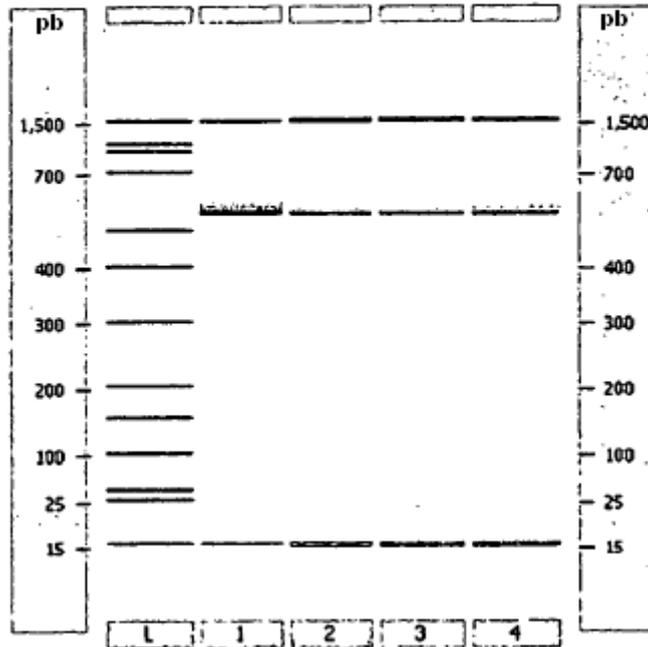


Figura 5

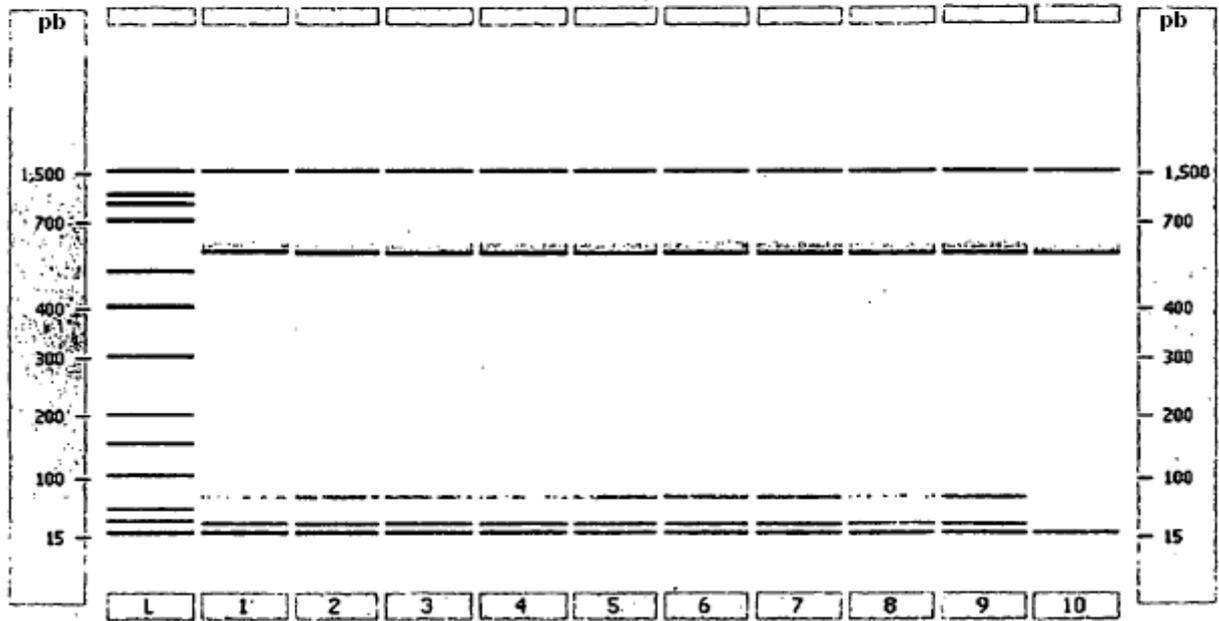


Figura 6

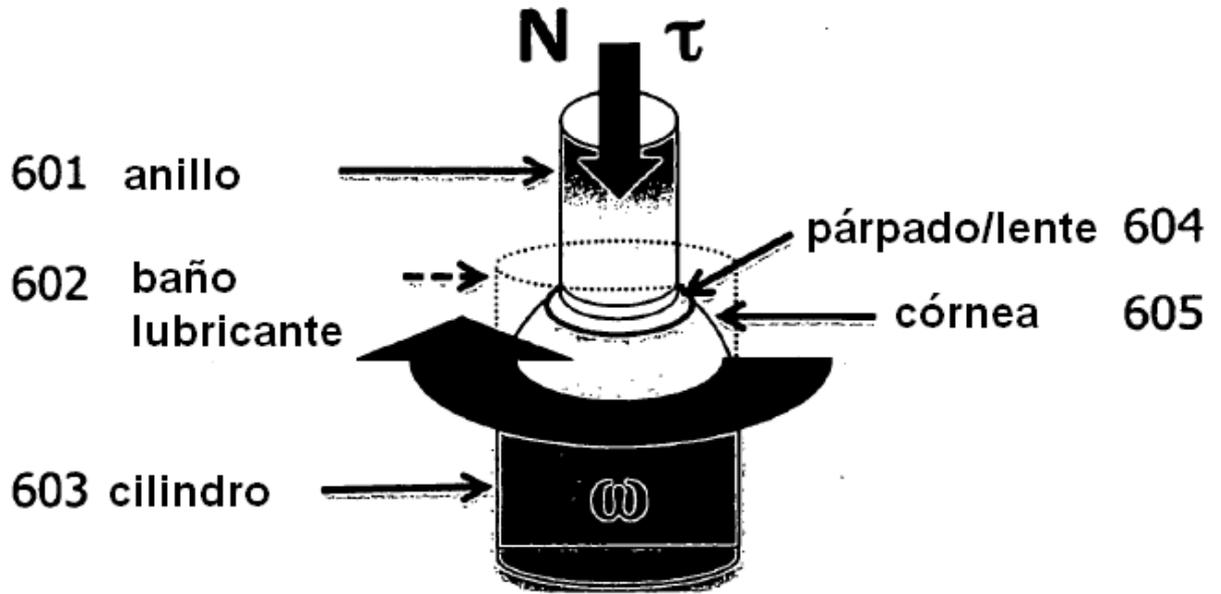


Figura 7

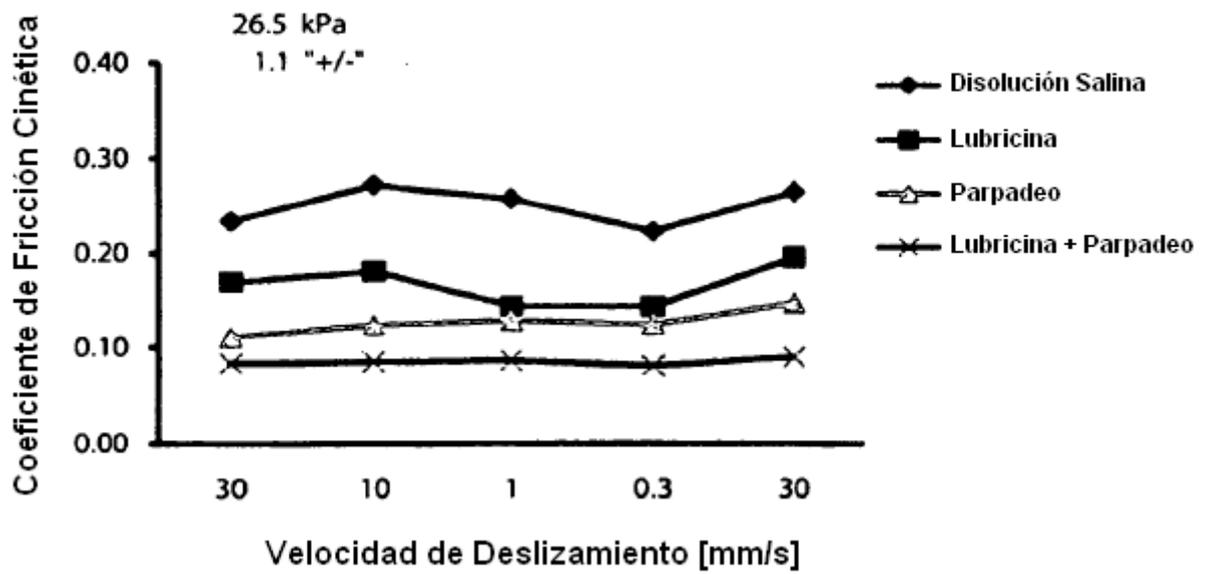
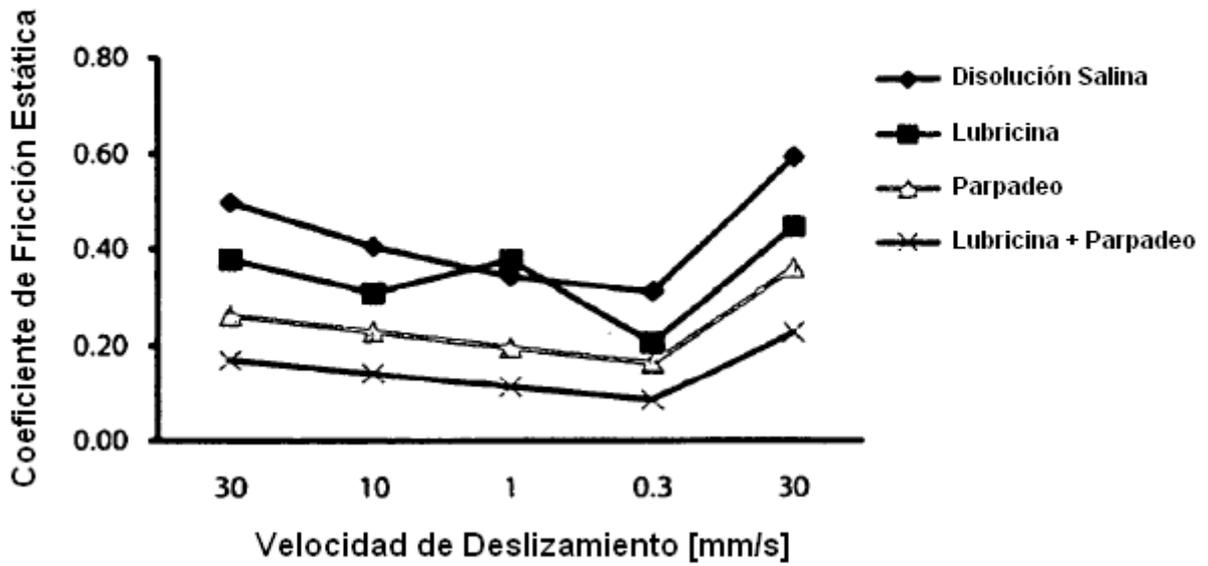


Figura 8

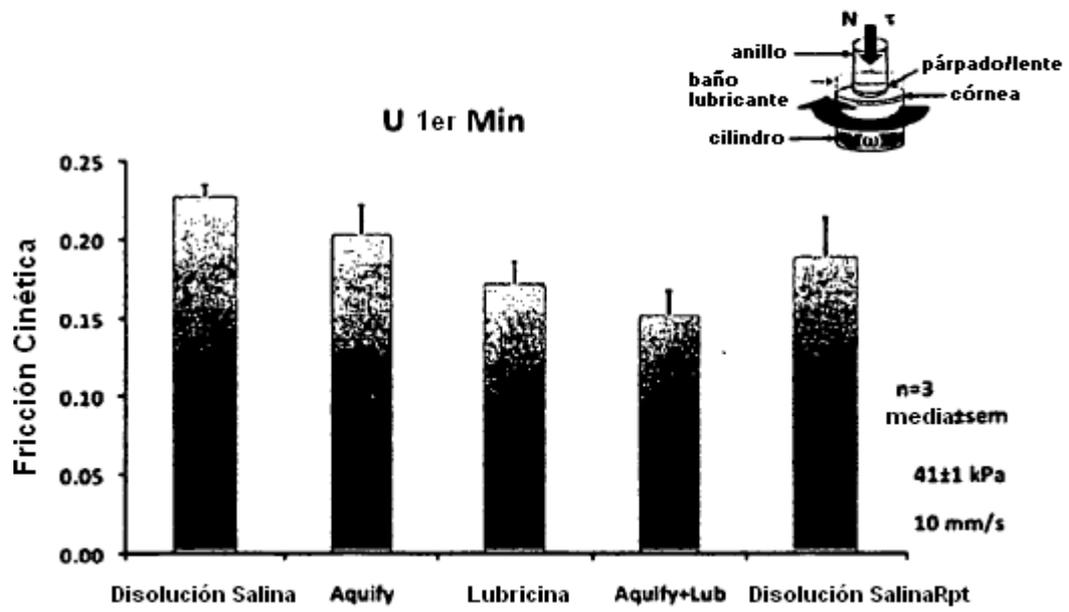
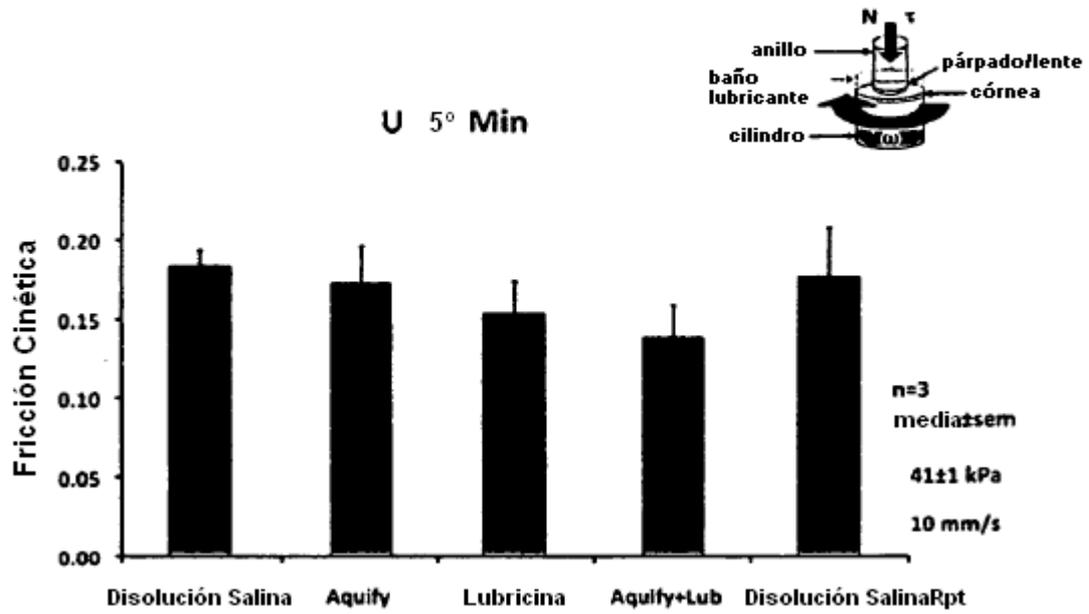


Figura 9



**Figura 10**

