

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 511**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2016 PCT/KR2016/001646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16137162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2016 E 16755812 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3263122**

54 Título: **Péptido para prevenir la pérdida de audición, y composición que lo comprende**

30 Prioridad:

27.02.2015 KR 20150028410

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

18.12.2020

73 Titular/es:

**GEMVAX & KAEL CO., LTD. (100.0%)
58, Techno 11-ro, Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR**

72 Inventor/es:

KIM, SANG JAE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 799 511 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido para prevenir la pérdida de audición, y composición que lo comprende

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un péptido para su uso en el tratamiento y prevención del daño auditivo y una composición farmacéutica que incluye el péptido para el mismo uso, y más particularmente, a un péptido derivado de la telomerasa para su uso en el tratamiento y prevención del daño auditivo debido a un fármaco ototóxico y a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y prevención del daño auditivo que incluye el péptido.

[Técnica anterior]

10 La anatomía de un oído se divide en el oído externo, el oído medio y el oído interno, y el oído interno consiste en la cóclea responsable de la audición, el vestíbulo y los canales semicirculares, que son responsables del sentido del equilibrio, y el nervio vestibulococlear conectado a los mismos.

15 El daño auditivo es resultado del daño en uno del oído externo, el oído medio y el oído interno o múltiples partes de los mismos. Hay cuatro tipos de daño auditivo. El primer tipo más común es la pérdida de audición neurosensorial que ocurre como resultado de la pérdida o daño de las células auditivas (células ciliadas) en la cóclea que constituye el oído interno. El segundo tipo es la pérdida de audición conductiva que ocurre cuando hay un problema con el oído externo o el oído medio, que da como resultado que el sonido no se conduce adecuadamente al oído interno. El tercer tipo es la pérdida de audición mixta que se produce cuando las pérdidas auditivas neurosensoriales y conductivas están presentes. El cuarto tipo es la neuropatía auditiva que ocurre cuando hay un problema con el nervio auditivo que transmite una señal de sonido al cerebro.

20 El término ototoxicidad se refiere a un síntoma del oído interno debido a un agente terapéutico o compuesto químico, es decir, la disfunción del órgano periférico y del tejido nervioso responsable de la función auditiva y vestibular y un cambio degenerativo en las células del tejido.

25 Los antibióticos aminoglucósidos y los fármacos contra el cáncer a base de platino presentan nefrotoxicidad y ototoxicidad fetal por administración continuada, y, en la mayoría de los casos, la nefrotoxicidad es a menudo reversible, pero la ototoxicidad es permanente. Debido a estas toxicidades, los fármacos altamente eficaces no pueden prescribirse principalmente a menos que los efectos de la administración de fármacos sean lo suficientemente significativos como para resistir a los efectos secundarios de los antibióticos aminoglucósidos y los fármacos contra el cáncer a base de platino. El mecanismo de la apoptosis por fármacos ototóxicos se ha descubierto de manera gradual e intenta prevenir la pérdida de audición protegiendo las células ciliadas mediante un procedimiento tal como la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la supresión de las enzimas inductoras de apoptosis, la antiinflamación, el tratamiento con una sustancia neurotrópica, y similares, y se han realizado investigaciones al respecto. Sin embargo, debido a dificultades en la toxicidad de un fármaco en sí mismo y un procedimiento para administrar el medicamento al oído interno, su aplicación clínica es insignificante. La ototoxicidad debida a un antibiótico aminoglucósido progresa mientras el fármaco se absorbe en el oído interno y se acumula en las células ciliadas del oído interno.

40 La furosemida es un tipo de diurético que promueve la acción diurética y se usa en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, edema renal, edema hepático, hipertensión, y similares. Se ha documentado que la furosemida presenta una fuerte acción diurética y se usa incluso para la preeclampsia, ascitis y edema vascular periférico, pero cuando se administra en una gran cantidad o durante un largo período de tiempo, el fármaco provoca desequilibrio electrolítico e hipotensión aguda. Además, se ha documentado que la furosemida causa trastornos auditivos, acúfenos o pérdida de audición.

45 Además, se conocen varios factores de riesgo capaces de causar ototoxicidad. En general, se sabe que, a medida que aumenta la dosis de un fármaco ototóxico y el período de uso del medicamento aumentan, la posibilidad de ototoxicidad se vuelve alta, pero el grado de ototoxicidad se ve afectado por las edades de los pacientes (en particular, 65 años o más), un fármaco ototóxico administrado en combinación, uso previo de fármacos ototóxicos, exposición previa al ruido, trastornos de audición y equilibrio existentes, disfunción renal, función hepática, pirexia, hipovolemia, bacteriemia y similares.

[Divulgación]**[Problema técnico]**

50 Por lo tanto, en el presente estudio, la eficacia y seguridad de un péptido derivado de la telomerasa se evaluaron en un modelo animal inductor de ototoxicidad. A través de experimentos, se verificó un efecto del péptido derivado de la telomerasa para prevenir la pérdida de audición y el daño al oído interno debido a la ototoxicidad, y esto indica que el daño al oído interno es causado por estreses tales como un medicamento ototóxico, ruido e hipoxia y un mecanismo final de daño a las células ciliadas es la apoptosis por ROS y, por lo tanto, el péptido derivado de la telomerasa puede proteger el oído interno de daños y también tiene un efecto de recuperación de los oídos internos dañados. Por

consiguiente, dado que la presente invención puede aplicarse a la recuperación y el tratamiento de los oídos internos dañados, se espera que sea de gran ayuda para el tratamiento de la pérdida de audición sin efectos secundarios.

[Solución técnica]

5 Para lograr el objetivo de la presente invención, un aspecto de la presente invención puede proporcionar una composición para su uso en el tratamiento y la prevención de la pérdida de audición, incluyendo la composición un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento del mismo, en el que el péptido homólogo y el fragmento tienen un efecto de tratamiento de la pérdida de audición.

10 En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el fragmento puede ser un fragmento que consta de tres o más aminoácidos. En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, la pérdida de audición puede ser causada por la administración de un fármaco ototóxico o por un tratamiento con fármaco ototóxico.

15 En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el fármaco ototóxico puede incluir uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en salicilatos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, diuréticos, agentes quimioterapéuticos, quininas, fármacos protectores de la mucosa y fármacos contra el cáncer.

En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, los antibióticos pueden ser antibióticos a base de aminoglucósidos, y los fármacos contra el cáncer pueden ser fármacos contra el cáncer a base de platino.

20 En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, los antibióticos a base de aminoglucósidos pueden incluir kanamicina, y los fármacos contra el cáncer basados en platino pueden incluir cisplatino o carboplatino.

En la composición para su uso de acuerdo con un aspecto de la presente invención, los diuréticos pueden incluir furosemida.

25 En la composición para su uso de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la pérdida de audición puede incluir pérdida de audición y acúfenos de acuerdo con cambios degenerativos en un órgano periférico y tejido nervioso del oído interno.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, la composición puede ser una composición farmacéutica.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, la composición puede ser una composición alimenticia.

30 **[Efectos ventajosos]**

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una composición para su uso en la protección eficaz contra la pérdida de audición. Por lo tanto, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención se puede aplicar al tratamiento y la prevención de la pérdida de audición, y, en particular, se puede usar para tratar la pérdida de audición debido a un fármaco ototóxico.

35 Además, un péptido para su uso de acuerdo con la presente invención, que es un péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1 (PEP1), un péptido que tiene una secuencia con un 80 % de homología con la secuencia descrita anteriormente, o un fragmento de la misma, tiene un efecto del tratamiento y prevención de la pérdida de audición.

[Descripción de los dibujos]

40 La FIG. 1 ilustra imágenes de células ciliadas en un giro apical, un giro medio y un giro basal del tejido coclear de un modelo animal ototóxico administrado con kanamicina.

La FIG. 2 ilustra la imagen de las células ciliadas en un giro apical, un giro medio y un giro basal del tejido coclear de modelos animales a los que se les administró kanamicina y PEP1 en combinación.

45 La FIG. 3 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación entre el número contado de células ciliadas de un grupo administrado con kanamicina y el número contado de células ciliadas de un grupo administrado con kanamicina y PEP1 en combinación, en un giro apical, un giro medio y un giro basal, en los que el número contado se expresa como porcentaje.

La FIG. 4 ilustra imágenes de tinción con hematoxilina y eosina (HyE) de secciones congeladas de tejido coclear y de la ampolla de un modelo animal ototóxico administrado con kanamicina.

50 La FIG. 5 ilustra imágenes de tinción con HyE de secciones congeladas de tejido coclear y de la ampolla de un grupo animal administrado con kanamicina y PEP1 en combinación.

La FIG. 6 ilustra gráficos que muestran un grado de pérdida de audición de cada uno de un grupo administrado con kanamicina y un grupo administrado con kanamicina y PEP1 basado en la concentración a través de una prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR) según las bandas de frecuencia.

La FIG. 7 ilustra imágenes de células ciliadas de muestras de tejido coclear de un control sin PEP1 y grupos

tratados con PEP1 según la concentración dos veces al día durante 2 semanas.

La FIG. 8 ilustra las imágenes de tinción con HyE de secciones congeladas de tejido coclear y de la ampolla de un control sin PEP1.

5 La FIG. 9 ilustra imágenes de tinción con HyE de secciones congeladas de tejido coclear y de la ampolla de cada grupo experimental que administró PEP1 según la concentración.

La FIG. 10 es un gráfico de protocolo que muestra la administración de fármacos y los calendarios de la prueba ABR de un experimento realizado en los calendarios D1 y D3 utilizando un modelo animal ototóxico administrado con kanamicina, que es un medicamento ototóxico, y furosemida.

10 La FIG. 11 ilustra gráficos que muestran los valores de medición de los cambios auditivos dependientes de la frecuencia a través de una prueba de ABR de modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 1 administrado con PEP1,

el Grupo Experimental 2 administrado con dexametasona y el Control 1 administrado con solución salina, de acuerdo con el calendario del Experimento D1, es decir, antes de la administración de un fármaco ototóxico, el día 7 después de la administración del fármaco y el día 14 después de la administración del fármaco.

15 La FIG. 12 ilustra gráficos que muestran los valores de medición de los cambios auditivos dependientes de la frecuencia a través de una prueba de ABR de modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 3 administrado con PEP1, el Grupo Experimental 4 administrado con dexametasona y el Control 2 administrado con solución salina, de acuerdo con el calendario del Experimento D3, es decir, antes de la administración de un fármaco ototóxico, el día 7 después de la administración del fármaco y el día 14 después de la administración del fármaco.

20 La FIG. 13 ilustra gráficos que muestran comparativamente los valores de medición de la prueba de ABR de los cambios auditivos dependientes de la frecuencia de los Grupos Experimentales 1 y 3 administrados con PEP1 como modelos animales ototóxicos de acuerdo con los calendarios de los Experimentos D1 y D3, respectivamente, es decir, antes de la administración de un fármaco ototóxico, el día 7 después de la administración del fármaco y el día 14 después de la administración del fármaco.

25 La FIG. 14 ilustra imágenes de microscopio de barrido confocal adquiridas al observar la viabilidad de las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea después de realizar una biopsia en modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 1 administrado con PEP1, el Grupo Experimental 2 administrado con dexametasona y el Control 1 administrado con solución salina, respectivamente, de acuerdo con el calendario del Experimento D1.

30 La FIG. 15 ilustra imágenes de microscopio de barrido confocal adquiridas al observar la viabilidad de las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea después de realizar una biopsia en modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 3 administrado con PEP1, el Grupo Experimental 4 administrado con dexametasona y el Control 2 administrado con solución salina, respectivamente, de acuerdo con el calendario del Experimento D3.

35 La FIG. 16 es un gráfico que muestra resultados de análisis cuantitativos de una proporción de células ciliadas normales de la zona basal, media y del ápice de la cóclea después de realizar una biopsia en modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 1 administrado con PEP1, el Grupo Experimental 2 administrado con dexametasona y el Control 1 administrado con solución salina, respectivamente, de acuerdo con el calendario del Experimento D1.

40 La FIG. 17 es un gráfico que muestra resultados de análisis cuantitativos de una proporción de células ciliadas normales de la zona basal, media y del ápice de la cóclea después de realizar una biopsia en modelos animales ototóxicos, incluido el Grupo Experimental 3 administrado con PEP1, el Grupo Experimental 4 administrado con dexametasona y el Control 2 administrado con solución salina, respectivamente, de acuerdo con el calendario del Experimento D3.

45 La FIG. 18 es un gráfico que muestra resultados de análisis cuantitativos y comparativos de una proporción de células ciliadas normales de la zona basal, media y del ápice de la cóclea después de realizar una biopsia en los Grupos Experimentales 1 y 3 administrados con PEP1 como modelos animales ototóxicos de acuerdo con los programas de los experimentos D1 y D3, respectivamente.

50 [MEJOR MODO]

Aunque la presente invención permite diversos cambios y numerosas realizaciones, las realizaciones particulares de la presente invención se describirán ahora con más detalle. Sin embargo, no se pretende limitar la presente invención a modos particulares de la práctica. En la descripción de la presente invención, ciertas explicaciones detalladas de la técnica relacionada se omiten cuando se considera que pueden oscurecer innecesariamente la esencia de la invención.

55 Un telómero es un material genético que está presente repetidamente en un extremo de un cromosoma y se sabe que evita el daño al cromosoma correspondiente o su unión a otros cromosomas. Cuando una célula se divide, la longitud del telómero disminuye de manera gradual, y, cuando la división celular se da en un cierto número de veces o más, el telómero se vuelve muy corto y la célula deja de dividirse y muere. Por el contrario, se sabe que, cuando los telómeros se alargan, la esperanza de vida de las células se prolonga. Por ejemplo, se sabe que, en células cancerosas, la telomerasa se secreta para evitar que los telómeros se acorten y, por lo tanto, las células cancerosas no mueren y pueden propagarse continuamente. Los inventores de la presente invención verificaron que un péptido derivado de la telomerasa es eficaz para suprimir la angiogénesis, completando así la presente invención.

5 Un péptido desvelado en la presente memoria descriptiva puede incluir péptidos que tienen un 80 % o más de homología de secuencia, un 85 % o más de homología de secuencia, un 90 % o más de homología de secuencia, un 95 % o más de homología de secuencia, un 96 % o más de homología de secuencia, un 97 % o más de homología de secuencia, un 98 % o más de homología de secuencia y un 99 % o más de homología de secuencia. Además, el péptido desvelado en la presente memoria descriptiva puede incluir un péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1 o fragmentos del mismo, y los péptidos en los que uno o más aminoácidos, dos o más aminoácidos, tres o más aminoácidos, cuatro o más aminoácidos, cinco o más aminoácidos, seis o más aminoácidos, o siete o más aminoácidos están modificados.

10 En una realización de la presente invención, una modificación de aminoácidos se refiere a un cambio en las propiedades físicas y químicas de los péptidos. Por ejemplo, se pueden realizar cambios de aminoácidos, para mejorar la estabilidad térmica de los péptidos, cambiar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

15 Además, el péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1, el fragmento del mismo, o el péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de péptido descrita anteriormente, para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención tiene baja toxicidad intracelular y alta estabilidad *in vivo*. En la presente invención, el péptido con la SEQ ID NO: 1 es un péptido derivado de telomerasa y un péptido que consta de 16 aminoácidos como sigue.

20 El péptido que se muestra en la SEQ ID NO: 1 es tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación. En la Tabla 1 a continuación, el "nombre" se usa para distinguir péptidos entre sí. En una realización de la presente invención, el péptido que se muestra en SEQ ID NO: 1 se refiere a un péptido completo de telomerasa humana. De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1, el fragmento del mismo, o el péptido que tiene una homología de secuencia del 80 % o más con la secuencia peptídica descrita anteriormente incluye un péptido sintético obtenido seleccionando y sintetizando péptidos en las posiciones correspondientes entre los péptidos incluidos en la telomerasa. La SEQ ID NO: 2 denota una secuencia de aminoácidos de la telomerasa completa.

25

<Tabla 1>

SEQ ID NO.	Nombre	Posición en la telomerasa	Secuencia	Longitud
1	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa

ES 2 799 511 T3

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Posición en la telomerasa	Secuencia	Longitud
2		[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRL GPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPW DARPPPAAPFRQVSCLKELVARVLQRLCER GAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSY LPNTVTDALRGSRAWGLLLRRVGDDVLVHL LARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAAT QARPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGV PLGLPAPGARRRGGASRSRSLPLPKRPRR GAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFC VVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQ HHAGPPSTSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLY SSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFL GSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLEL LGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVC AREKPQGSVAAPPEEDTDPRLVQLLRQHSS PWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRF LRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDC AWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHW LMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRK SVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSAEVRQH REARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVG ARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARR	1132 aa

(continuación)

SEQ ID NO.	Nombre	Posición en la telomerasa	Secuencia	Longitud
			PGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRAQDPP PELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKP QNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVS TLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQS SSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYV QCQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIR RDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVR GVPEYGCVVNLRKTVVNFVEDEALGGTAF VQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSY ARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRL KCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRF HACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLC YSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWL CHQAFLLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLS RKLPGT TLTALEAAANPALPSDFKTILD	

- La kanamicina utilizada en los experimentos de la presente invención es un antibiótico a base de aminoglucósidos. Solo el 3% de una dosis de un aminoglucósido se absorbe en el estómago y, por lo tanto, el aminoglucósido se administra mediante inyección, y el fármaco administrado se excreta principalmente a través de la orina mediante filtración glomerular. En el caso de insuficiencia renal, disminuye la cantidad de secreción de aminoglucósidos y el fármaco se acumula en exceso en la perilinfa del oído interno y, por lo tanto, la ototoxicidad, como la nefrotoxicidad, es probable que ocurra. En particular, la kanamicina es un fármaco con toxicidad para la cóclea que destruye las células ciliadas externas en un giro basal de la cóclea en una etapa temprana junto con la neomicina, amikacina, sisomicina y livodomicina, y, a medida que continúa la administración de la kanamicina, un sitio de destrucción de la misma se expande a un giro apical.
- 5
- 10 La furosemida utilizada en los experimentos de la presente invención es un diurético utilizado para tratar la hipertensión o el edema al eliminar la humedad y las sales acumuladas innecesariamente en el cuerpo. Se ha documentado que, en un caso en el que se usa una dosis alta de furosemida en un paciente con hipoproteinemia o similar, o cuando la furosemida se usa en combinación con otros fármacos ototóxicos, tienen lugar los acúfenos, el daño auditivo o la pérdida de audición.
- 15 La dexametasona utilizada en los experimentos de la presente invención es un fármaco corticosteroide sintético y se utiliza como agente antiinflamatorio o inmunosupresor. La dexametasona se usa para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades inflamatorias y como inmunosupresor para las mismas, y es eficaz con respecto a los acúfenos, la pérdida de audición, y anomalías vestibulares. Sin embargo, se ha documentado que, cuando se administra una cantidad excesiva de dexametasona, el fármaco inhibe en exceso la acción inmunitaria y causa efectos secundarios graves en pacientes con enfermedades de infección micótica en los ojos o los oídos.
- 20

La prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR, por sus siglas en inglés) utilizada en los experimentos de la presente invención para identificar la pérdida de audición es una prueba auditiva precisa en la que se promedian las ondas cerebrales desde el centro nervioso del cerebro, que se puede obtener por estimulación auditiva, y se determina un valor umbral de audición. A medida que aumenta el valor umbral, esto indica que la pérdida de audición

es más grave.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que incluye, como principio activo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una homología de secuencia del 80 % o más con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento de la misma para su uso en el tratamiento de la pérdida de audición.

En la composición para su uso en el tratamiento de la pérdida de audición, de acuerdo con una realización de la presente invención, el contenido del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el péptido tiene una homología de secuencia del 80 % o más con la secuencia de aminoácidos, o el fragmento de la misma puede variar de 0,01 g/l a 1 kg/l, en particular, de 0,1 g/l a 100 g/l, de manera más particular, de 1 g/l a 10 g/l. Sin embargo, cuando se muestra una diferencia en los efectos según la dosis, su contenido se puede ajustar de manera adecuada. Cuando el contenido del péptido mencionado anteriormente está dentro de los intervalos descritos anteriormente o menos, no solo es suficiente para presentar los efectos deseados de la presente invención, sino que también se puede satisfacer tanto la estabilidad como la seguridad de la composición, y puede ser apropiado en términos de efectos relativos a los costes.

La composición para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención se puede aplicar a todos los animales, incluidos los seres humanos, perros, pollos, cerdos, vacas, ovejas, cobayas o monos.

Como la composición para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención, una composición farmacéutica que incluye un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, se proporciona un péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento del mismo. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención se puede administrar por vía oral, intrarrectal, percutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intramedular, intradural, subcutánea o similar.

Una preparación para administración oral puede ser un comprimido, una píldora, una cápsula blanda o dura, un granulado, polvo, una preparación líquida o una emulsión, pero la presente invención no queda limitada a los mismos. Una formación para administración parenteral puede ser una inyección, un agente de goteo, una loción, un ungüento, un gel, una crema, una suspensión, una emulsión, un supositorio, un parche o un agente de pulverización, pero la presente invención no queda limitada a los mismos.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir un aditivo tal como un diluyente, un excipiente, un lubricante, un aglutinante, un disgregante, un tampón, un dispersante, un tensioactivo, un colorante, un aromatizante, un edulcorante o similar según la necesidad. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención se puede preparar usando un procedimiento comúnmente usado en la técnica.

El principio activo de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención puede variar dependiendo de las edades de los sujetos a los que se administrará el principio activo, el género, el peso corporal, las afecciones patológicas y la gravedad, la vía de administración o la determinación de los prescriptores. La determinación de una dosis adecuada basada en estos factores puede estar dentro del intervalo conocido por los expertos en la materia, y una dosis diaria de la composición farmacéutica puede variar, por ejemplo, de 10 ng/kg/día a 100 g/kg/día, en particular, de 0,1 µg/kg/día a 10 g/kg/día, de manera más particular, de 1 µg/kg/día a 1 g/kg/día, aún más en particular, de 2 µg/kg/día a 100 mg/kg/día. Cuando se muestra una diferencia en los efectos según la dosis, la dosis diaria se puede ajustar de manera adecuada. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención se puede administrar una a tres veces al día, pero la presente invención no queda limitada a los mismos.

Como la composición para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención, una composición alimenticia que incluye, como principio activo, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, se proporciona un péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento del mismo.

Una preparación de la composición alimenticia para su uso de acuerdo con una realización de la presente invención no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, un comprimido, un granulado, polvo, una preparación líquida, una preparación sólida, o similar. Cada preparación se puede preparar formulando ingredientes comúnmente usados en la técnica además del principio activo o seleccionando y mezclando los ingredientes de manera apropiada por un experto en la materia sin dificultad excesiva de acuerdo con el fin del uso. Además, cuando se usan de manera simultánea con otras materias primas, los ingredientes pueden tener un efecto sinérgico.

Los términos utilizados en la presente memoria descriptiva se proporcionan solo para describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la presente invención. Los términos que no mencionan si el sustantivo es singular o plural no tienen la intención de limitar el número, sino que indican que el sustantivo mencionado existe en forma singular o plural. Las expresiones "que incluye", "que tiene", y "que comprende" se interpretan como expresiones abiertas (es decir, que incluye, pero que no se limita a esto).

Hacer referencia a un intervalo de valores es una manera fácil de evitar mencionar individualmente cada valor separado dentro del intervalo, y, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor separado se incorpora en la presente memoria descriptiva como si se mencionara de manera individual en el presente documento. Los valores límite de todos los intervalos están dentro de los intervalos y se pueden combinar de manera independiente.

Todos los procedimientos mencionados en el presente documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que el contexto indique lo contrario o lo contradiga claramente. El uso de cualquier realización y todas las realizaciones o lenguajes ejemplares (por ejemplo, "tal como") está destinado a describir más completamente la presente invención y no pretende limitar el ámbito de la presente invención a menos que esté dentro de las reivindicaciones. Cualquier lenguaje en la memoria descriptiva no debe interpretarse de tal manera que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la presente invención. A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la invención pertenece entiende habitualmente.

Las realizaciones ejemplares de la presente invención incluyen el mejor modo conocido por los inventores para implementar la presente invención. Las variaciones de las realizaciones ejemplares pueden ser obvias para los expertos en la técnica después de leer la descripción anterior. Los inventores de la presente invención esperan que un experto en la técnica use apropiadamente tales variaciones, y esperan que la presente invención se lleve a cabo de una manera diferente a la descrita en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención incluye equivalentes a y todas las modificaciones de la materia objeto de la invención mencionada en las reivindicaciones adjuntas, según lo permitido por las leyes de patentes. Además, todas las combinaciones posibles de los elementos mencionados anteriormente se incluyen en la presente invención dentro de todas las variaciones posibles cuando se establece de manera contraria o a menos que el contexto lo contradiga claramente. Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a realizaciones ejemplares de la misma, los expertos en la materia entenderán bien que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del ámbito de la invención definida por las siguientes reivindicaciones.

En lo sucesivo en el presente documento, las configuraciones y los efectos de la presente invención se describirán con más detalle con referencia a los ejemplos y a los ejemplos experimentales. Sin embargo, estos ejemplos y ejemplos experimentales se proporcionan únicamente con fines ilustrativos para ayudar a comprender la presente invención y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Modo de la invención

Ejemplo 1: Síntesis de péptido

Se preparó un péptido de SEQ ID NO: 1 (en lo sucesivo, en el presente documento, denominado "PEP1") de acuerdo con un procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida generalmente conocido. En particular, los péptidos se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc (SPPS) usando ASP48S (Pepton, Inc., Daejeon, Corea) mediante el acoplamiento de aminoácidos uno por uno desde el extremo C-terminal. El primer aminoácido utilizado en el extremo C-terminal de cada uno de los péptidos, que estaba unido a una resina, es tal como sigue:

resina de NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-tritilo
 resina de NH₂-Ala-2-cloro-tritilo
 resina de NH₂-Arg(Pbf)-2-cloro-tritilo

Todos los aminoácidos utilizados en la síntesis de péptidos estaban protegidos por Trt, Boc, t-butiléster (t-Bu), 2,2,4,6,7-pentametil dihidro-benzofuran-5-sulfonilo (Pbf), o similares, mientras que el extremo N-terminal estaba protegido por Fmoc, y todos los restos se eliminaron en ácido. Por ejemplo, los aminoácidos fueron los siguientes: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, ácido Trt-mercaptopoacético.

Se usó hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetametilaminio (HBTU)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBT)/4-metilmorfolina (NMM) como reactivo de acoplamiento. Se eliminó Fmoc usando piperidina al 20 % en DMF. Cada péptido sintetizado se separó de la resina y los grupos protectores de los restos se eliminaron usando una mezcla de escisión [ácido trifluoroacético (TFA)/trioisopropilsilano (TIS)/etanoditilo (EDT)/H₂O = 92,5/2,5/2,5/2,5].

Cada péptido se sintetizó repitiendo un procedimiento de reacción de un aminoácido correspondiente con un soporte sólido al que se unió un aminoácido inicial con un grupo protector unido al mismo, seguido de lavado con un disolvente y luego desprotección. El péptido sintetizado se separó de la resina y se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y luego se identificó por MS si el péptido se sintetizó o no, seguido de liofilización.

Como resultado de realizar la HPLC en el péptido usado en la presente realización, la pureza de todos los péptidos fue del 95 % o más.

Un procedimiento de preparación del péptido PEP1 se describirá ahora en detalle a continuación.

1) Acoplamiento

Se disolvieron 8 equivalentes del aminoácido protegido y HBTU (8 equivalentes)/HOBt (8 equivalentes)/NMM (16 equivalentes) como reactivo de acoplamiento en DMF y se añadieron a resina de NH₂-Lys (Boc)-2-cloro-tritilo, y luego se dejó que ocurriera una reacción a temperatura ambiente durante 2 horas, y el producto de reacción se lavó con DMF, MeOH y DMF en este orden.

2) Desprotección de Fmoc

Se añadió piperidina al 20 % en DMF al producto resultante, se dejó que ocurriera una reacción entre ellos a temperatura ambiente dos veces durante 5 minutos, seguido de lavado con DMF, MeOH y DMF en este orden.

3) Se repitieron las reacciones de 1 y 2 para preparar resina de NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-tritilo como una estructura principal del péptido.

4) Escisión: La resina del péptido completado por síntesis se trató con una mezcla de escisión para separar el péptido de la resina.

5) Se añadió éter dietílico de enfriamiento a la mezcla obtenida, y luego la mezcla resultante se centrifugó para precipitar el péptido obtenido.

6) Después de la purificación con Prep-HPLC, el peso molecular se identificó por LC/MS, y el resultante se congeló para prepararse como polvo.

Ejemplo 2: Confirmación del efecto de PEP1 sobre la pérdida de audición debido al fármaco ototóxico**Preparación de animales experimentales e inyecciones**

Para un experimento, se prepararon los ratones C57/BL6 (de 4 semanas a 6 semanas de vida, con un peso corporal de 15 g a 25 g, machos). Como un fármaco ototóxico, la kanamicina en forma de sulfato de kanamicina se disolvió en solución salina a una concentración de 40 mg/ml como preparación para la administración de inyección de 800 mg/kg, y el péptido sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 1, es decir, PEP1, se preparó como preparación para la administración por inyección disolviendo 100 mg de PEP1 en 10 ml de PBS.

Clasificación de grupos experimentales administrados con fármacos ototóxicos y fármacos ototóxicos y PEP1

La kanamicina, que es un fármaco ototóxico, y el péptido según la presente invención, es decir, PEP1, se administraron a los animales experimentales preparados después de dividir a los animales en grupos experimentales.

Grupo experimental 1: kanamicina a 800 mg/kg S.C (inyección subcutánea) + solución salina a 0,1 ml/10 g de ratones I.P. (inyección intraperitoneal)

Grupo experimental 2: kanamicina a 800 mg/kg S.C + PEP1 a 10 mg/kg I.P.

Se inyectó una dosis para cada grupo experimental dos veces al día durante 14 días.

Biopsia

Tres semanas después de que comenzara el experimento, se sacrificó a los ratones, y luego se tomaron muestras de sangre de ellos, los ratones se sometieron a fijación por perfusión con paraformaldehído al 4 % (pH 7,4) diluido con solución salina tamponada con fosfato 0,1 M, y se extrajo un órgano (el hueso temporal) de cada ratón.

Para observar una estructura general de la cóclea y el vestíbulo, los ratones se fijaron en paraformaldehído al 4 % (pH 7,4) a 4 °C durante 24 horas, y luego se mantuvieron en EDTA 0,135 M durante tres días para permitir que ocurriera la descalcificación. Los bloques de tejido se hicieron usando un compuesto de temperatura de corte óptico (compuesto de TCO) como agente de inclusión para congelar y luego se almacenaron a -80 °C y se hicieron en forma de secciones, seguido de tinción con HyE.

Para analizar cuantitativamente el hueso temporal en el lado izquierdo, se preparó todo el montaje de la cóclea. El laberinto óseo coclear se separó cuidadosamente del laberinto membranoso coclear utilizando un microinstrumento y un microscopio y se separaron el giro apical y el giro basal. Cada una de las paredes laterales con la estría vascular y una región de la membrana basilar de la cóclea se separó y luego se fijó con paraformaldehído al 4 %. Los resultantes se hicieron reaccionar con Triton-X al 0,3 % durante 1 hora, y luego se prepararon Alexa 488 faloidina y albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %. Las faloidinas Alexa 488 disueltas en metanol y BSA al 1 % se mezclaron en una proporción de 1:100. La mezcla resultante se dispensó en las muestras de tejido y se permitió que ocurriera una reacción en un agitador durante 1 hora, seguido de lavado y fijación con paraformaldehído al 4 %. Se dejó caer una gota de un vector sobre un portaobjetos de vidrio y se montó sobre él el tejido separado, y luego se fijó con un cubreobjetos. Todas las muestras de tejido coclear y las muestras de tejido renal de controles y grupos experimentales se observaron usando un microscopio confocal en las mismas condiciones de intensidad.

Realización de la prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR)

Se realizó una prueba ABR antes de la inyección, 1 semana después de la inyección, 2 semanas después de la inyección y 3 semanas después de la inyección. La audición se evaluó utilizando estímulos negativos de 4 kHz, 8 kHz, 16 kHz y 32 kHz y, en ABR, la intensidad de estímulo más pequeña que muestra la forma de onda n.º 5 se determinó como un umbral. Antes de la administración de fármacos, se midió la audición de partida en todos los grupos, y la medición se realizó después de anestesiarse cada grupo mediante inyección intraperitoneal de isoflorano.

Procesamiento estadístico

Se sumaron los valores de umbral de acuerdo con cada frecuencia obtenida como resultado de la prueba ABR, y se confirmó la significación estadística del umbral de audición de cada uno de los Grupos Experimentales 1 y 2 mediante una prueba de Mann-Whitney.

- 5 El número de células ciliadas no dañadas de acuerdo con los sitios cocleares del giro basal, el giro medio y el giro apical se sumó, y se confirmó la significación estadística del número de células ciliadas de cada uno de los Grupos Experimentales 1 y 2 utilizando una prueba de Mann-Whitney.

Análisis de resultados de biopsias

- 10 Como resultado de la observación de las células ciliadas en el giro basal, el giro medio y el giro apical de la cóclea mediante biopsia, se observó daño general a las células ciliadas en todos los sitios en el Grupo Experimental 1 (véase la FIG. 1). Por el contrario, no se observó daño a las células ciliadas en todos los sitios en el Grupo Experimental 2 (véase la FIG. 2).

- 15 Además, como resultado de contar el número de células ciliadas en la biopsia, se confirmó un mayor número estadísticamente significativo (* denota $p < 0,001$) de células ciliadas en el giro medio y el giro basal de la cóclea en el Grupo Experimental 2 que en el Grupo Experimental 1 (véase la FIG. 3).

- 20 Además, como resultado de los resultados de tinción con HyE de secciones congeladas de tejido coclear y de la ampolla obtenidas en biopsia, en el Grupo Experimental 1, se observó pérdida de células ciliadas cocleares, el epitelio sensorial de la ampolla normal desapareció y se produjo una vacuolización considerable (véase la FIG. 4). Por el contrario, se observó en el Grupo Experimental 2 que las células ciliadas cocleares normales y el epitelio sensorial de la ampolla normal se conservaron (véase la FIG. 5).

Análisis de resultados de la prueba ABR

- 25 Como resultado de la observación de cambios en la audición a lo largo del tiempo después de la administración del medicamento a través de una prueba de ABR, el valor umbral aumentó con el tiempo en el Grupo Experimental 1, mientras que un cambio en el valor umbral fue insignificante con el tiempo en el Grupo Experimental 2 (véase la FIG. 6). Una diferencia en los resultados de los dos grupos fue estadísticamente significativa (* denota $p < 0,001$).

Ejemplo 3: Confirmación de la presencia o ausencia de pérdida de audición ototóxica según la administración de PEP1**Preparación de animales experimentales e inyección para cada grupo experimental**

- 30 Para un experimento, se prepararon los ratones C57/BL6 (de 4 semanas a 6 semanas de vida, con un peso corporal de 15 g a 25 g, machos). Para administrar PEP1 según la concentración, se preparó PEP1 sintetizada usando el procedimiento según el Ejemplo 1 y una solución salina como control. Se preparó PEP1 estableciendo una concentración basal de 10 mg/ml como 1 unidad de solución. El control y los grupos a los que se administró PEP1 según la concentración se prepararon como sigue:

- 35 Grupo experimental 3: Control, solución salina administrada (10 ml de solución salina fisiológica)
 Grupo experimental 4: administrado con 0,1 mg/kg de PEP1 (1 unidad de solución de 1 ml + 9 ml de PBS)
 Grupo experimental 5: administrado con 1 mg/kg de PEP1 (10 unidades de solución de 1 ml + 9 ml de PBS)
 Grupo experimental 6: administrado con 10 mg/kg de PEP1 (100 unidades de solución de 1 ml + 9 ml de PBS)
 Grupo experimental 7: administrado con 100 mg/kg de PEP1 (100 mg de PEP1 + 10 ml de PBS)
 40 Se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 0,1 ml/10 g (peso del ratón) por vez a la concentración de cada grupo experimental. La inyección se realizó dos veces (9 de la mañana y 5 de la tarde) diariamente durante 7 días.

Biopsia

Dos semanas después del inicio de un experimento, se sacrificaron los grupos de animales y se recogieron muestras para biopsia utilizando el procedimiento que se muestra en el Ejemplo 2.

Análisis de resultados de biopsias

- 45 Como resultado de la observación de las células ciliadas en el giro basal, el giro medio y el giro apical de la cóclea mediante biopsia, no se observó daño a las células ciliadas de la cóclea en todos los grupos experimentales (véase la FIG. 7).

- 50 Además, como resultado de la observación de tejido coclear y de la ampolla teñido con HyE obtenido como secciones congeladas en biopsia, en el Grupo Experimental 3 como control, tanto las células ciliadas cocleares como las células ciliadas de la ampolla mostraron hallazgos normales (véase la FIG. 8). Como resultado de la observación de secciones de tejido coclear de los Grupos Experimentales 4 a 7 administrados con PEP1 según la concentración, no se observó daño a la estructura de la cóclea (véase la FIG. 9).

Ejemplo 4: Confirmación del efecto de PEP1 en la pérdida de audición debido a dos tipos de fármacos ototóxicos y comparación de los mismos con los fármacos existentes**Preparación del modelo animal experimental**

5 Para un experimento, se preparó un modelo animal ototóxico administrando por vía intraperitoneal 1000 mg/kg de kanamicina a ratones C57/BL6 (5 semanas de vida, peso corporal de 15 g a 25 g, hembras) e inyectando 100 mg/kg de furosemida dentro de los 30 minutos.

Clasificación y preparación de grupos experimentales administrados con materiales diana experimentales y experimentos repetidos

10 Se clasificaron 24 modelos animales ototóxicos en grupos experimentales y un control de la siguiente manera y se realizó un experimento. El nombre experimental se indicó como D1 (véase la FIG. 10).

Grupo experimental 1: 8 modelos animales ototóxicos administrados con 10 mg/kg de PEP1 mediante inyección subcutánea el día 1, día 2 y día 3, respectivamente, después de la administración de kanamicina y furosemida

Grupo experimental 2: 8 modelos animales ototóxicos administrados con 15 mg/kg de dexametasona por vía subcutánea el día 1, día 2 y día 3, respectivamente después de la administración de kanamicina y furosemida

15 Control 1: 8 modelos animales ototóxicos administrados con solución salina el día 1, día 2 y día 3, respectivamente después de la administración de kanamicina y furosemida

Además, para evaluar los resultados experimentales (es decir, una diferencia en los efectos según el tiempo de administración de una sustancia experimental) después de administrar un fármaco ototóxico a modelos animales ototóxicos y tomar más tiempo para que la ototoxicidad progrese, se clasificaron 24 modelos animales ototóxicos en grupos experimentales y un control y se realizó un experimento. El nombre experimental se indicó como D3 (véase la FIG. 10).

Grupo experimental 3: 8 modelos animales ototóxicos administrados con 10 mg/kg de PEP1 mediante inyección subcutánea el día 3, día 4 y día 5, respectivamente después de la administración de kanamicina y furosemida

25 Grupo experimental 4: 8 modelos animales ototóxicos administrados con 15 mg/kg de dexametasona por vía subcutánea el día 3, día 4 y día 5, respectivamente después de la administración de kanamicina y furosemida

Control 2: 8 modelos animales ototóxicos se administraron con solución salina el día 3, día 4 y día 5, respectivamente después de la administración de kanamicina y furosemida

Realización de la prueba de ABR

30 Se realizó una prueba ABR antes de la administración de kanamicina y furosemida (día 0), el día 7 después de la administración y el día 14 después de la administración (la prueba se realizó de la misma manera para los Experimentos D1 y D3). La audición se evaluó utilizando estímulos negativos de 8 kHz, 16 kHz y 32 kHz, y, en ABR, la intensidad de estímulo más pequeña que muestra la forma de onda n.º 5 se determinó como un umbral. Antes de la administración de fármacos, se midió la audición de partida en todos los grupos, y la medición se realizó después de anestesiarse cada grupo mediante inyección intraperitoneal de isoflorano.

35 Biopsia

El día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida, los ratones en los que se completó la prueba ABR se sacrificaron, y de allí se extrajeron cápsulas óticas y se observó un grado de daño a las células ciliadas usando un microscopio de barrido confocal.

Procesamiento estadístico

40 Los valores de umbral auditivo medidos en la prueba ABR y los valores de células ciliadas de cada grupo medidos en biopsia se procesaron estadísticamente y se confirmó su importancia. En este caso, se utilizó una prueba ANOVA.

Análisis de resultados de la prueba ABR

45 En el experimento D1, como resultado de la observación de los cambios auditivos basados en la frecuencia de acuerdo con los fármacos administrados, El Grupo Experimental 1 administrado con PEP1 mostró un valor umbral de audición menor medido el día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida que el del control 2 administrado con solución salina. En particular, se mostró una diferencia estadísticamente significativa a 32 kHz ($p = 0,008$, véase la FIG. 11).

50 En el experimento D3, como resultado de la observación de los cambios auditivos basados en la frecuencia de acuerdo con los fármacos administrados, El Grupo Experimental 3 administrado con PEP1 mostró un valor umbral de audición menor medido el día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida que el del Control 2 administrado

con solución salina y el Grupo Experimental 4 administrado con dexametasona. En particular, se mostraron diferencias estadísticamente significativas a 8 kHz y 16 kHz ($p = 0,014$, véase la FIG. 12).

5 Como resultado de la observación de los cambios auditivos basados en la frecuencia de acuerdo con el tiempo de administración de PEP1 al comparar el experimento D1 con el experimento D3, no hubo diferencias significativas en los valores umbral de audición medidos antes de la administración de kanamicina y furosemida, el día 7 después de la administración, y el día 14 después de la administración (véase la FIG. 13).

Análisis de resultados de biopsias

10 En el Experimento D1, como resultado de la observación de la viabilidad de las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea mediante biopsia realizada el día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida, se observó daño general a las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea en el Control 1 administrado con solución salina, y se observaron células ciliadas normales en el Grupo Experimental 1 administrado con PEP1 y el Grupo Experimental 2 administrado con dexametasona (véase la FIG. 14).

15 En el Experimento D3, como resultado de la observación de la viabilidad de las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea a través de una biopsia realizada el día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida, el daño general a las células ciliadas en la zona basal, media y del ápice de la cóclea se observó en el Control 2 administrado con solución salina, mientras que las células ciliadas normales se observaron en el Grupo Experimental 3 administrado con PEP1 y el Grupo Experimental 4 administrado con dexametasona (véase la FIG. 15).

20 En el Experimento D1, como resultado del análisis cuantitativo de la viabilidad de las células ciliadas, el porcentaje de células ciliadas normales del grupo experimental 1 administrado con PEP1 en la zona basal, media y del ápice de la cóclea fue mayor que el del control 1 administrado con solución salina, y dicha diferencia fue estadísticamente significativa en la zona media y basal de la cóclea ($p = 0,006$). Además, el porcentaje de células ciliadas normales del Grupo experimental 1 administrado con PEP1 fue mayor que el del Grupo experimental 2 administrado con dexametasona (véase la FIG. 16).

25 En el Experimento D3, como resultado del análisis cuantitativo de la viabilidad de las células ciliadas, el porcentaje de células ciliadas normales del Grupo Experimental 3 administrado con PEP1 en la zona basal, media y del ápice de la cóclea fue mayor que el del Control 2 administrado con solución salina, y esa diferencia fue estadísticamente significativa en la zona media y basal de la cóclea ($p=0,011$). Además, el porcentaje de células ciliadas normales del Grupo experimental 3 administrado con PEP1 fue mayor que el del Grupo experimental 4 administrado con dexametasona (véase la FIG. 17).

30 Como resultado del análisis del porcentaje de células ciliadas normales según el tiempo de administración de PEP1 comparando el Experimento D1 con el Experimento D3, el porcentaje de células ciliadas normales según la biopsia realizada el día 14 después de la administración de kanamicina y furosemida no mostró una diferencia significativa (véase la FIG. 18).

35 En resumen de los resultados de los ejemplos, del experimento del Ejemplo 2, se puede confirmar que PEP1 previene la pérdida de audición y el daño a los órganos y tejidos relacionados con la audición por un fármaco que causa la pérdida de audición y, del experimento del Ejemplo 3, se puede confirmar que PEP1 previene la pérdida de audición y no es ototóxico para los órganos auditivos de acuerdo con su administración, por lo tanto es seguro. Además, del experimento del Ejemplo 4, se puede confirmar que, cuando se administra PEP1, el péptido funciona para proteger la audición de la pérdida de audición ototóxica causada cuando se administran dos o más tipos de materiales ototóxicos, y, en particular, un caso, en el que se administra PEP1, presenta un efecto más excelente de prevención o alivio de los síntomas de pérdida de audición que en un caso en el que se administra dexametasona conocida como agente existente para aliviar los síntomas de pérdida de audición.

45 En conclusión, se puede confirmar que una composición que incluye PEP1 previene o alivia la pérdida de audición, no tiene toxicidad cuando se administra y se puede usar como una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la pérdida de audición, que es más eficaz y más segura que los fármacos existentes, para tratar y prevenir la pérdida de audición.

<110> GEMVAX & KAEL CO., LTD. KIM, Sang Jae

<120> Un péptido para prevenir el daño auditivo y composición que lo comprende

<130> OF16P039PCT

50 <150> KR 10-2015-028410

<151> 27/02/2015

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.2

ES 2 799 511 T3

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45
 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60
 Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
 85 90 95
 Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
 100 105 110
 Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
 115 120 125
 Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
 130 135 140
 Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160

ES 2 799 511 T3

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
 165 170 175
 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
 180 185 190
 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415
 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
 435 440 445
 Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
 450 455 460
 Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
 465 470 475 480
 Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
 485 490 495

ES 2 799 511 T3

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
 500 505 510
 Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
 515 520 525
 Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
 530 535 540
 Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
 545 550 555 560
 Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575
 Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590
 Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 595 600 605
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
 725 730 735
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750
 Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
 755 760 765
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
 770 775 780
 Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
 785 790 795 800
 Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
 805 810 815
 Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
 820 825 830

ES 2 799 511 T3

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln
1010 1015 1020

Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala
1025 1030 1035 1040

Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
1045 1050 1055

Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp
1060 1065 1070

Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr
1075 1080 1085

Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser
1090 1095 1100

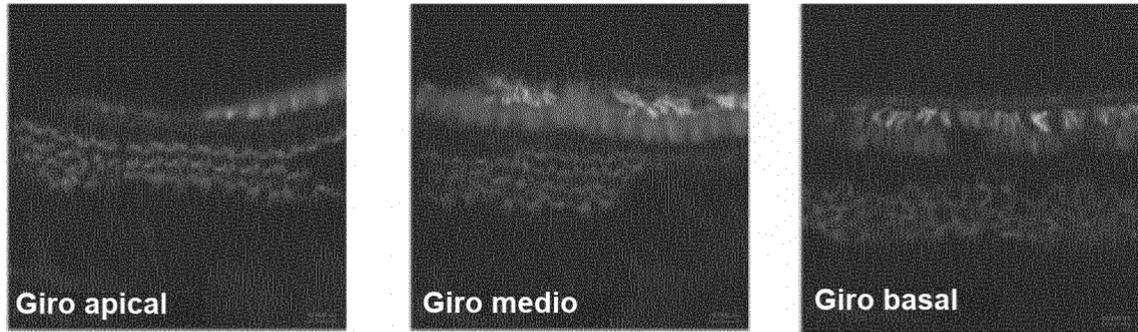
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn
1105 1110 1115 1120

Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
1125 1130

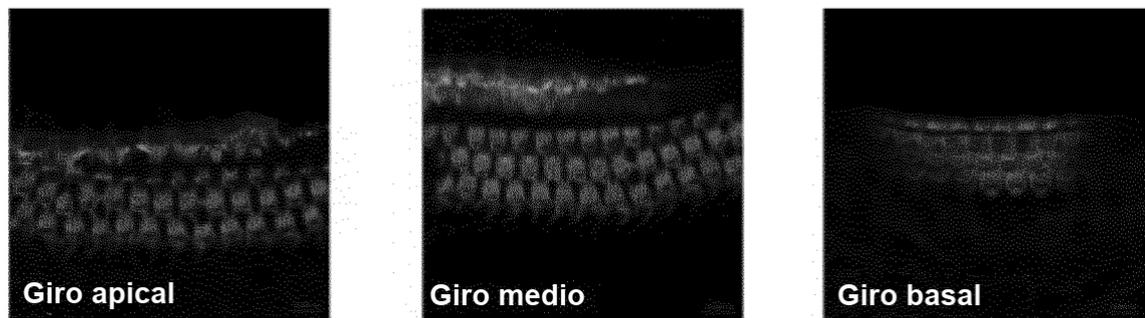
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento y prevención de la pérdida de audición, la composición comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento del mismo, en el que el péptido que tiene el 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos y el fragmento tiene un efecto de tratamiento de la pérdida de audición.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que el fragmento comprende un fragmento que consiste en tres o más aminoácidos.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la pérdida de audición es causada por la administración de un fármaco ototóxico o tratamiento con fármacos ototóxicos.
4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en el que el fármaco ototóxico comprende uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en salicilatos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, diuréticos, agentes quimioterapéuticos, quininas, fármacos protectores de la mucosa y fármacos contra el cáncer.
- 15 5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en el que los antibióticos son antibióticos a base de aminoglucósidos, y los fármacos contra el cáncer son fármacos contra el cáncer a base de platino.
6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en el que los antibióticos a base de aminoglucósidos comprenden kanamicina, y los fármacos contra el cáncer a base de platino comprenden cisplatino o carboplatino.
7. La composición para el uso de la reivindicación 4, en el que los diuréticos comprenden furosemida.
- 20 8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en el que la pérdida de audición comprende pérdida de audición y acúfenos de acuerdo con cambios degenerativos en un órgano periférico y tejido nervioso del oído interno.
9. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición es una composición farmacéutica que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición es una composición alimenticia.
- 25 11. Un péptido para su uso en el tratamiento y la prevención de la pérdida de audición, el péptido que comprende un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene un 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o un fragmento del mismo, en el que el péptido que tiene el 80 % o más de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos y el fragmento tiene un efecto de tratamiento de la pérdida de audición.
- 30

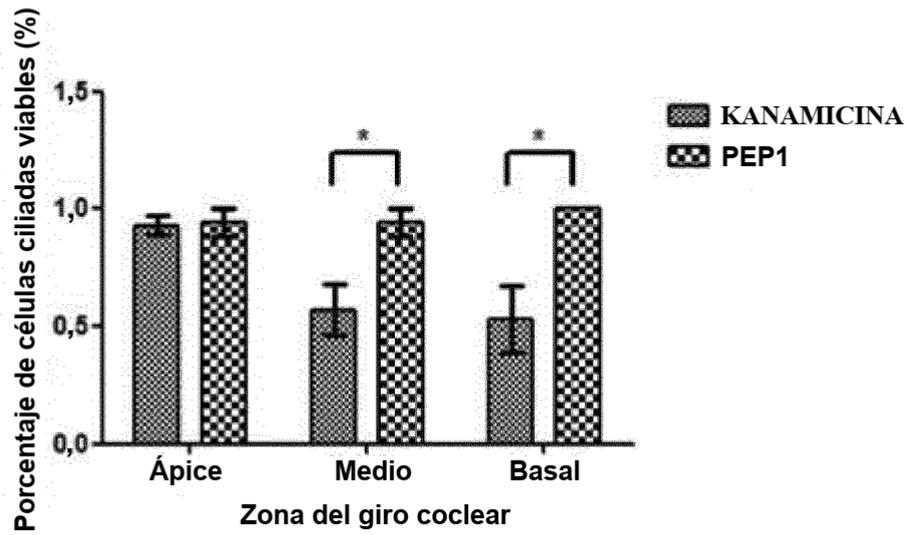
【Fig. 1】



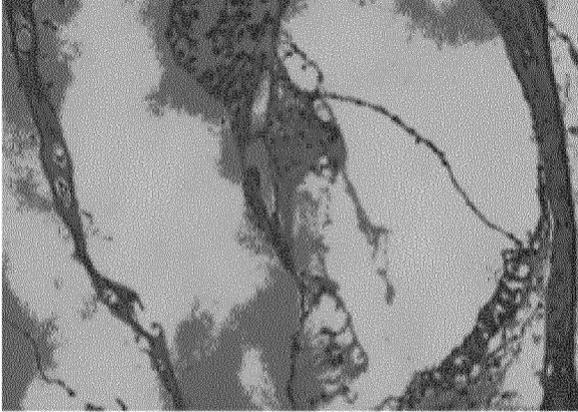
【Fig. 2】



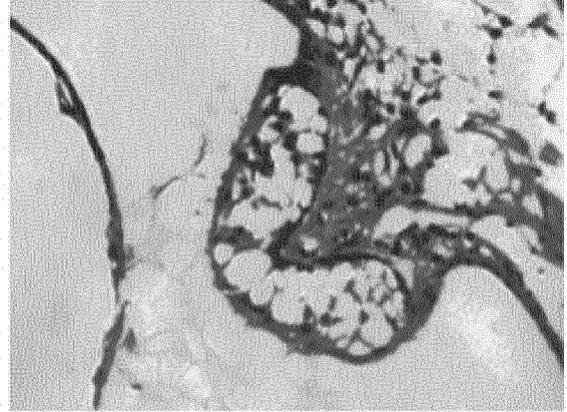
【Fig. 3】



【Fig. 4】

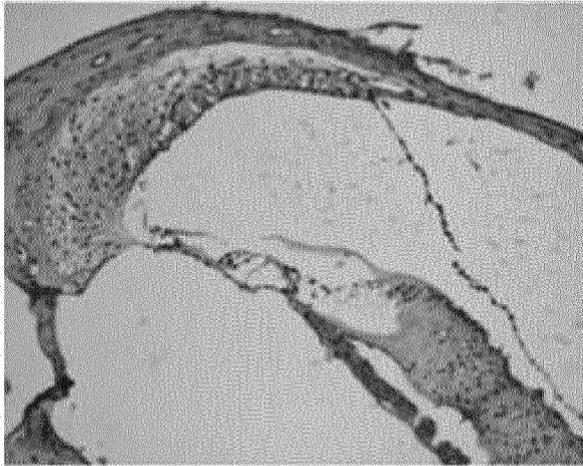


CÓCLEA

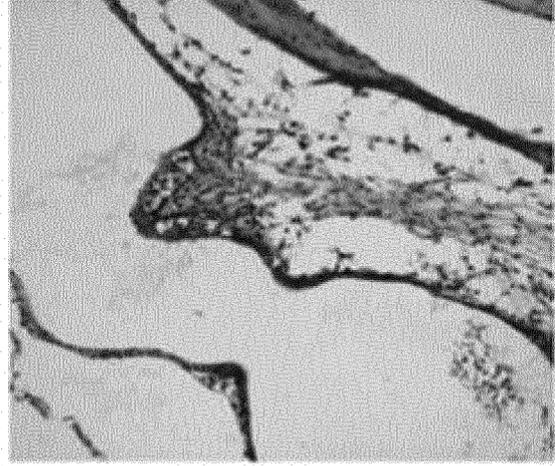


AMPOLLA

【Fig. 5】

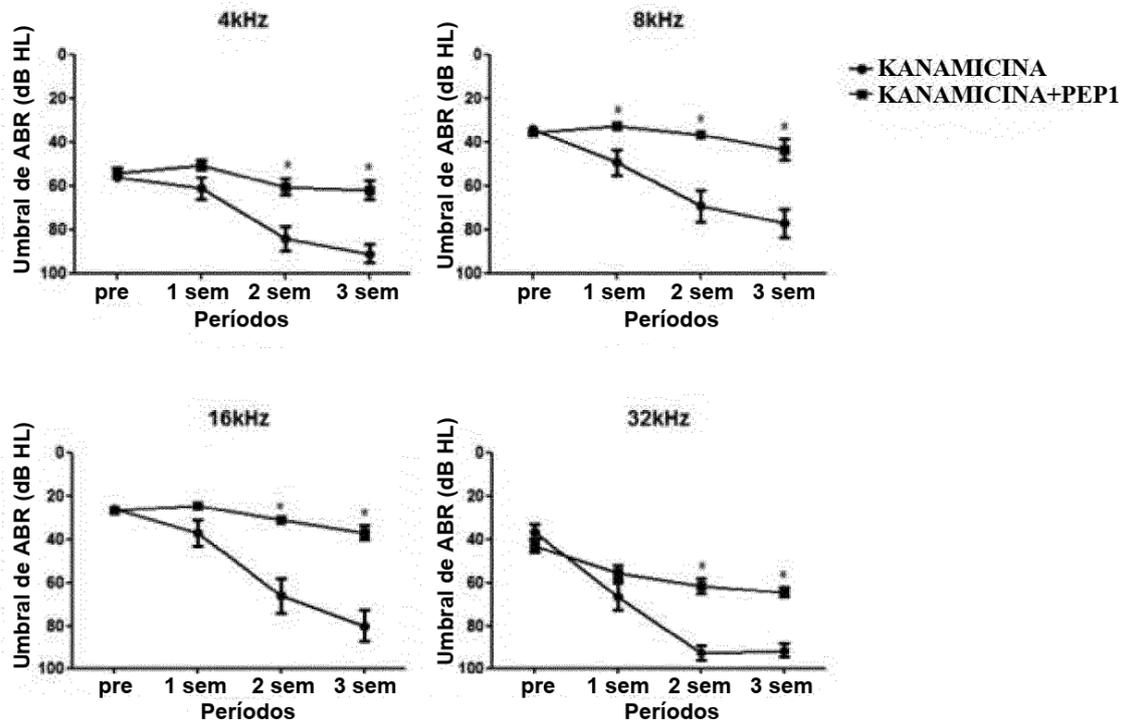


CÓCLEA

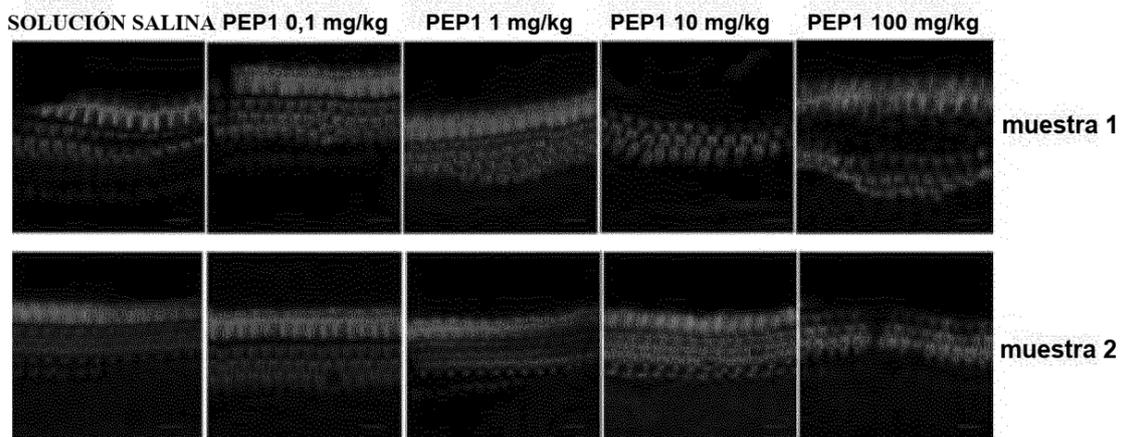


AMPOLLA

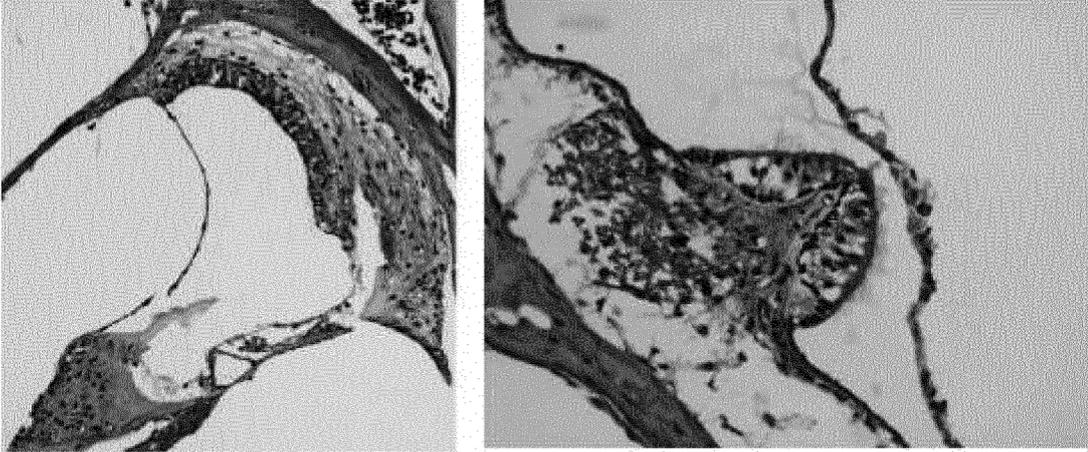
【Fig. 6】



【Fig. 7】



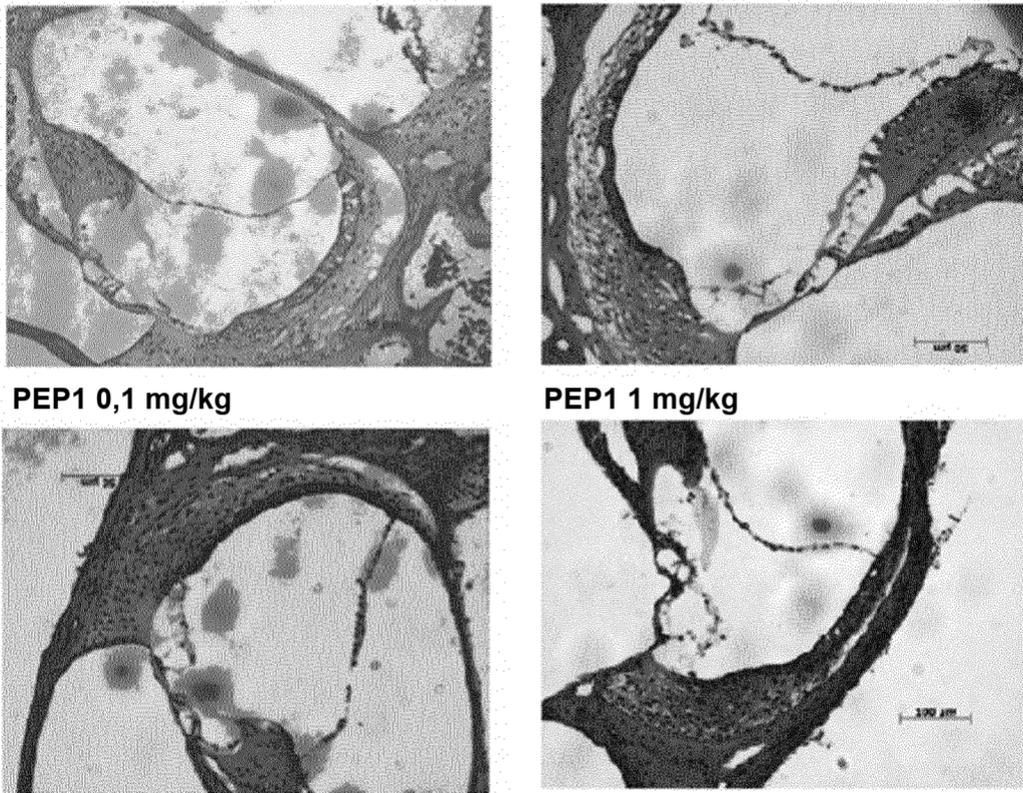
【Fig. 8】



CÓCLEA

AMPOLLA

【Fig. 9】



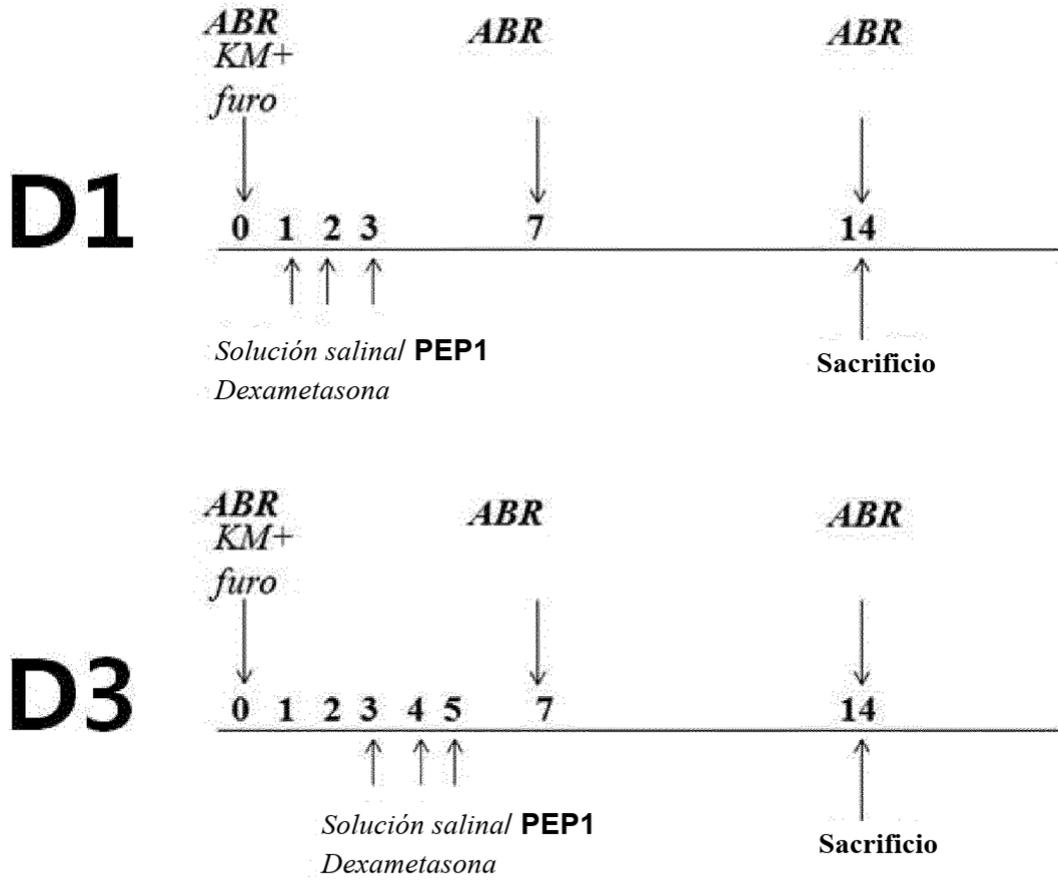
PEP1 0,1 mg/kg

PEP1 1 mg/kg

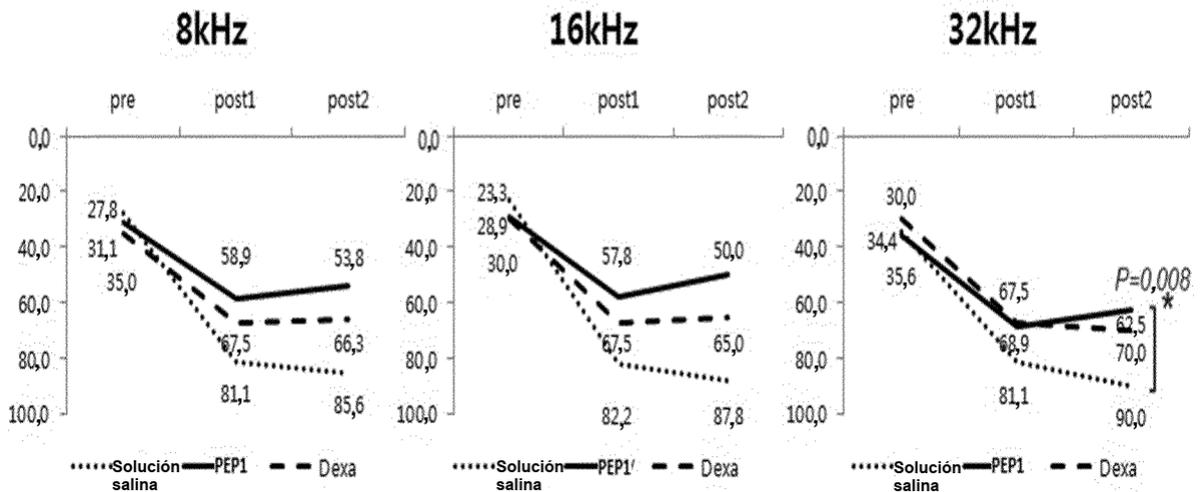
PEP1 10 mg/kg

PEP1 100 mg/kg

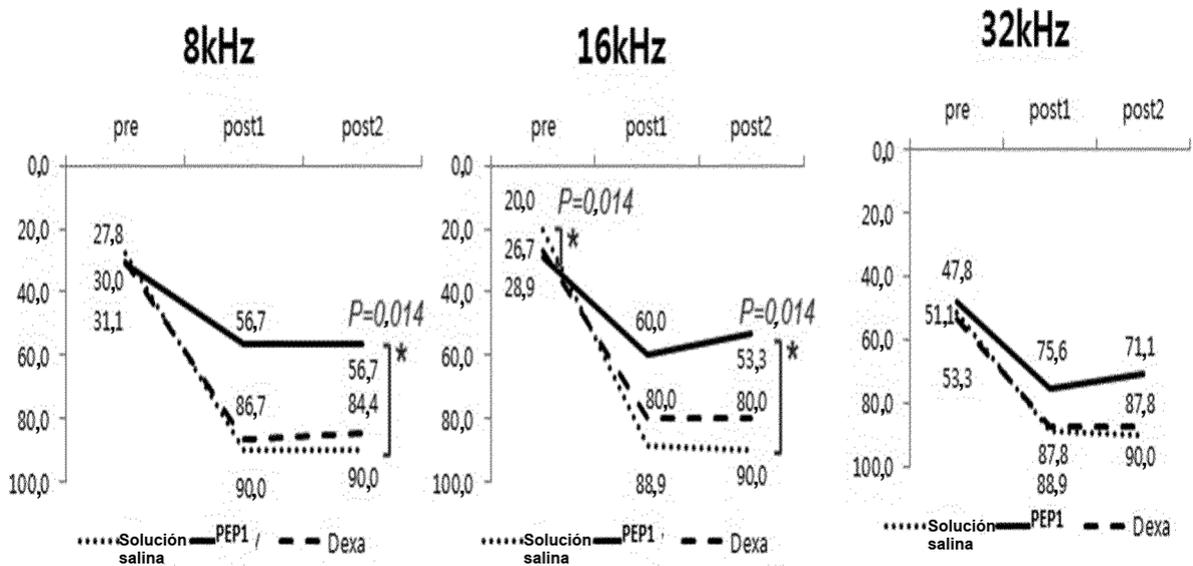
【Fig. 10】



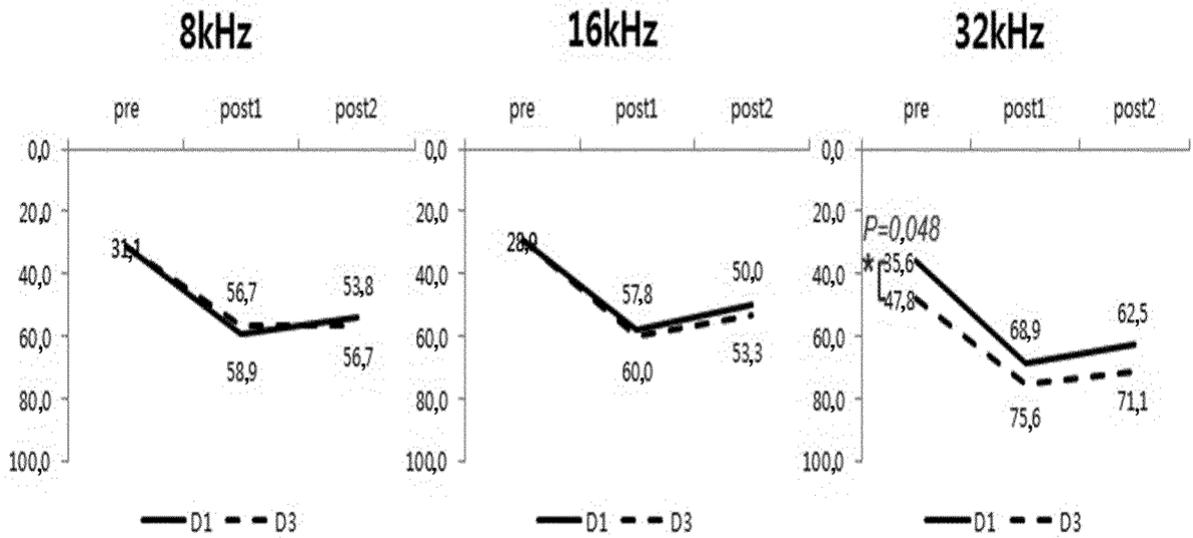
【Fig. 11】



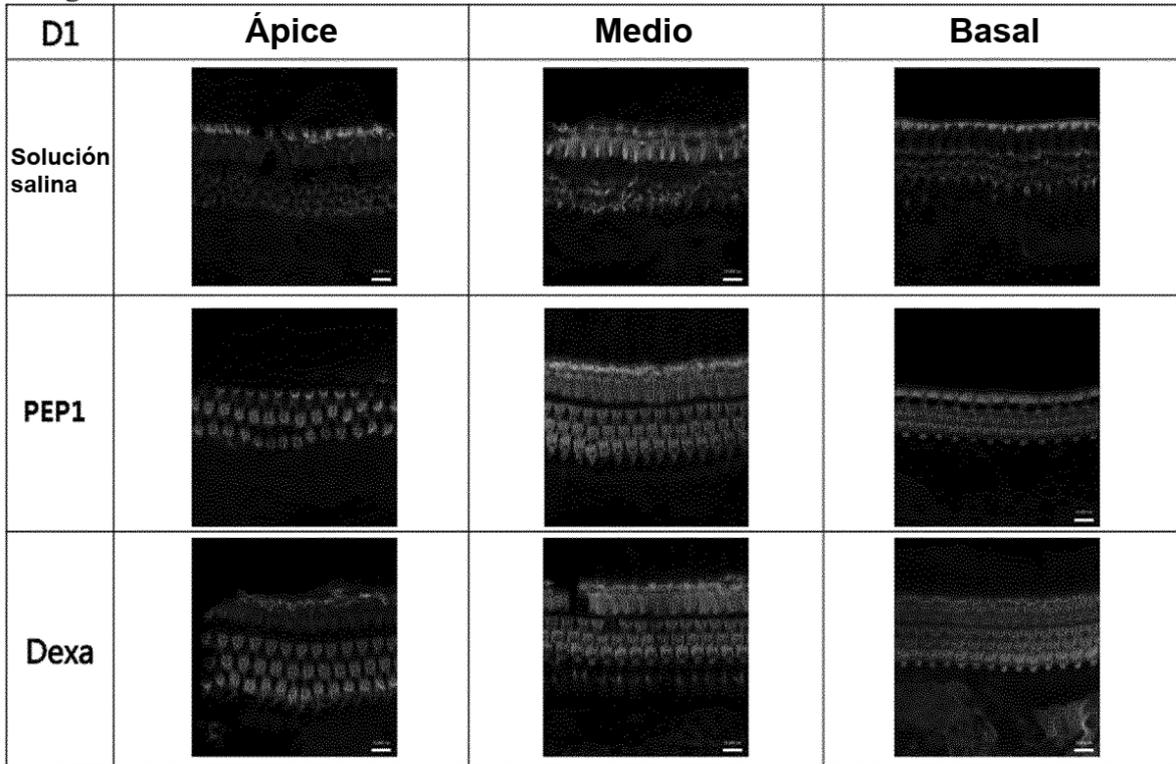
【Fig. 12】



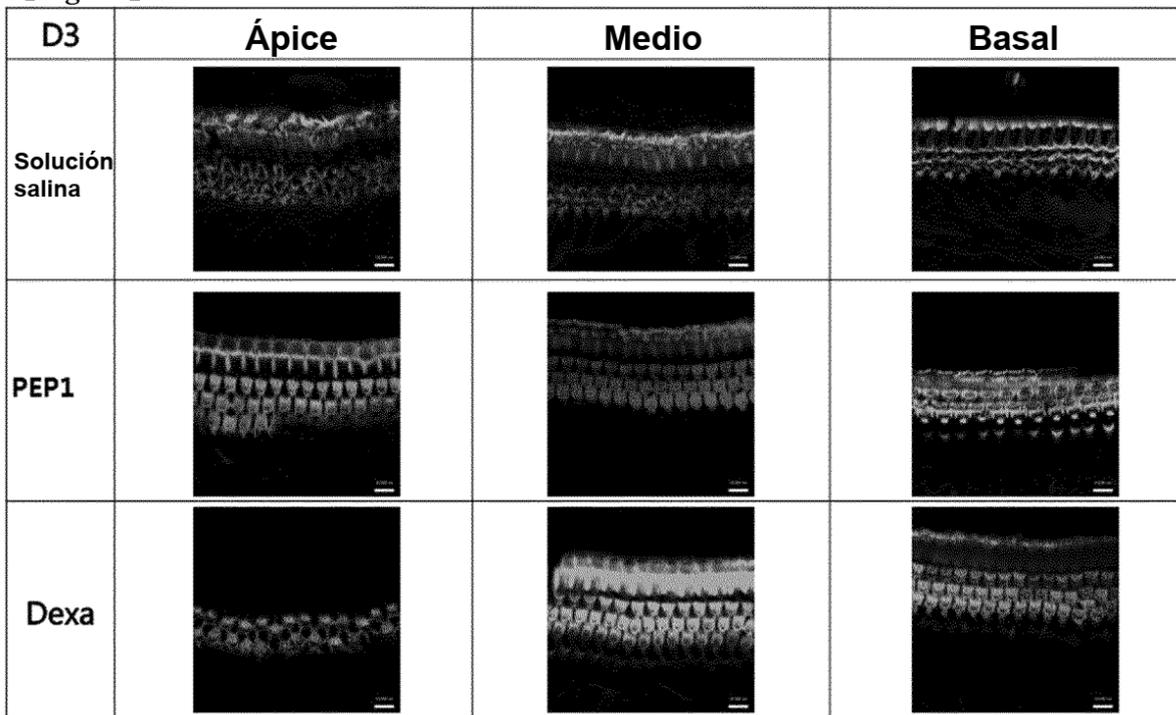
【Fig. 13】



【Fig. 14】

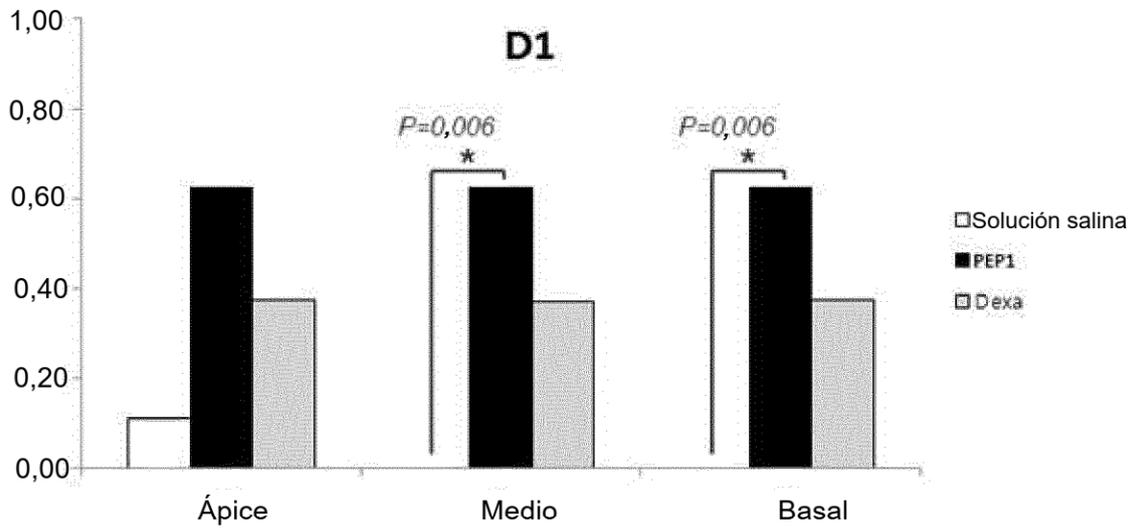


【Fig. 15】



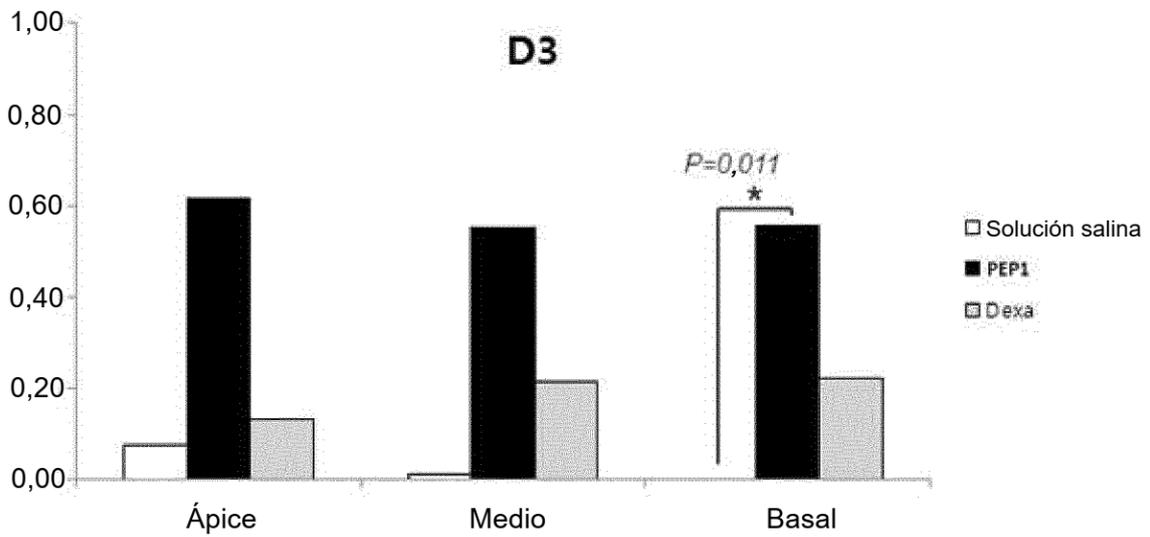
【Fig. 16】

PORCENTAJE DE CÉLULAS CILIADAS NORMALES DE D1



【Fig. 17】

PORCENTAJE DE CÉLULAS CILIADAS NORMALES DE D3



【Fig. 18】

PORCENTAJE DE CÉLULAS CILIADAS NORMALES DE D1 y D3

