

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 030**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39	(2006.01)
C07K 14/78	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A23L 33/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2017 PCT/KR2017/001419**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17175963**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2017 E 17779264 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3441081**

54 Título: **Péptido basado en colágeno tipo II α 1 útil para el tratamiento de una enfermedad de la superficie ocular**

30 Prioridad:

08.04.2016 KR 20160043296
08.04.2016 KR 20160043298
08.04.2016 KR 20160043300
08.04.2016 KR 20160043305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2021

73 Titular/es:

EYEBIO KOREA (100.0%)
(Eobang-dong) F-1010, 197, inje-roGimhae-si
Gyeongsangnam-do 50834, KR

72 Inventor/es:

YANG, JAE WOOK

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 819 030 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 basado en colágeno tipo II $\alpha 1$ útil para el tratamiento de una enfermedad de la superficie ocular

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a nuevos péptidos y usos de los mismos.

5 [Antecedentes de la técnica]

La matriz extracelular (ECM) es un componente restante en el tejido distinto de las células, está compuesta por combinaciones tridimensionales de diversas moléculas estructurales y funcionales secretadas por las células, y no se puede fabricar artificialmente porque las características y funciones de la misma aún no se han identificado completamente. La matriz extracelular juega un papel importante en el mantenimiento del entorno celular mientras determina las propiedades físicas del tejido tales como la fuerza de distracción, la fuerza compresiva y la elasticidad en la forma del tejido y controlando la presión osmótica, la permeabilidad de los iones, etc.

Además, tiene muchos factores de crecimiento y citocinas, y juega un papel en la determinación de la función de las células y, en particular, regula la diferenciación de las células en las etapas fetal y de crecimiento o sugiere la dirección del crecimiento del tejido mientras aumenta o disminuye de la adhesión celular y la actividad metabólica.

15 La matriz extracelular tiene proteínas tales como colágeno y elastina para determinar las propiedades físicas del tejido y glucoproteínas tales como fibronectina y laminina para unir células y matriz extracelular y muchos proteoglicanos tales como el condroitín sulfato sirven de soporte para mantener el volumen por mantener la forma y el volumen del tejido e interactuar activamente con las células del tejido para mantener y funcionar como un tejido u órgano único; sin embargo, los componentes y la estructura de la matriz extracelular aún no se han aclarado por completo. El documento WO 2007/146401 A2 se refiere a antagonistas de péptidos, tales como péptidos de colágeno sintéticos. El documento DE 40 41 059 A1 se refiere a péptidos de fórmula R1-Ala-Gly- R2-Gly-Ala-Pro-Gly-R3. El documento EP 3 329 929 A1 se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco, incluyendo la composición farmacéutica, como componente activo, un péptido novedoso que tiene efectos, entre otras cosas, en la mejora de la producción de lágrimas y la suavidad de la superficie corneal para los ojos secos inducidos por estrés por desecación.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Es un objeto de la presente invención proporcionar un péptido novedoso capaz de prevenir o tratar enfermedades de la superficie ocular inhibiendo o mejorando los cambios patológicos provocados por neovascularización, opacificación, fibrosis e inflamación de la córnea.

[Solución técnica]

La presente invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

35 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

40 La presente invención proporciona un alimento saludable para prevenir o mejorar una enfermedad de la superficie ocular que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

También se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la degeneración macular que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

Se proporciona además un alimento saludable para prevenir o mejorar la degeneración macular que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

45 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

La presente invención proporciona un alimento saludable para prevenir o mejorar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

[Efectos ventajosos]

Se ha confirmado que el péptido novedoso de la presente invención reduce la opacidad corneal, la neovascularización y la fibrosis e inhibe la expresión de factores inducidos por inflamación en modelos animales en los que los cambios patológicos de la superficie ocular son inducidos por quemaduras alcalinas y previene y mejora la degeneración macular inhibiendo eficazmente la angiogénesis en la retina y la coroides en la que se induce el cambio de tejido e inhibe o mejora los cambios patológicos de la célula epitelial corneal, tal como la disminución del volumen lagrimal del globo ocular, la irregularidad de la superficie corneal y la pérdida de células calciformes conjuntivales y, de acuerdo con lo anterior, pueden proporcionar composiciones que lo comprenden como ingrediente activo como composición farmacéutica y como alimento saludable para prevenir o tratar enfermedades oculares.

10 **[Descripción de dibujos]**

La figura 1 es un informe del péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK sintetizado.

La figura 2 muestra los resultados analizando la pureza del péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK usando HPLC.

La figura 3 muestra los resultados que confirman el peso molecular del péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK por Ion-Masas.

15 La figura 4 muestra los resultados que confirman el efecto de Hyp-GQDGLAGPK en la córnea de conejo con quemadura alcalina; la figura 4A es una fotografía de la córnea de un conejo al microscopio (SZX7, Olympus, Tokio, Japón) en los días 0, 7 y 17 después de la quemadura alcalina (barra de escala = 10 mm); la figura 4B es un gráfico que muestra el grado de neovascularización corneal; y la figura 4C es un gráfico que muestra el grado de opacificación corneal. El gráfico muestra la media \pm desviación estándar de cada grupo de prueba (n = 5), y mediante la prueba t, * P <0,05 frente al valor del grupo de quemadura alcalina se consideró significativo.

20 La figura 5 muestra los resultados que confirman el efecto de Hyp-GQDGLAGPK sobre el cambio de espesor de la córnea de conejo con quemadura alcalina; la figura 5A es una fotografía de una sección de tejido (barra de escala = 1 mm) tomada con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón); y la figura 5B es un gráfico que muestra el espesor de la córnea.

25 La figura 6 muestra las fotografías tomadas con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón) después de la inmunotinción de fibroblastos oculares mediante el procedimiento de tinción tricrómica de Masson para confirmar el efecto de Hyp-GQDGLAGPK sobre los cambios en la fibrosis en la córnea de conejo con quemadura alcalina (barra de escala = 100 μ m) y la porción que se muestra en marrón es fibroblasto.

30 La figura 7 muestra los resultados que confirman el efecto de Hyp-GQDGLAGPK sobre los marcadores de angiogénesis en conejos con quemadura alcalina y fotografías de secciones de tejido inmunotefidadas con anticuerpos específicos, CD31, FGF y VEGF por un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón) (barra de escala = 300 μ m).

35 La figura 8 muestra los resultados que confirman el efecto de Hyp-GQDGLAGPK sobre los marcadores de inflamación en conejos con quemadura alcalina y son fotografías tomadas con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón) después de la tinción inmunohistoquímica de las secciones de tejido con anticuerpos específicos tales como macrófagos, TNF α , ICAM-1, IL-1 β , IL-6 y MMP-9 (barra de escala = 300 μ m).

La figura 9 muestra los resultados que confirman el efecto inhibitorio sobre la angiogénesis en células HUVEC tratadas con colágeno, GDRGD (CPI) e hidroxil prolina-GQDGLAGPK (CPII).

40 La figura 10 muestra los resultados que confirman el grado de colapso tisular y angiogénesis según la irradiación con láser en 14 días después de la irradiación con láser.

La figura 11 muestra el efecto de inhibición de la neovascularización coroidea mediante irradiación con láser en un modelo animal seguido del tratamiento del mismo con colágeno a concentraciones de 2, 10 y 20 μ g o GDRGD (CPI) e hidroxil prolina-GQDGLAGPK (CPII) a concentraciones de 2 a 20 μ g,

45 La figura 12 muestra los resultados que confirman el efecto de inhibición de la neovascularización coroidea mediante irradiación con láser en un modelo animal seguido del tratamiento del mismo con Avastin o hidroxil prolina-GQDGLAGPK (CPII) a una concentración de 5 μ g, respectivamente.

50 La figura 13 muestra los resultados de RT-PCR en tiempo real que confirman los niveles de expresión génica de VEGF, ICAM y MCP-1 mediante irradiación con láser en un modelo animal seguido del tratamiento del mismo con Avastin o hidroxil prolina-GQDGLAGPK (CPII) a una concentración de 5 μ g, respectivamente, y extrayendo ARN de la retina y coroides después de 14 días de irradiación con láser.

La figura 14 muestra los resultados de Western blot que confirman los niveles de expresión de proteínas de VEGF, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) y angiopoyetina 2 en la retina obtenida y el extracto de coroides

mediante irradiación con láser en un modelo animal seguido del tratamiento del mismo con Avastin o hidroxiprolina-GQDGLAGPK (CPII) a una concentración de 5 µg, respectivamente, y extrayendo después de 14 días de irradiación con láser.

La figura 15 muestra cambios en la cantidad de lágrimas en cada ratón según el tratamiento con solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA en ratones NOD.B10.H2b en los que se elimina el estrés seco como resultados cuantitativos expresados en medias ± desviación estándar inyectando solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA en los ojos de los ratones NOD.B10.H2b durante 3, 5, 7 y 10 días y midiendo la cantidad de lágrimas de los ratones. * P < 0,05 frente al grupo DS 10D. #P < 0,05 frente al grupo de solución salina normal. §P < 0,05 frente al grupo de tratamiento Hyp-GQDGLAGPK. ¶P < 0,05 frente al grupo de tratamiento con CsA. †P < 0,05 frente al grupo de tratamiento DQS. &P < 0,05 frente al grupo de tratamiento con CsA.

La figura 16 muestra el efecto del péptido Hyp-GQDGLAGPK sobre la flexión de la superficie corneal; la figura 16A muestra los resultados de la imagen ocular de cada grupo tratado con solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA durante 3, 5, 7 y 10 días en ratones NOD.B10.H2b (DS) en los que el estrés seco es eliminado (barra de escala = 1 mm); y la figura 16B muestra cambios en las puntuaciones de suavidad de la superficie corneal de ratones tratados con solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA como resultados cuantitativos de la media ± desviación estándar. * P < 0,05 frente al grupo DS 10D, #P < 0,05 frente al grupo de solución salina normal, §P < 0,05 frente al grupo de tratamiento Hyp-GQDGLAGPK, ¶P < 0,05 frente al grupo de tratamiento con CsA, &P < 0,05 frente al grupo de tratamiento con CsA.

La figura 17 muestra el efecto del péptido Hyp-GQDGLAGPK sobre el desprendimiento de células epiteliales corneales; la figura 17A muestra los resultados de la tinción con hematoxilina y eosina (barra de escala = 100) que confirman el grado de desprendimiento de células epiteliales corneales en 10 días después de administrar solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA en las córneas de ratones NOD.B10.H2b (barra de escala = 100 µm); y la figura 17B es un resultado cuantitativo que muestra el grado de desprendimiento de células epiteliales corneales como la media ± desviación estándar (* P < 0,05 frente al grupo DS 10D).

La figura 18 muestra el efecto del péptido Hyp-GQDGLAGPK sobre la distribución de células caliciformes conjuntivales; la figura 18A muestra el resultado de la tinción PAS de la conjuntiva de ratones NOD.B10.H2b a los que se les administró solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA (barra de escala = 200 µm); y la figura 18B es un resultado cuantitativo que muestra el grado de distribución de las células caliciformes conjuntivales como la media ± desviación estándar (* P < 0,05 frente al grupo DS 10D).

La figura 19 muestra los resultados del análisis inmunohistoquímico de los niveles de expresión de TNF-α, ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 y MMP-9 en la glándula lagrimal de ratones NOD.B10.H2b y los resultados que confirman el grado de expresión de los factores inflamatorios mediante la administración de solución salina normal, Hyp-GQDGLAGPK, colágeno, CsA, DQS y HA a los ratones en los que se elimina el estrés seco y transcurren 10 días (barra de escala = 100 µm).

[Mejor modo]

La presente invención proporciona un péptido que consta de una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.

Un primer aminoácido del péptido puede ser hidroxiprolina (Hyp) y más preferiblemente hidroxiprolina GQDGLAGPK.

El péptido se puede derivar de colágeno tipo II α1 y el colágeno tipo II α1 se puede aislar de una matriz extracelular derivada de condrocitos de animales.

La matriz extracelular derivada de condrocitos se puede aislar de tejido cartilaginoso y/o matriz extracelular derivada de condrocitos formada por secreción de condrocitos derivados de cartílago de un animal, y el animal se puede seleccionar del grupo que consiste en cerdos, caballos, vacas, ovejas, cabras y monos, pero no se limita a ellos.

El "péptido" de la presente invención es un compuesto en el que al menos dos α-aminoácidos están unidos por un enlace peptídico, y se denomina dipéptido, tripéptido o tetrapéptido, según el número de los aminoácidos constituyentes y un oligopéptido tiene aproximadamente 10 o menos enlaces peptídicos y un polipéptido tiene una pluralidad de enlaces peptídicos.

Los péptidos de la presente invención se preparan usando procedimientos químicos (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlín). Por ejemplo, los péptidos se sintetizan mediante técnicas de estado sólido (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204), se escinden de la resina y se purifican mediante cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York NY).

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

5 La enfermedad de la superficie ocular puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en opacidad corneal, neovascularización corneal, inflamación corneal y fibrosis corneal.

Según un ejemplo de la presente invención, el modelo animal en el que se indujo la quemadura alcalina mostró opacidad corneal inmediatamente después de la quemadura alcalina como se muestra en la figura 4A, y la neovascularización y la opacidad de la córnea aumentaron después de 7 días de quemadura alcalina, pero un modelo animal en el que se confirmaron la angiogénesis y opacidad de la córnea se trató con solución salina normal o péptido Hyp-GQDGLAGPK durante 10 días (después de 17 días de quemadura alcalina), respectivamente y la puntuación de opacidad corneal del grupo de control aumentó significativamente a $3,0 \pm 0,0$ como se muestra en la figura 4B y la figura 4C, y se observó la disminución de la opacificación en el grupo experimental tratado con péptido, como se muestra en la figura 4B.

15 Según otro ejemplo de la presente invención, se realizó la tinción tricrómica de Masson para confirmar el efecto de los péptidos Hyp-GQDGLAGPK sobre la fibrosis corneal inducida por quemaduras alcalinas y como se muestra en la figura 6, en el caso del grupo control de quemadura alcalina, se confirmó que la formación de fibroblasto marrón aumentó en la región del estroma por la quemadura alcalina, pero el aumento de fibroblasto fue inhibido en el grupo experimental tratado con péptido Hyp-GQDGLAGPK. Además, se realizó tinción con H & E para confirmar el cambio histológico de la córnea según la quemadura alcalina y como resultado, refiriéndose a la parte superior de la figura 7, se confirmó que la quemadura alcalina indujo proliferación epitelial, invasión de células inflamatorias, edema convulsivo y neovascularización en la córnea.

20 Sin embargo, con respecto a los cambios histológicos, el grupo experimental tratado con péptido Hyp-GQDGLAGPK mostró un efecto de mejora avanzado y, como se muestra en la figura 5A, los resultados de la tinción con H & E mostraron que la neovascularización mejoró significativamente en los tejidos tratados con péptidos.

25 Según otro ejemplo de la presente invención, con el fin de confirmar el efecto de cada péptido sobre la expresión de marcadores inflamatorios, las secciones de córnea se tiñeron inmunohistoquímicamente para marcadores específicos de inflamación tales como macrófagos, $TNF\alpha$, ICAM-1, IL-1 β , IL-6 y MMP-9 y, como resultado, la quemadura alcalina aumentó la expresión de macrófagos en el epitelio y la matriz subcutánea y proliferativa como se muestra en la figura 8, mientras que el grupo experimental tratado con el péptido Hyp-GQDGLAGPK inhibió eficazmente la expresión de macrófagos. Además, se observó la expresión de citocinas inflamatorias, incluidas las moléculas de adhesión $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 e ICAM-1 en el grupo de quemaduras alcalinas, pero la expresión de los factores inflamatorios disminuyó en el grupo experimental tratado con péptido. Adicionalmente, la expresión de MMP-9 se observó fuertemente en la córnea del grupo de quemaduras alcalinas, mientras que la expresión de MMP-9 se inhibió en el grupo experimental tratado con péptido.

35 A partir de estos resultados, se confirmó que el péptido Hyp-GQDGLAGPK es eficaz para prevenir o tratar la opacidad corneal, la angiogénesis corneal, la inflamación corneal y la fibrosis corneal.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede derivar del colágeno tipo II $\alpha 1$ aislado de una matriz extracelular derivada de condrocitos (CDEM).

40 Más específicamente, la matriz extracelular derivada de condrocitos se puede aislar del tejido del cartílago y/o la matriz extracelular derivada de condrocitos formada por secreción de condrocitos derivados del cartílago de un animal, y el animal se puede seleccionar del grupo que consiste en cerdos, caballos, vacas, ovejas, cabras y monos, pero no se limita a ellos.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede ser un péptido cuyo primer aminoácido es hidroxiprolina, más preferiblemente una hidroxiprolina (Hyp)-GQDGLAGPK.

45 El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede estar contenido en una cantidad de 0,1 a 50 partes en peso en base a 100 partes en peso de la composición farmacéutica total.

La composición farmacéutica puede ser una formulación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en colirios, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.

50 La presente invención puede proporcionar un alimento saludable para prevenir o mejorar una enfermedad de la superficie ocular que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

Además, también se proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la degeneración macular que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

El péptido puede derivar del colágeno tipo II $\alpha 1$.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede ser un péptido en el que el primer aminoácido es hidroxiprolina, y más preferiblemente prolina-GQDGLAGPK.

5 El péptido puede prevenir o tratar la degeneración macular inhibiendo la neovascularización del ojo, y la degeneración macular puede ser una degeneración macular relacionada con la edad, pero no se limita a la misma.

Según un ejemplo de la presente invención, se irradiaron ratones con un láser para dañar los globos oculares y, después de 14 días, se extrajeron los globos oculares para la tinción con H&E.

10 Como resultado, como se muestra en la figura 10, se confirmó que el tejido en el sitio de irradiación con láser colapsó y se formó angiogénesis. Por otro lado, como se muestra en la figura 11, las lesiones de CNV disminuyeron en el grupo experimental que se trata con 2 μg de colágeno, CPI y CPII después de la irradiación con láser, respectivamente.

15 Además, el efecto inhibitorio neovascular coroidal de la hidroxiprolina-GQDGLAGPK (CPII), que tiene la mejor capacidad antiangiogénica en experimentos de formación de tubos *in vitro*, se comparó con el de Avastin, un grupo de control positivo, y como se muestra en la figura 11, el tamaño de la lesión disminuyó significativamente más que el del grupo de control y se confirmó que era similar al del grupo de control positivo que fue tratado con Avastin a la misma concentración.

A partir de los resultados anteriores, el péptido hidroxiprolina-GQDGLAGPK puede exhibir un excelente efecto terapéutico sobre la degeneración macular relacionada con la edad que es causada por angiogénesis.

20 El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede estar contenido en una cantidad de 0,1 a 50 partes en peso en base a 100 partes en peso de la composición farmacéutica total.

La composición farmacéutica puede ser una formulación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en colirios, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.

25 Se proporciona además un alimento saludable para prevenir o mejorar la degeneración macular que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 puede derivar del colágeno tipo II $\alpha 1$.

30 Más específicamente, el péptido puede ser un péptido aislado de una matriz extracelular derivada de condrocitos (CDEM), la matriz extracelular derivada de condrocitos se puede aislar de tejido de cartílago y/o matriz extracelular derivada de condrocitos formada por secreción de condrocitos derivados del cartílago de un animal, y el animal se puede seleccionar del grupo que consiste en cerdos, caballos, vacas, ovejas, cabras y monos, pero no se limita a ellos.

35 El péptido puede ser un péptido en el que el primer aminoácido es hidroxiprolina y más preferiblemente hidroxiprolina (Hyp) -GQDGLAGPK.

Los péptidos pueden recuperar la disminución de la producción de lágrimas y el desequilibrio de la superficie corneal debido al estrés seco, e inhibir el desprendimiento de la célula epitelial corneal y la producción de factor inflamatorio.

40 Según un ejemplo de la presente invención, como se muestra en la figura 15, la cantidad de lágrimas en ratones expuestos al estrés seco fue aproximadamente 85,5 % (grupo DS 10D, $0,03 \pm 0,01 \mu\text{L}$, $p < 0,05$) menor que la del grupo normal ($0,22 \pm 0,01 \mu\text{L}$), pero después de la remoción del estrés seco, la cantidad de lágrimas aumenta 7,9 veces ($p < 0,05$) después de 10 días de tratamiento en ratones tratados con Hyp-GQDGLAGPK ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{L}$), que se confirma que es aproximadamente 2,8 veces ($p < 0,05$) mayor que la del grupo de control negativo, grupo de tratamiento con solución salina normal ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{L}$) y aproximadamente 1,7 veces ($p < 0,05$) mayor que la del grupo de control positivo, grupo de tratamiento con colágeno ($0,13 \pm 0,02 \mu\text{L}$).

45 Además, el volumen de lágrimas del grupo de tratamiento Hyp-GQDGLAGPK fue 1,7 veces ($p < 0,05$) 1,4 veces ($p < 0,05$) y 1,6 veces ($p < 0,05$) mayor que el de los grupos de tratamiento con CsA, DQS y HA ($0,13 \pm 0,02 \mu\text{L}$; $0,16 \pm 0,02 \mu\text{L}$; $0,14 \pm 0,01 \mu\text{L}$), respectivamente y, de este modo, se confirmó que el efecto de Hyp-GQDGLAGPK en la mejora del volumen de lágrimas fue más eficaz que el medicamento para el tratamiento del ojo seco disponible actualmente en el mercado.

50 El péptido puede estar comprendido en una cantidad de 0,1 a 50 partes en peso en base a 100 partes en peso de la composición farmacéutica total.

La composición farmacéutica puede ser una formulación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en colirios, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.

La presente invención puede proporcionar un alimento saludable para prevenir o mejorar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

- 5 En otra realización de la presente invención, la composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular que comprende el péptido como ingrediente activo puede comprender además al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en portador, excipiente, desintegrante, edulcorante, agente de revestimiento, agente de hinchamiento, lubricantes, modificadores de deslizamiento, saborizantes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, diluyentes, dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes, que son apropiados para su uso convencional en la fabricación de composiciones farmacéuticas.

10 Los ejemplos específicos de portadores, excipientes y diluyentes incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, y las formulaciones sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc., y estas preparaciones sólidas se pueden preparar mezclándolas con al menos un excipiente tal como almidón, carbonato cálcico, sacarosa o lactosa, gelatina, etc. en la composición. También, además de los excipientes simples, se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Los ejemplos de formulación líquida para administración oral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes, etc. y diversos excipientes tales como agentes humectantes, edulcorantes, fragancias, conservantes, etc. además del agua y la parafina líquida, que se usan comúnmente como diluyentes simples. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas, supositorios y similares. Ejemplos de soluciones no acuosas o del agente de suspensión incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como oleato de etilo, etc. Como base de supositorio, se pueden usar witepsol, macrogol, tween 61, papel de cacao, laurina, glicerogelatina, etc.

20 Según una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intraesternal, percutánea, intranasal, por inhalación, tópica, rectal, intraocular o intradérmica a un sujeto de una manera convencional.

30 La dosis preferida del péptido varía según la condición y el peso corporal del sujeto, el tipo y grado de la enfermedad, la forma del fármaco, la vía de administración y el período, y los expertos en la técnica pueden seleccionarla de manera apropiada. Según una realización de la presente invención, la dosis diaria puede ser de 0,01 a 200 mg/kg, específicamente de 0,1 a 200 mg/kg, más particularmente de 0,1 a 100 mg/kg, aunque no se limita a estos. La administración se puede administrar una vez al día o dividirse en varias dosis, por lo que el alcance de la presente invención no está limitado.

35 En la presente invención, el "sujeto" puede ser un mamífero, incluido un ser humano, pero no se limita a estos ejemplos.

Además, en la presente invención, el alimento saludable se usa junto con otros alimentos o aditivos alimentarios distintos del péptido de la presente invención, y se puede usar adecuadamente según un procedimiento convencional. La cantidad que se va a mezclar del ingrediente activo se puede determinar apropiadamente según su propósito de uso, por ejemplo, prevención, tratamiento de salud o terapéutico.

40 La dosis eficaz del compuesto contenido en el alimento saludable se puede usar de acuerdo con la dosis eficaz del agente terapéutico, pero puede estar hasta el intervalo anterior para la ingesta a largo plazo con fines de salud e higiene o propósitos de control de la salud, y está claro que el componente se puede usar en una cantidad de al menos el intervalo anterior, ya que no hay ningún problema en términos de seguridad.

45 No existe ninguna limitación particular sobre el tipo de alimento saludable y los ejemplos del mismo incluyen carne, salchicha, pan, chocolate, dulces, bocadillos, confitería, pizza, ramen, otros fideos, gomas, productos lácteos, incluidos helados, diversas sopas, bebidas, té, bebidas, bebidas alcohólicas y complejos vitamínicos, etc.

A continuación, se describirá la presente invención en detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

<Ejemplo experimental 1> Fabricación de un modelo animal de enfermedad de la superficie ocular

50 Se llevó a cabo un experimento con animales para estudios de ojos y visión según the Animal Experiment Manual aprobado por Inje University Medical School and the ARVO Statement (No.; 2014-028).

Se compraron veintiséis conejos blancos de Nueva Zelanda de 2,0 a 2,5 kg de Samtako (Osan, Corea), y una mezcla de clorhidrato de ketamina (30 mg/kg de peso corporal, Huons, Jecheon, Corea) e clorhidrato de xilazina (2,5 mg/kg, Bayer Korea Ltd., Seúl, Corea) se inyectó en los músculos para anestesia general y se realizó anestesia local usando gotas oftálmicas de propracaina Alcaine (Alcon Inc., Seúl, Corea).

A continuación, se expuso papel de filtro de 8 mm empapado con NaOH 1 N en el centro de la córnea derecha del conejo durante 1 minuto para preparar un modelo de quemadura alcalina, y la angiogénesis corneal y la opacidad corneal fueron confirmadas por la quemadura alcalina después 7 días de quemadura.

5 Los conejos se dividieron aleatoriamente en un grupo de quemadura alcalina (n = 5) y un grupo tratado con péptidos (n = 5). En el grupo de quemaduras alcalinas, se administró solución salina normal 4 veces al día y en el grupo tratado con péptido, se administró péptido Hyp-GQDGLAGPK de 10 mg/ml 4 veces al día, y el ojo izquierdo se usó como grupo de control.

10 Después de que se administró cada material de tratamiento durante 10 días, se realizaron tinción con H&E, tinción con tricrómico de Masson e inmunohistoquímica para confirmar la fibrosis, angiogénesis, inflamación y cambios en la estructura de la córnea.

<Ejemplo experimental 2> Identificación de neovascularización y opacificación de la córnea

Se realizó una evaluación clínica de la neovascularización y opacificación de la córnea.

15 Se evaluó un grado de neovascularización corneal de 0 a 3 puntos: 0 puntos para ausencia de angiogénesis, 1 punto para angiogénesis en la periferia de la córnea, 2 puntos para expansión de la angiogénesis hasta el borde de la pupila y 3 puntos para la expansión de la angiogénesis al centro corneal más allá del borde de la pupila. La angiogénesis corneal se evaluó como 3 puntos cuando era difícil evaluar el grado de neovascularización corneal debido a una opacificación considerable y simbléfaron extenso.

20 Además, se evaluó el grado de opacificación corneal de 0 a 3: 0 puntos para una córnea clara donde la parte del iris es claramente visible, 1 punto para la opacidad parcial en la parte del iris, 2 puntos cuando el borde de la pupila y la parte del iris se ve débil y 3 puntos para una opacificación completa de la parte del iris y la parte de la pupila.

<Ejemplo experimental 3> Tinción tricrómica de Masson

25 Los globos oculares se fijaron con paraformaldehído al 3,5 %, se lavaron y se almacenaron en alcohol al 70 % hasta que se obtuvieron secciones (6 µm) de tejido incluidas en parafina. Para visualizar la fibrosis de colágeno y el grado de fibrosis, se realizó la tinción con tricrómico de Masson de las secciones y se tomaron imágenes de las secciones mediante un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón).

<Ejemplo experimental 4> Tinción química para análisis histológico

30 Para el análisis histológico, los globos oculares se fijaron con paraformaldehído al 3,5 % y luego se congelaron en nitrógeno líquido con adherencia en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT; Tissue-Tek, Sakura Fine Technical Co., Ltd., Tokio, Japón).

Las muestras se fijaron en formaldehído al 4 % durante 24 horas, se secaron y luego se pegaron en cera de parafina. Luego, se prepararon secciones de tejido con un grosor de 8 µm, se realizó la tinción con hematoxilina/eosina (H&E) y se fotografiaron las imágenes de las secciones con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón).

<Ejemplo experimental 5> Análisis inmunohistoquímico

35 Se cortaron secciones de tejido en 6 µm de espesor y se usaron para análisis inmunohistoquímico.

40 En primer lugar, las secciones de tejido se fijaron con paraformaldehído al 3,5 % y se impregnaron con Triton X-100 al 0,1 %, se inactivaron con albúmina de suero bovino al 2 % (BSA; todos de Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anti-CD31 (1:1.000; Abcam Inc., Cambridge, MA), anti-bFGF (1:1.000; Bioss Inc., Woburn, MA), anti-IL-1β, anti-IL-6 (1:1.000 ; Cloud-Clone Corp., Houston, TX), anti-MMP-9, anti-ICMA-1, anti-TNFα, anti-macrófagos/mononucleos (1:1.000; Abnova Crop., Taipei, Taiwán) y anticuerpo primario anti- VEGF-A (Abbotec, San Diego, CA).

Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario durante 45 minutos en la sección y se visualizó la respuesta inmunológica con cromógeno de diaminobencidina (DAB), y la sección se tiñó con contraste con hematoxilina de Mayer (Sigma) durante 30 segundos a temperatura ambiente.

45 Las secciones teñidas se fotografiaron mediante un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón).

<Ejemplo experimental 6> Ensayo de tubos

El efecto antiangiogénico de la hidroxil prolina-GQDGLAGPK se confirmó mediante un ensayo de tubos usando células endoteliales vasculares humanas (HUVEC).

50 Se tiñeron células HUVEC con calceína-AM y luego se dispensaron en una placa de 48 pocillos recubierta con Matrigel, se trataron con colágeno, CPI y CPII a concentraciones junto con 50 ng/ml de VEGF humano

recombinante, y después de 4 horas de incubación a 37 °C, se observó la formación del tubo mediante microscopía de fluorescencia (Leica) y la longitud del tubo se analizó mediante el software Image lab (Bio-Rad Laboratories).

<Ejemplo experimental 7> Modelado de animales experimentales y neovascularización coroidea (CNV)

5 Se adquirieron ratones C57BL/6 de Orient Bio y los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices aprobadas por the University of Inje (No, 2013-053) y ARVO con respecto al uso en animales para estudios de ojos y visión. Se trataron ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad con láser de diodo verde (532 nm, 150 mW, 0,1 s, 50 μM, fotocoagulador) para dañar el área del nervio óptico retiniano. Inmediatamente después de la irradiación con láser, CP1, CPlI y el grupo de control positivo Avastin se disolvieron en PBS y se administraron 5 mg cada uno por día en el globo ocular durante 5 días. El experimento anterior para cada grupo de experimentos se realizó usando ambos ojos de cinco ratones cada uno.

<Ejemplo experimental 8> Análisis histológico

Para observar los cambios de tejido por láser, se extrajeron ojos de ratón y se fijaron con formalina al 10 % y se pegaron profundamente en la mezcla de OCT.

15 Las muestras de tejido de 8 μm tratadas con el procedimiento descrito anteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se fotografiaron con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón) y se analizaron.

<Ejemplo experimental 9> Montaje plano de retina-coroides

20 Después de 14 días de irradiación con láser, se realizó un montaje plano de retina-coroides para confirmar el efecto inhibitor de CPlI sobre el tamaño de la lesión de CNV. El ratón se anestesió y se inyectó con 25 mg/ml de FITC-dextrano en 100 μl de retroorbital. Después de 30 minutos, se sacrificó al ratón y se extrajo el globo ocular y se fijó con formalina al 10 % y luego, se retiraron la córnea y el cristalino y se montaron en plano sobre el cubreobjetos. La neovascularización teñida con FITC-dextrano se observó mediante microscopía de fluorescencia (Leica) y el tamaño de la lesión se midió mediante el programa Image J.

<Ejemplo experimental 10> Análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real

25 Con el fin de confirmar el efecto inhibitor de la hidroxil prolina-GQDGLAGPK sobre la expresión génica relacionada con la neovascularización, se extrajo ARN usando el Mini kit RNeasy (Qiagen) en una mezcla de retina y coroides de globos oculares de ratones extraídos, y se sintetizó ADNc usando cebador oligo (dT) y transcriptasa inversa. Los productos de PCR se amplificaron usando el conjunto de cebadores específicos (COSMOGENETECH, Corea) que se muestra en la Tabla 1 y SYBR Green PCR 2X PreMix (Enzymomics) y para las condiciones de PCR, las muestras se incubaron a 95 °C, durante 10 minutos y se realizaron 40 ciclos de PCR a 95 °C, durante 15 segundos, 60 °C, durante 30 segundos y 72 °C, durante 15 segundos. La cuantificación relativa se calculó usando el procedimiento 2-(DDCT) [Livak and Schmittgen, 2001; DDCT = grupo de control (CT, diana-CT, actina) grupo de control (CT, diana-CT, actina)].

[Tabla 1]

Diana	Secuencia del cebador (5' → 3')	
	Directo	inverso
VEGF	ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTG	TCACCGCCTCGGCTTGTCA
ICAM	TGCGTTTTGGAGCTAGCGGACCA	CGAGGACCATACAGCACGTGCCAG
MCP-1	TGGCAAGATGATCCCAATGA	GCAGCACTGTTTCGTCACCTCA
GAPDH	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC	GTGCCGTTGAATTTGCCGTGA

35

<Ejemplo experimental 11> Western blot

La mezcla de retina y coroides de ratón se disolvió en tampón Pro-PREP (iNtRON) que contenía cóctel inhibitor de proteasa y cóctel inhibitor de fosfatasa, y se extrajo la proteína.

40 La proteína extraída se cuantificó usando el kit de ensayo BCA (Pierce) y se mezcló con tampón de carga de gel SDS y se desnaturizó hirviéndola a 100 °C, durante 5 minutos. Las proteínas se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), y luego para bloquear la unión de proteínas no específicas, las membranas se incubaron en leche desnatada al 5 % durante 1 hora y se trataron con VEGF, Flk-1, Flt- 1, angiopoyetina-2 y β-actina (Santa Cruz Biotechnology) como anticuerpo primario para realizar

inmunotransferencia general. Posteriormente, la proteína inmunorreactiva se detectó mediante el kit ECL (Advansta) y el sistema DOC de gel múltiple.

<Ejemplo experimental 12> Modelado de animales de experimentación y secado

5 Los ratones NOD.B10.H2^b se adquirieron en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.). Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices aprobadas por the University of Inje (No.; 2014-029) y ARVO con respecto al uso de animales para la investigación ocular y visual. Los ratones NOD.B10.H2^b de 12 a 16 semanas de edad se expusieron a un 40-50 % de humedad ambiental y ventilación usando un ventilador durante 18 horas al día como estrés seco y se inyectaron subcutáneamente con 0,5 mg/0,2 ml de bloqueador de los receptores muscarínicos. Además, se inyectó bromhidrato de escopolamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alternativamente en las caderas de las ratas cuatro veces al día durante 10 días a las 9 am, 12 pm, 3 pm y 6 pm. Los ratones tratados con el procedimiento anterior se sacrificaron 10 días después y no restringieron el comportamiento del animal ni la ingesta de alimentos y agua durante el período experimental.

15 Después de 10 días de estrés seco ocular, se detuvo la inyección de escopolamina y se cambió a un ambiente normal de humedad y temperatura y se eliminó el estrés seco, se disolvieron 10 mg/ml de Hyp-GQDGLAGPK y colágeno en solución salina normal para administrar 5 µl cada 5 veces al día durante 10 días, y se administraron solución salina normal y 0,1 % HA al globo ocular 5 veces al día durante 10 días. Se usaron tres ratones en cada uno de los seis grupos experimentales usando ambos ojos de los ratones y se repitieron todos los experimentos.

<Ejemplo experimental 13> Comprobación de la cantidad de lágrimas

20 La producción de lágrimas se midió mediante un procedimiento informado usando hilos de algodón impregnados con rojo fenol (Zone-Quick, Oasis, Glendora, CA) (Villareal AL, Farley W, Pflugfelder SC. Effect of topical ophthalmic epinastine and olopatadine on tear volume in mice. Eye Contact Lens. 2006; 32 (6): 272-276). La cantidad de lágrimas se midió con una pinza médica, y el hilo se colocó en el costado del canto durante 20 segundos, y el hilo enrojecido al mojarse con lágrimas se observó con un microscopio (SZX7; Olympus Corp, Tokyo, Japón) para expresar en milímetros. El líquido lagrimal medido en milímetros se comparó con una curva estándar expresada como un hilo de algodón que se empapó con la cantidad de lágrimas esperada de la solución básica de ratón (1500 ml de sal al 0,9 % y 5 ml de NaOH 5 N) durante 20 segundos.

<Ejemplo experimental 14> Evaluación de la capacidad de flexión de la superficie corneal

30 En cuanto a la curvatura de la superficie corneal, se obtuvo una imagen reflejada del anillo blanco a partir de una iluminación de anillo de fibra óptica de un microscopio estereoscópico (SZX7; Olympus) después de anestesiarse al animal. La suavidad de la córnea se evaluó clasificando la irregularidad de las células epiteliales de la córnea reflejadas en el anillo blanco de la imagen digital. La puntuación de gravedad de la irregularidad corneal se calculó dividiendo el anillo de reflexión en cuadrantes y clasificándolo en 5 grados según el grado de irregularidad. Ninguna irregularidad es de grado 0, la irregularidad de 1/4 (trimestre) es de grado 1; irregularidad de 2/4 (dos cuartos) es grado 2; irregularidad de 3/4 (tres cuartos) es grado 3; toda la irregularidad es de grado 4; y la irregularidad grave es de grado 5 y, de este modo, se confirmaron todos los anillos.

<Ejemplo 1> Análisis de proteínas y síntesis de péptidos

El análisis de proteínas de la matriz extracelular derivada de condrocitos animales se realizó en el grupo de Baek del Center of Biomedical Mass Spectrometry (Diatech Korea Co., Ltd., Seoul, Corea).

40 Se obtuvo una hidroxil prolina-GQDGLAGPK (Hyp-GQDGLAGPK SEQ ID NO: 1) mediante el análisis de proteína anterior, que corresponde a una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína de colágeno tipo II α 1 y los péptidos se sintetizaron en BIOCELTRAN (Chuncheon, Corea), como se muestra en la figura 1.

Se realizó HPLC para confirmar la pureza de la hidroxil prolina-GQDGLAGPK sintetizada y, como resultado, se confirmó que el péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK se sintetizó con una pureza del 99,3 % como se muestra en la figura 2.

45 Además, como resultado de confirmar el peso molecular del péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK mediante Ion-Masas, se confirmó que el peso molecular del péptido hidroxil prolina-GQDGLAGPK era 654,99 como se muestra en la figura 3.

<Ejemplo 2> Identificación de neovascularización corneal y cambio de opacificación por péptido

50 Después de 7 días de quemadura alcalina de la córnea, se realizó la evaluación clínica de la neovascularización y opacificación de la córnea.

Como resultado, se confirmó que la opacidad de la córnea se produjo inmediatamente después de la quemadura alcalina, como se muestra en la figura 4A y la neovascularización corneal y la opacidad aumentaron después de 7 días de quemadura alcalina.

- Después de que se confirmaron la neovascularización y opacificación de la córnea, el tratamiento con solución salina normal o péptido Hyp-GQDGLAGPK durante 10 días (después de 17 días de quemadura alcalina) dio como resultado un aumento significativo en la puntuación de opacidad de la córnea del grupo de control a 3,0 como se muestra en la figura 4B y la figura 4C, y la puntuación de neovascularización fue de 2,8, lo que indica que la neovascularización se extendió más allá del margen pupilar hacia el centro corneal.
- Por otro lado, como se muestra en la figura 4B, se confirmó que el efecto de reducción de la opacidad se mostró en el grupo experimental tratado con péptido.
- A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el péptido Hyp-GQDGLAGPK es eficaz para inhibir la opacificación corneal.
- 5 **<Ejemplo 3>** Confirmación del cambio del espesor de la córnea por péptido
- Se analizó el espesor de la córnea de las secciones teñidas con H&E fotografiadas con un microscopio virtual (NanoZoomer 2.0 RS, Hamamatsu, Japón) usando el programa NDP view (Hamamatsu, EE.UU.).
- Como resultado, se confirmó que el espesor de la córnea aumentó desde el intervalo normal de 526,6 μm a 960,6 μm después de la quemadura alcalina, como se muestra en la figura 5B.
- 15 Sin embargo, después de 10 días de tratamiento con péptido Hyp-GQDGLAGPK, se confirmó que el espesor de la córnea se redujo a 550,0 μm ($p < 0,05$) en el grupo experimental tratado con péptido que en el grupo de quemaduras alcalinas.
- <Ejemplo 4>** Identificación del efecto de inhibición de la fibrosis corneal de péptidos
- Se realizó la tinción con tricrómico de Masson para confirmar el efecto del péptido Hyp-GQDGLAGPK sobre la fibrosis corneal inducida por quemaduras alcalinas.
- 20 Como resultado, se confirmó que el grupo de control de quemadura alcalina aumentaba la formación de fibroblasto marrón en la parte del estroma por la quemadura alcalina, como se muestra en la figura 6, pero se confirmó que el aumento de fibroblastos se suprimió en el grupo experimental tratado con péptido Hyp-GQDGLAGPK.
- A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el péptido Hyp-GQDGLAGPK inhibe el aumento de fibroblastos y es eficaz para inhibir la fibrosis corneal.
- 25 **<Ejemplo 5>** Identificación del efecto de inhibición de la neovascularización corneal de péptidos
- Se realizó tinción con H&E para confirmar los cambios histológicos de la córnea según la quemadura alcalina.
- Como resultado, con referencia a la parte superior de la figura 7, se confirmó que la proliferación epitelial, la invasión de células inflamatorias, el edema convulsivo y la neovascularización fueron inducidas en la córnea por la quemadura alcalina.
- 30 Sin embargo, con respecto a los cambios histológicos anteriores, el grupo tratado con el péptido Hyp-GQDGLAGPK mostró un efecto de mejora avanzado y, como se muestra en la figura 5A, los resultados de la tinción H&E también mostraron que la neovascularización mejoró significativamente en los tejidos tratados con péptido.
- A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el péptido Hyp-GQDGLAGPK afecta la neovascularización y, de este modo, la córnea con quemadura alcalina se trató con péptidos Hyp-GQDGLAGPK y se realizó inmunotinción en las secciones de la córnea usando CD31, FGF y VEGF, que son marcadores específicos de neovascularización corneal.
- 35 Como resultado, se confirmó que los marcadores de neovascularización CD31, FGF y VEGF se expresaban fuertemente en células de matriz de fibroblastos de acuerdo con la quemadura alcalina, como se muestra en la figura 7.
- 40 Sin embargo, se observaron disminuciones significativas de CD31, FGF y VEGF en el epitelio, subepitelio y matriz en el grupo tratado con péptido.
- A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el péptido Hyp-GQDGLAGPK es eficaz para inhibir la neovascularización corneal.
- 45 **<Ejemplo 6>** Identificación de efectos antiinflamatorios de péptidos
- Como resultado de la tinción H&E anterior, se confirmó que las células inflamatorias penetraron en la córnea por la quemadura alcalina. Por lo tanto, para confirmar el efecto de cada péptido sobre la expresión de marcadores inflamatorios, se realizó inmunotinción con marcadores inflamatorios específicos tales como macrófagos, $\text{TNF}\alpha$, ICAM-1, IL-1 β , IL-6 y MMP-9 en las secciones corneales.

Como resultado, se confirmó que la quemadura alcalina aumentó la expresión de macrófagos en el epitelio, subepitelio y matriz proliferativa como se muestra en la figura 8, mientras que la expresión de macrófagos se inhibió eficazmente en el grupo experimental tratado con el péptido Hyp-GQDGLAGPK. Además, la expresión de citocinas inflamatorias, incluidas las moléculas de adhesión de TNF α , IL-1 β e IL-6 e ICAM-1, aumentó en el grupo de quemaduras alcalinas, pero la expresión de los factores inflamatorios disminuyó en el grupo experimental tratado con el péptido. Adicionalmente, la expresión de MMP-9 se observó fuertemente en la córnea del grupo de quemaduras alcalinas, mientras que la expresión de MMP-9 se inhibió en el grupo experimental tratado con péptido.

<Ejemplo 7> Confirmación del efecto de inhibición de la neovascularización de péptidos

Se realizó un ensayo de tubos usando células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) para confirmar el efecto antiangiogénico de hidroxil prolina-GQDGLAGPK.

Como resultado, como se muestra en la figura 9, la formación de tubos del grupo tratado con VEGF aumentó aproximadamente al menos 1,5 veces que la del grupo no tratado con VEGF, mientras que los grupos experimentales tratados con colágeno, CPI y CPII mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis. En particular, CPII inhibió la formación de tubos de una manera dependiente de la concentración y disminuyó casi en el mismo grado la angiogénesis del grupo no tratado con VEGF. También se confirmó que era un nivel similar del grupo tratado con Avastin, un remedio para la degeneración macular relacionada con la edad.

<Ejemplo 8> Confirmación del efecto de inhibición de la neovascularización coroidea de péptidos

Se irradió un globo ocular de ratón con láser de la misma manera que en el ejemplo experimental 7 y 14 días después de la irradiación con láser, se extrajo el globo ocular y se realizó la tinción H&E.

Como resultado, como se muestra en la figura 10, se confirmó que el tejido en el sitio de irradiación con láser colapsó y se formó una angiogénesis. Por otro lado, como se muestra en la figura 3, las lesiones de CNV se redujeron en el grupo experimental tratado con colágeno, CPI y CPII mediante inyección intraocular durante 5 días, respectivamente, que se trataron todos con 2 μ g.

Para comparar el efecto de inhibición de la neovascularización coroidea de hidroxil prolina-GQDGLAGPK (CPII), que tiene la mejor eficacia antiangiogénica en el experimento de formación de tubos *in vitro*, con el grupo de control positivo Avastin, respectivamente 5 μ g de CPII y Avastin se inyectaron intraocularmente durante 5 días consecutivos inmediatamente después de la irradiación con láser, se extrajeron los globos oculares 14 días después de la irradiación con láser y se tiñeron los vasos sanguíneos con FITC-dextrano, y se realizaron experimentos de montaje plano para medir el tamaño de la lesión de CNV.

Como resultado, como se muestra en la figura 11, el tamaño de la lesión del grupo tratado con CPII disminuyó significativamente más pequeño que el del grupo de control, y se confirmó que era similar al tamaño de la lesión del grupo de control positivo tratado con Avastin a la misma concentración.

<Ejemplo 9> Confirmación del efecto de inhibición del gen y la proteína de péptidos relacionados con la neovascularización

Después de 14 días de irradiación con láser en ratón, se extrajo el ARN de la retina y la coroides para analizar la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real.

Como resultado, como se muestra en la figura 12, la expresión de VEGF, que es un gen típico relacionado con la neovascularización, aumentó aproximadamente 55 veces en el grupo tratado con láser, pero disminuyó a un nivel similar al del grupo no tratado con láser en el grupo tratado con Avastin y grupo tratado con CPII.

Por otro lado, los genes ICAM y MCP-1 aumentaron aproximadamente 300 y 10 veces en el grupo tratado con láser, respectivamente, pero también disminuyeron significativamente en el grupo tratado con CPII.

Además, para evaluar el efecto de CPII sobre la expresión de los marcadores proteicos relacionados con la neovascularización, se extrajeron proteínas de la retina y la coroides después de 14 días de la irradiación con láser para realizar la inmunotransferencia de VEGF, VEGFR-1 (Flt -1), VEGFR-2 (Fik-1) y angiopoyetina 2.

Como resultado, como se muestra en la figura 13, se confirmó que la expresión de angiopoyetina 2 y VEGFR-1, -2, que son los factores promotores de la angiogénesis, se incrementó significativamente con la irradiación láser. Especialmente, la expresión de VEGF, que se sabe que juega el papel más importante en la neovascularización, aumentó notablemente. Sin embargo, en el grupo experimental tratado con CPII, la expresión de las proteínas anteriores se redujo notablemente y fue casi similar a la de Avastin, un remedio para la degeneración macular relacionada con la edad.

<Ejemplo 10> Confirmación del efecto de generación de lágrimas

El grado de generación de lágrimas se midió mediante hilos de algodón impregnados con rojo fenol.

Como resultado, como se muestra en la figura 15, se confirmó que la cantidad de lágrimas de los ratones NOD.B10.H2b disminuyó a un nivel significativo, aproximadamente 85,5 % por el estrés seco, en comparación con el grupo normal ($0,22 \pm 0,01 \mu\text{l}$) (grupo DS 10D, $0,03 \pm 0,01 \mu\text{l}$, $p < 0,05$). Por otro lado, en el grupo tratado con Hyp-GQDGLAGPK ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{l}$) luego de eliminar el estrés seco, la cantidad de lágrimas se incrementó 7,9 veces ($p < 0,05$) a los 10 días después del tratamiento y alrededor de 2,8 veces ($P < 0,05$) del grupo de control negativo tratado con solución salina normal ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{l}$) ($P < 0,05$) y alrededor de 1,7 veces ($p < 0,05$) del grupo de control positivo ($0,13 \pm 0,02 \mu\text{l}$) tratado con colágeno, respectivamente.

Además, en comparación con CsA (ciclosporina A; $0,13 \pm 0,02 \mu\text{l}$), DQS ($0,16 \pm 0,02 \mu\text{l}$) y HA (Hyaluni; $0,14 \pm 0,01 \mu\text{l}$) que son remedios para el ojo seco, la cantidad de lágrimas del grupo tratado con Hyp-GQDGLAGPK aumentaron 1,7 veces ($p < 0,05$), 1,4 veces ($p < 0,05$) y 1,6 veces ($p < 0,05$), respectivamente.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que Hyp-GQDGLAGPK recuperó la cantidad de lágrimas disminuida a un nivel más alto que el remedio para el ojo seco disponible comercialmente.

<Ejemplo 11> Confirmación de la capacidad de flexión de la superficie corneal

Se cuantificó el grado de curvatura de la córnea en cada grupo de experimentos para confirmar la capacidad de flexión de la superficie de la córnea.

Como resultado, como se muestra en la figura 16, se confirmó que el grado de curvatura de la superficie corneal de un ratón expuesto al estrés seco durante 10 días fue aproximadamente 13 veces ($4,33 \pm 0,58$ puntos; $p < 0,05$) mayor que el de las córneas normales ($0,33 \pm 0,58$ puntos). Por otro lado, la capacidad de flexión de la superficie corneal en el grupo tratado con Hyp-GQDGLAGPK ($2,0 \pm 0$ puntos) se redujo significativamente en un 53,8 % ($p < 0,05$) el día 10 después de la eliminación del estrés seco, que se reduce en 40 % ($p < 0,05$) del grupo de control negativo tratado con solución salina normal ($3,33 \pm 1,53$ puntos) y 45,5 % ($p < 0,05$) del grupo de control positivo tratado con colágeno ($3,67 \pm 1,16$ puntos).

Además, en comparación con los grupos tratados con CsA, DQS y HA ($3,33 \pm 0,58$ puntos; $3,0 \pm 1,0$ puntos; $3,0 \pm 0$ puntos) que son remedios para el ojo seco, se redujo el grado de curvatura de la superficie corneal en un 40 % ($p < 0,05$), 33,3 % ($p < 0,05$) y 33,3 % ($p < 0,05$), respectivamente.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que Hyp-GQDGLAGPK es más eficaz para mejorar la curvatura de la superficie corneal que el remedio para el ojo seco.

<Ejemplo 12> Confirmación del efecto de inhibición del desprendimiento de células epiteliales corneales

Para confirmar el efecto de los péptidos sobre el desprendimiento de células epiteliales de la córnea, se tiñeron con H&E córneas de ratón de cada grupo experimental.

Como resultado, como se muestra en la figura 17, el desprendimiento de células epiteliales de la córnea aumentó 24 veces ($2,29 \pm 0,57/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) por estrés seco. Por otro lado, el desprendimiento de células epiteliales corneales se redujo en un 83,3 % ($p < 0,05$) en el grupo tratado con Hyp-GQDGLAGPK ($0,38 \pm 0,17/0,1 \text{ mm}^2$) después de la eliminación del estrés seco. Además, el desprendimiento de células epiteliales corneales se redujo en un 71,4 % ($p < 0,05$) del grupo de control negativo tratado con solución salina normal ($1,33 \pm 0,17/0,1 \text{ mm}^2$) y un 55,6 % ($p < 0,05$) del grupo de control positivo tratado con colágeno ($0,86 \pm 0,29/0,1 \text{ mm}^2$).

Además, en comparación con los grupos tratados con CsA, DQS y HA que son remedios para el ojo seco ($1,52 \pm 0,33/0,1 \text{ mm}^2$; $0,095 \pm 0,17/0,1 \text{ mm}^2$; $1,71 \pm 0,17/0,1 \text{ mm}^2$), se redujo en 75 % ($p < 0,05$), 60 % ($p < 0,05$) y 77,8 % ($p < 0,05$), respectivamente.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que Hyp-GQDGLAGPK es más eficaz para reducir el desprendimiento de células epiteliales de la córnea que el remedio para el ojo seco.

<Ejemplo 13> Confirmación del efecto sobre la distribución de células caliciformes conjuntivales

Se observó la distribución de las células caliciformes conjuntivales según el colirio en ratones con ojo seco.

Como resultado, como se muestra en la figura 18, la célula caliciforme se redujo en un 58,2 % ($6,02 \pm 0,29/0,1 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$) en comparación con la conjuntiva normal ($14,38 \pm 0,44/0,1 \text{ mm}^2$) por estrés seco. Por otro lado, la célula caliciforme se recuperó 2,3 veces ($p < 0,05$) en el grupo tratado con Hyp-GQDGLAGPK ($13,9 \pm 0,83/0,1 \text{ mm}^2$) después de la eliminación del estrés seco, que se incrementa 2,6 veces ($p < 0,05$) del grupo de control negativo tratado con solución salina normal ($5,43 \pm 0,29/0,1 \text{ mm}^2$) y 1,3 veces ($p < 0,05$) del grupo de control positivo ($11,05 \pm 0,33/0,1 \text{ mm}^2$) tratado con colágeno, respectivamente.

Además, en comparación con los grupos tratados con CsA, DQS y HA que son remedios para el ojo seco ($11,14 \pm 0,76/0,1 \text{ mm}^2$; $8,86 \pm 0,29/0,1 \text{ mm}^2$; $8,67 \pm 0,17/0,1 \text{ mm}^2$), se recuperó 1,2 veces ($p < 0,05$), 1,5 veces ($p < 0,05$) y 1.6 veces ($p < 0,05$), respectivamente.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que Hyp-GQDGLAGPK es más eficaz para reducir el desprendimiento de células epiteliales corneales que el remedio para el ojo seco.

5 A partir de los resultados anteriores, la distribución de células caliciformes en la conjuntiva mejoró en los grupos de tratamiento restantes excepto en el grupo tratado con solución salina normal, pero se confirmó que aumentó significativamente en la córnea del animal tratado con Hyp-GQDGLAGPK.

<Ejemplo 14> Confirmación de efectos antiinflamatorios en modelo de ratón con ojo seco

Se realizó inmunotinción de TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 y MMP-9 en la glándula lagrimal para evaluar el efecto de Hyp-GQDGLAGPK sobre la expresión de factores de respuesta inflamatoria en modelos de ratón con ojo seco.

10 Como resultado, como se muestra en la figura 19, la expresión de las citocinas inflamatorias TNF- α y las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 aumentaron notablemente en la glándula lagrimal por el estrés seco, MMP-2 y MMP-9 de la glándula lagrimal también aumentaron significativamente por el estrés seco. Sin embargo, en la glándula lagrimal del modelo de ratón tratado con Hyp-GQDGLAGPK, la expresión de los factores relacionados con la inflamación se redujo notablemente y se confirmó que estaba significativamente inhibida en comparación con los
15 modelos de ratón tratados con CsA, DQS y HA, que son remedios de ojo seco.

<110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Péptidos derivados de la matriz extracelular de condrocitos

<130> ADP-2016-0100

<160> 1

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Hidroxi prolina-GQDGLAGPK

<400> 1

Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys
1 5 10

<110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

30 <120> péptidos derivados de la matriz extracelular de condrocitos

<130> ADP-2016-0100

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

35 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hidroxi prolina-GQDGLAGPK

40 <400> 1

ES 2 819 030 T3

Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys
1 5 10

<110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> péptidos derivados de la matriz extracelular de condrocitos

<130> OP-2018-0038

5 <160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hidroxi prolina-GQDGLAGPK

<400> 1

Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys
1 5 10

15 <210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador directo VEGF

<400> 2

atgaacttc tgctgtcttg ggtg 24

<210> 3

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso VEGF

<400> 3

30 tcaccgcctc ggctgtcac a 21

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo ICAM
 <400> 4
 tgcgttttgg agctagcgga cca 23
 5 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador inverso ICAM
 <400> 5
 cgaggacat acagcacgtg ccag 24
 <210> 6
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo MCP-1
 <400> 6
 20 tggcaagatg atcccaatga 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador inverso MCP-1
 <400> 7
 gcagcactgt tcgtcacttc a 21
 <210> 8
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo GAPDH
 35 <400> 8
 atgggaagg tcggtgtaa c 21

ES 2 819 030 T3

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador inverso GAPDH

<400> 9

gtgccgttga attgccgtg a 21

<110> INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

10 <120> Péptidos derivados de la matriz extracelular de condrocitos

<130> ADP-2016-0100

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hidroxi prolina-GQDGLAGPK

20 <400> 1

Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly Pro Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que un primer aminoácido es hidroxiprolina (Hyp).
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que el péptido se deriva del colágeno tipo II $\alpha 1$.
- 5 4. El péptido de la reivindicación 3, en el que el colágeno tipo II $\alpha 1$ se aísla de una matriz extracelular derivada de condrocitos de animales.
5. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular, que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.
- 10 6. La composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular de la reivindicación 5, en la que la enfermedad de la superficie ocular es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en opacidad corneal, neovascularización corneal, inflamación corneal y fibrosis corneal.
7. La composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular de la reivindicación 5, en la que el péptido se deriva del colágeno tipo II $\alpha 1$ aislado de una matriz extracelular derivada de condrocitos (CDEM).
- 15 8. La composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular de la reivindicación 5, en la que el péptido está contenido en una cantidad de 0,1 a 50 partes en peso en base a 100 partes en peso de la cantidad total de la composición farmacéutica.
- 20 9. La composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad de la superficie ocular de la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica es una formulación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en colirios, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.
10. Un alimento saludable para prevenir o mejorar una enfermedad de la superficie ocular que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.
- 25 11. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.
12. La composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco de la reivindicación 11, en la que el péptido se deriva del colágeno tipo II $\alpha 1$.
- 30 13. La composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco de la reivindicación 11, en la que el péptido recupera la disminución de la producción de lágrimas y el desequilibrio de la superficie corneal debido al estrés seco e inhibe la descamación de las células epiteliales corneales y la producción de factores inflamatorios.
14. La composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco de la reivindicación 11, en la que el péptido está contenido en una cantidad de 0,1 a 50 partes en peso en base a 100 partes en peso de la cantidad total de la composición farmacéutica.
- 35 15. La composición farmacéutica para prevenir o tratar el ojo seco de la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica es una formulación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en colirios, inyecciones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, geles, jarabes, suspensiones, emulsiones, gotas y líquidos.
16. Un alimento saludable para prevenir o mejorar el ojo seco que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, como ingrediente activo.

[FIG 1]

Certificado de Análisis

BIOCELTRAN

RM# 304, BIO2. Bldg., 32, Soyanggang-ro, Chucheon-si, Gangwon-Do, Corea del sur

TEL: 033-258-6780 FAX: 033-258-6781 E-MAIL: sales@bioceltran.com

Nombre de producto		Péptido del colágeno tipo II α	
Peso molecular		954,99	
Lote No.	CT160104	Cantidad	3g
Secuencia		Hyp GQ DG LAGPK (Hyp=Hidroxi prolina)	
PRUEBA		ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Apariencia		Polvo de color blanco	Polvo de color blanco
IDENTIFICACIÓN	A. Identificación por HPLC	El tiempo de retención es el mismo que con la sustancia de referencia	Cumple
	B. Masa de iones moleculares	954,99 \pm 1	Cumple
Pureza (HPLC)		NLT 99%	99,5%
Sustancias relacionadas (HPLC)		Impurezas totales: NMT1,0% Impurezas individuales: NMT1,0%	Impurezas totales: 0,5% Impurezas individuales: 0,46%
Almacenamiento		Conservar en recipientes herméticos. Almacenar a una temperatura de 2 a 8°C.	
Conclusión: Este lote de producto cumple con el estándar interno			

Observación: este péptido se preparó mediante síntesis química

Fecha de Control de Calidad: 04 de enero de 2016

Garantía de calidad por: Ji An Kim

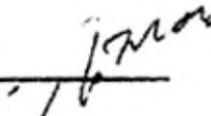
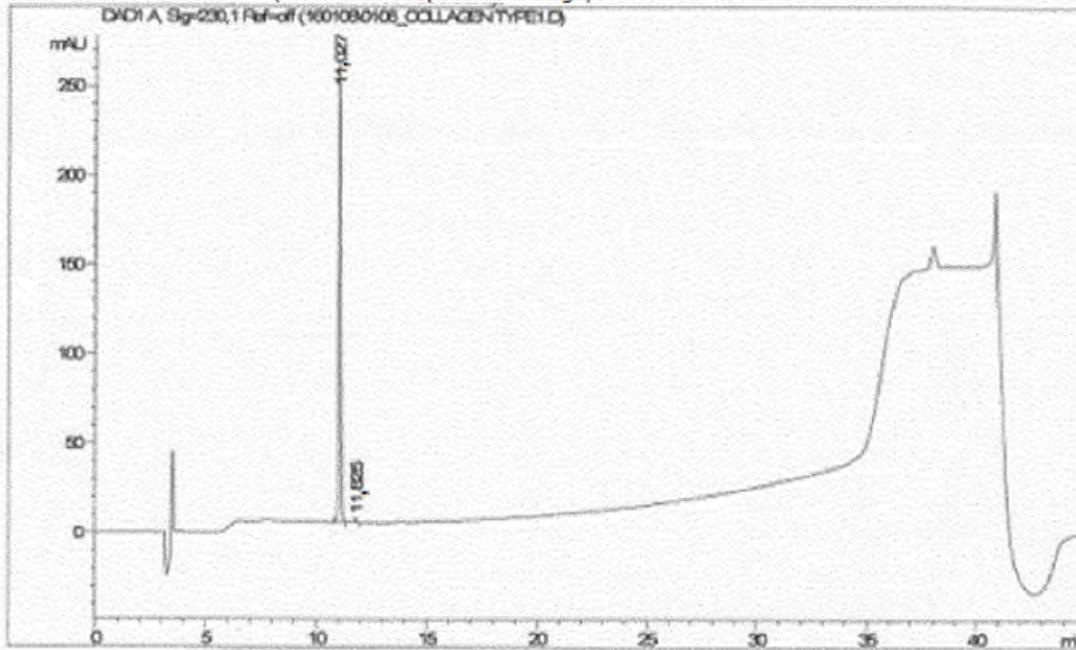


FIG. 2

Archivo de datos C:\CHEM32\1\DATA\160108\0108_COLLAGEN TYPE1.D
 Nombre de la muestra: Tipo de colágeno

Operador Adq. : Kja
 Instrumento Adq. : Instrumento 1
 Fecha de inyección : 2016-01-08 4:10:43 오후
 Procedimiento Adq : C:\CHEM32\1\METHODS\20151001.M
 Último cambio : 2016-01-08 3:19:37 오후 por Kja
 Procedimiento de análisis: C:\CHEM32\1\METHODS\20151001.M
 Último cambio : 2016-01-12 9:02:49 오후 por Kja
 (modificado después de la carga)

Línea de Sec: 2
 Ubicación : Vial 2
 Iny : 1
 Volumen iny : 20 µl



Información de fracción

Recogida de fracciones desactivada

No. Fracciones encontradas

Informe de porcentaje de área

Ordenado por : Señal
 Multiplicador : 1,0000
 Dilución : 1,0000
 Usar multiplicador y factor de dilución con ISTD

Señal 1 : DATA, Sig=230,1 Ref=off

Pico #	Tiempo Ret [min]	Tipo	Ancho [min]	Área [mAU*s]	Altura [mAU]	Área %
1	11,027	BB	0,0951	1614,60083	257,84872	99,3774
2	11,825	BB	0,0769	10,11574	2,07234	0,6226

Totales : 1624,71657 259,92106

*** Fin del informe ***

FIG. 3

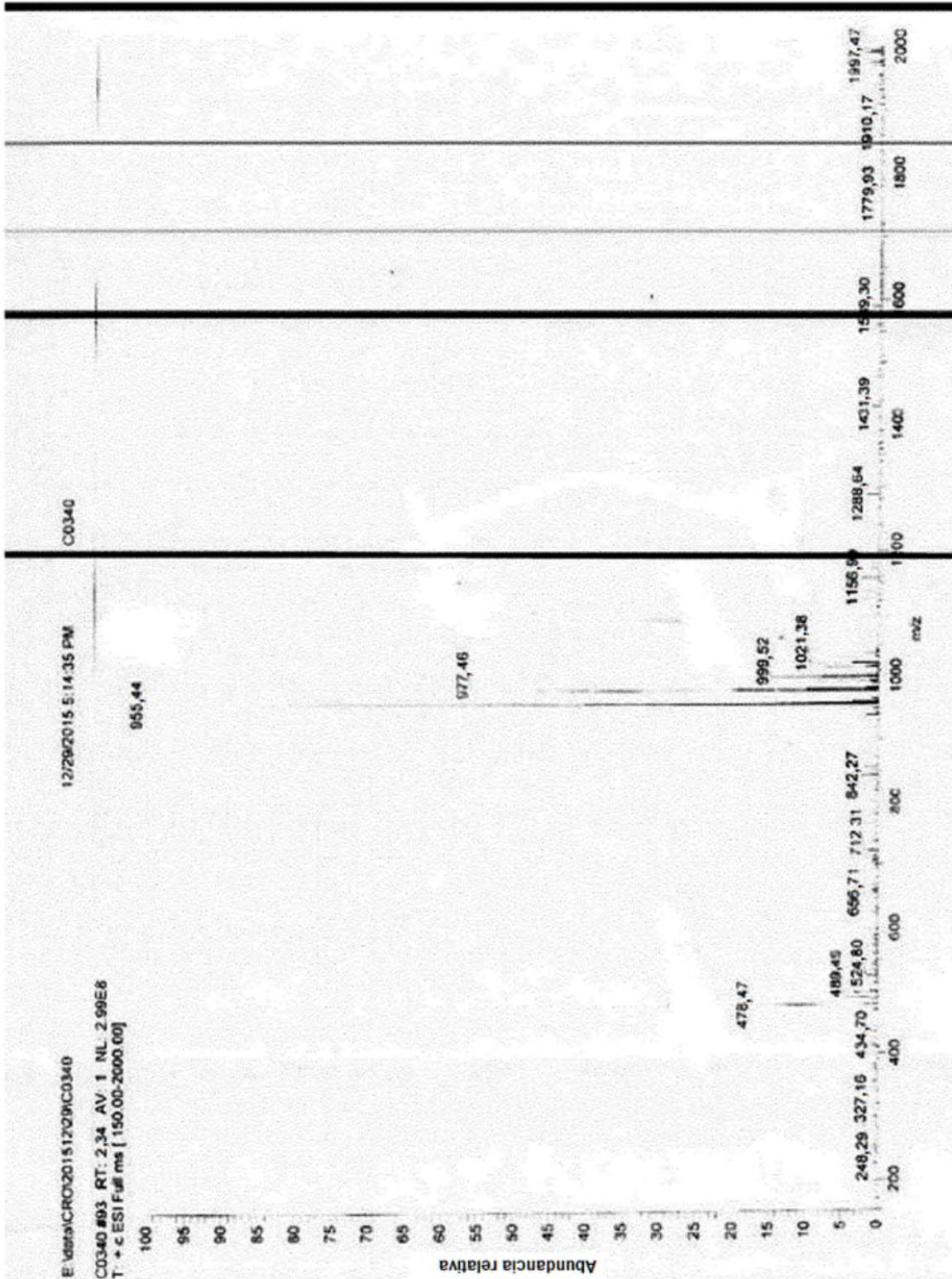


FIG. 4

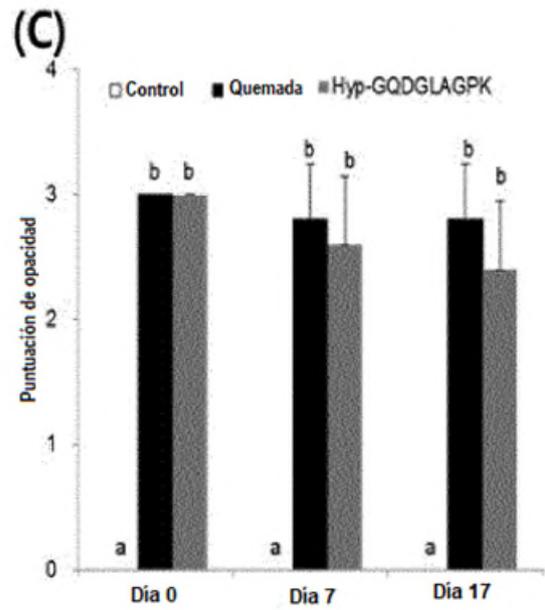
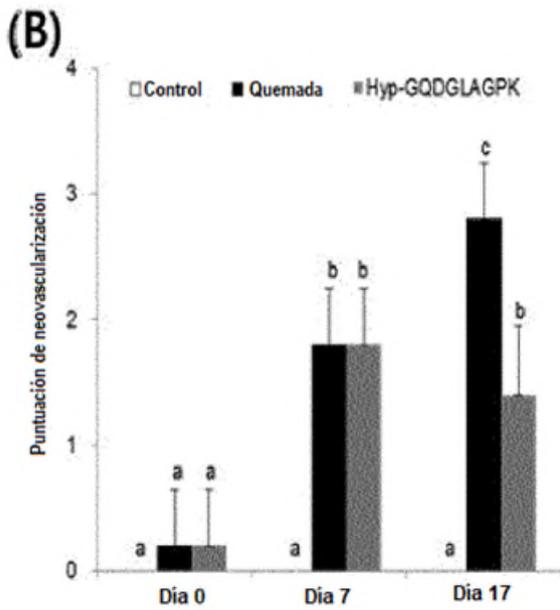
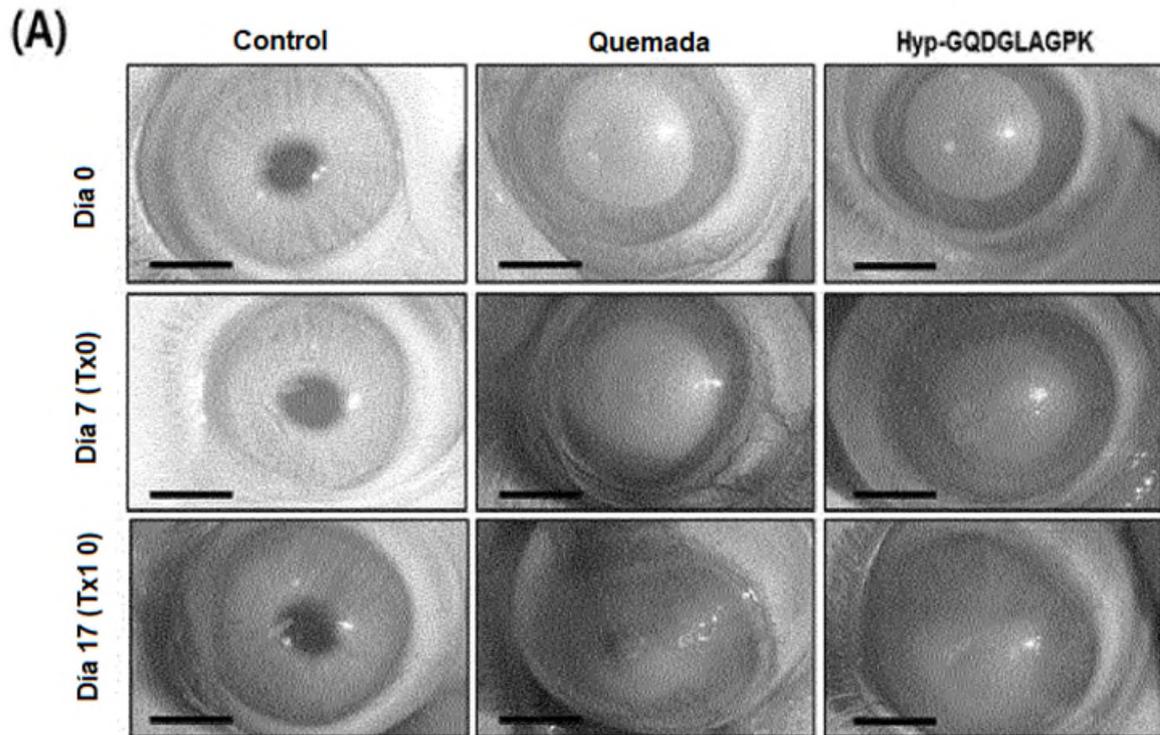


FIG. 5

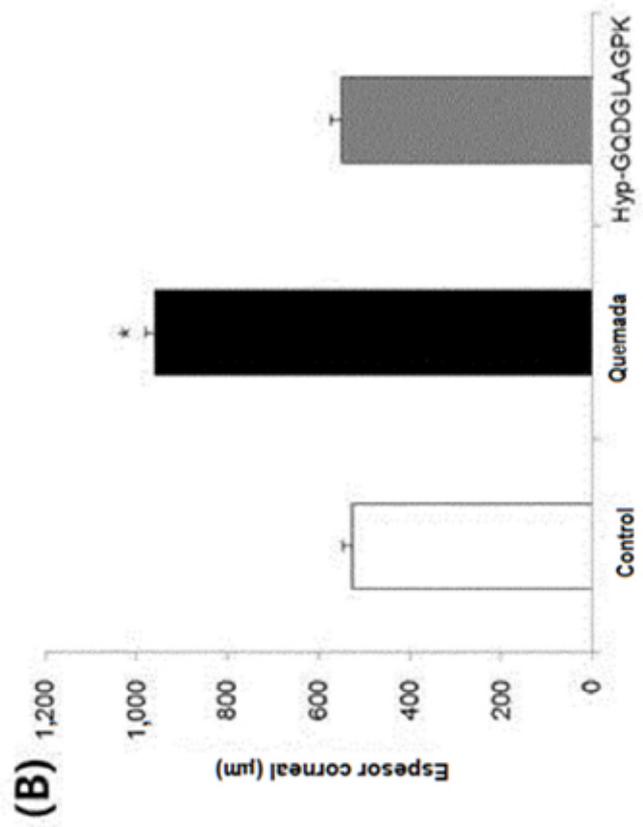
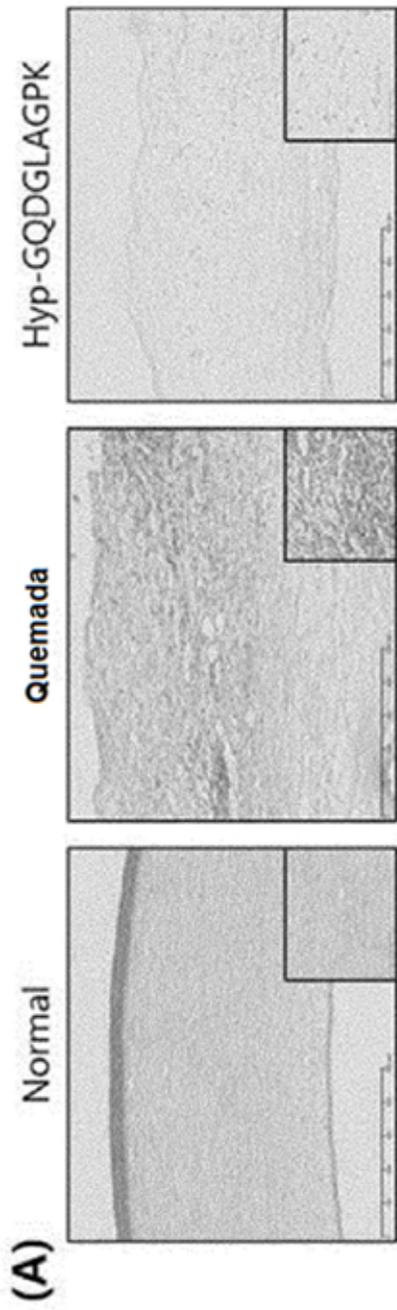


FIG 6

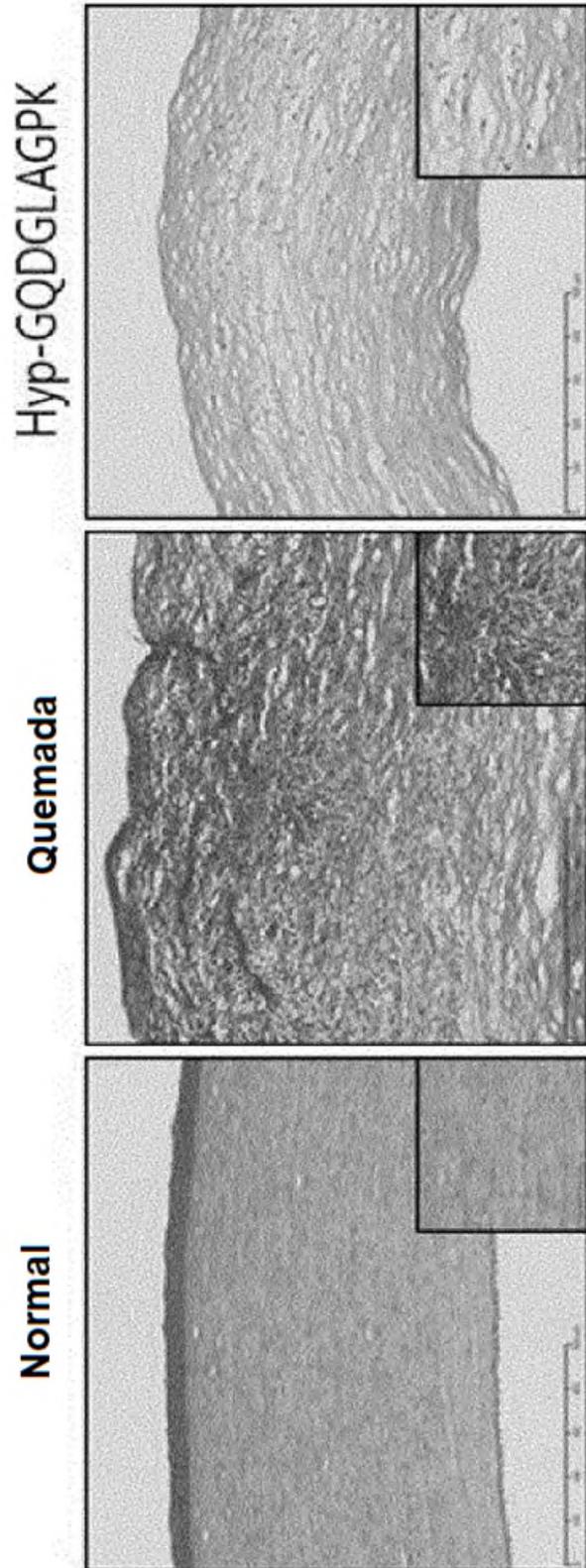
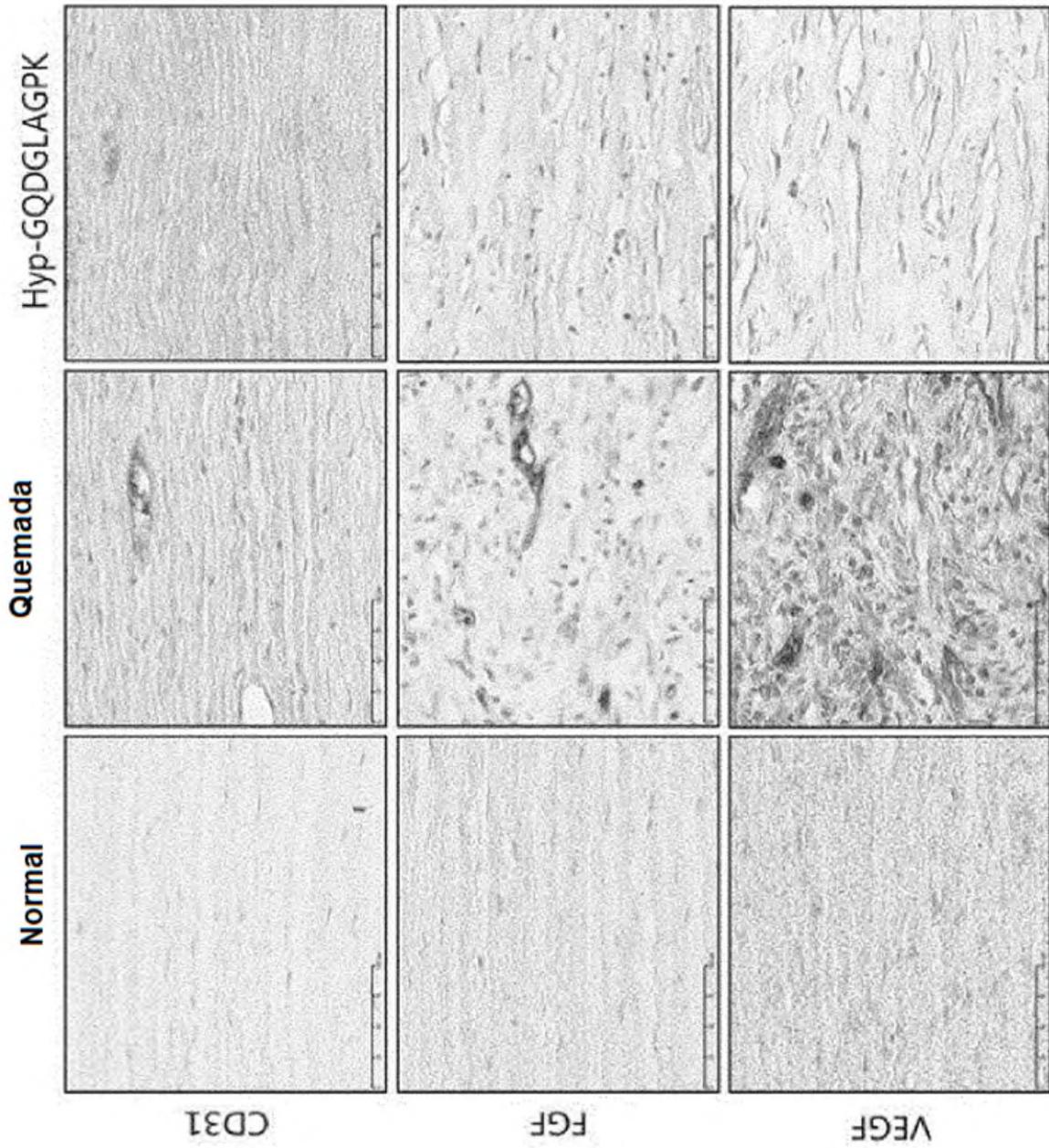


FIG. 7



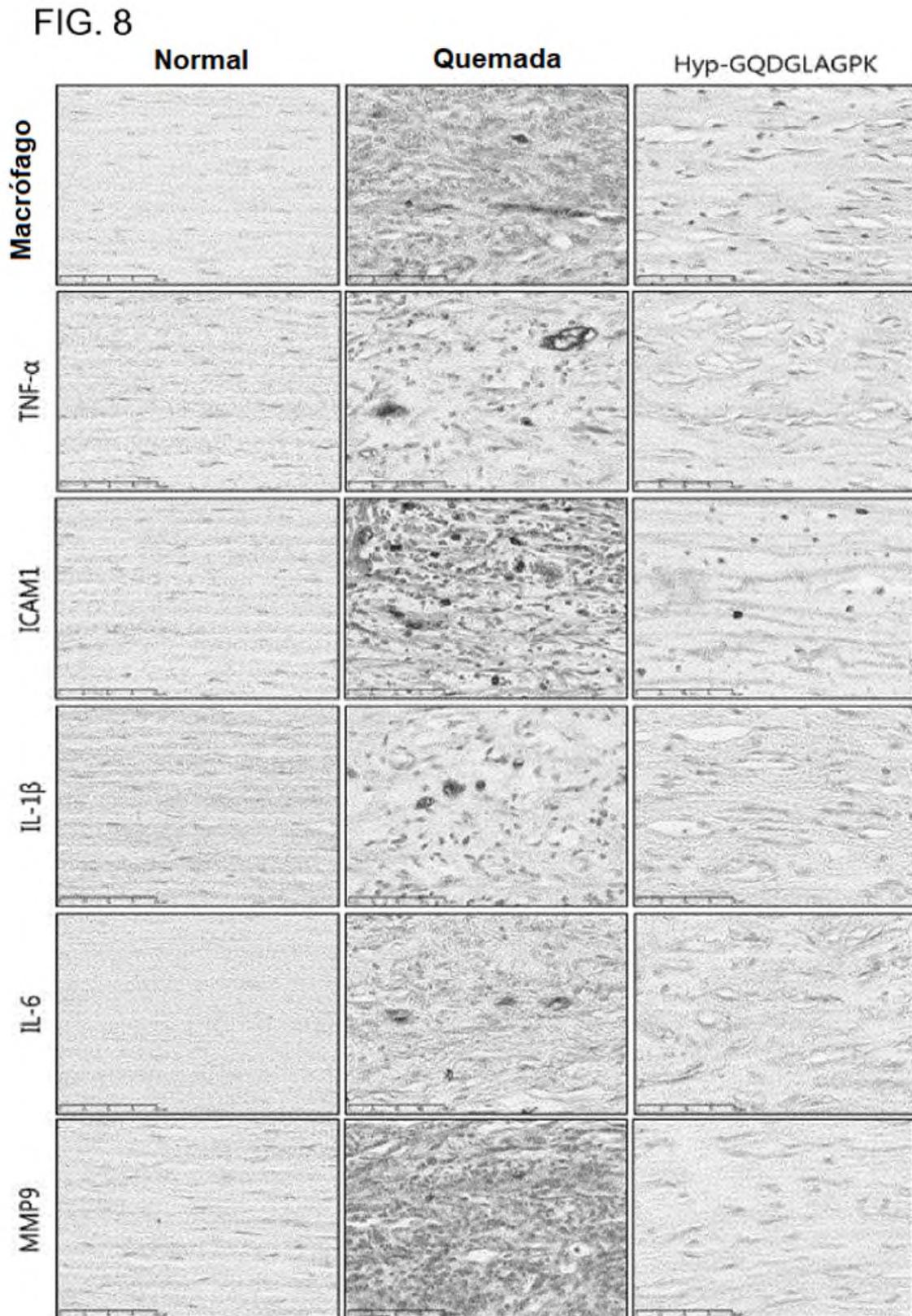


FIG. 9

Control		VEGF (50ng/ml)		Avastin (0,2mg/ml)	
VEGF (50ng/ml)		*	*	*	
Colágeno de cerdo (%)		0,01	0,05	0,1	
Péptido de colágeno tipo I (µg/ml)		1	10	100	
Péptido de colágeno tipo II (µg/ml)		1	10	100	

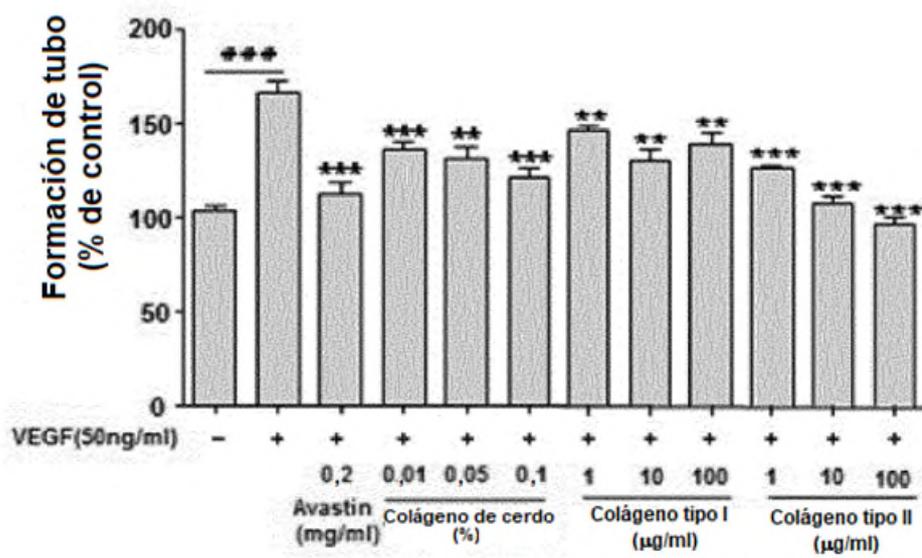


FIG. 10

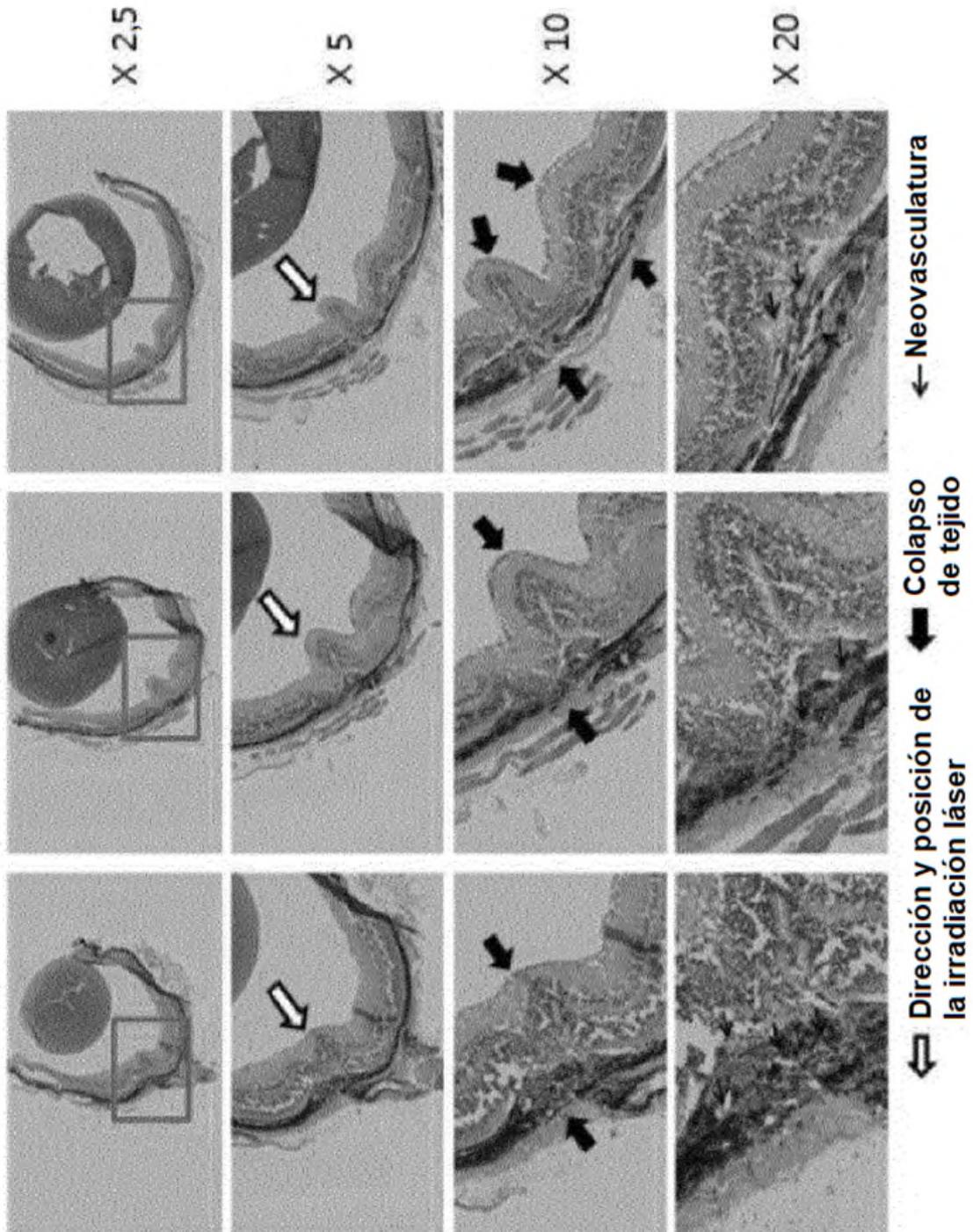


FIG. 11

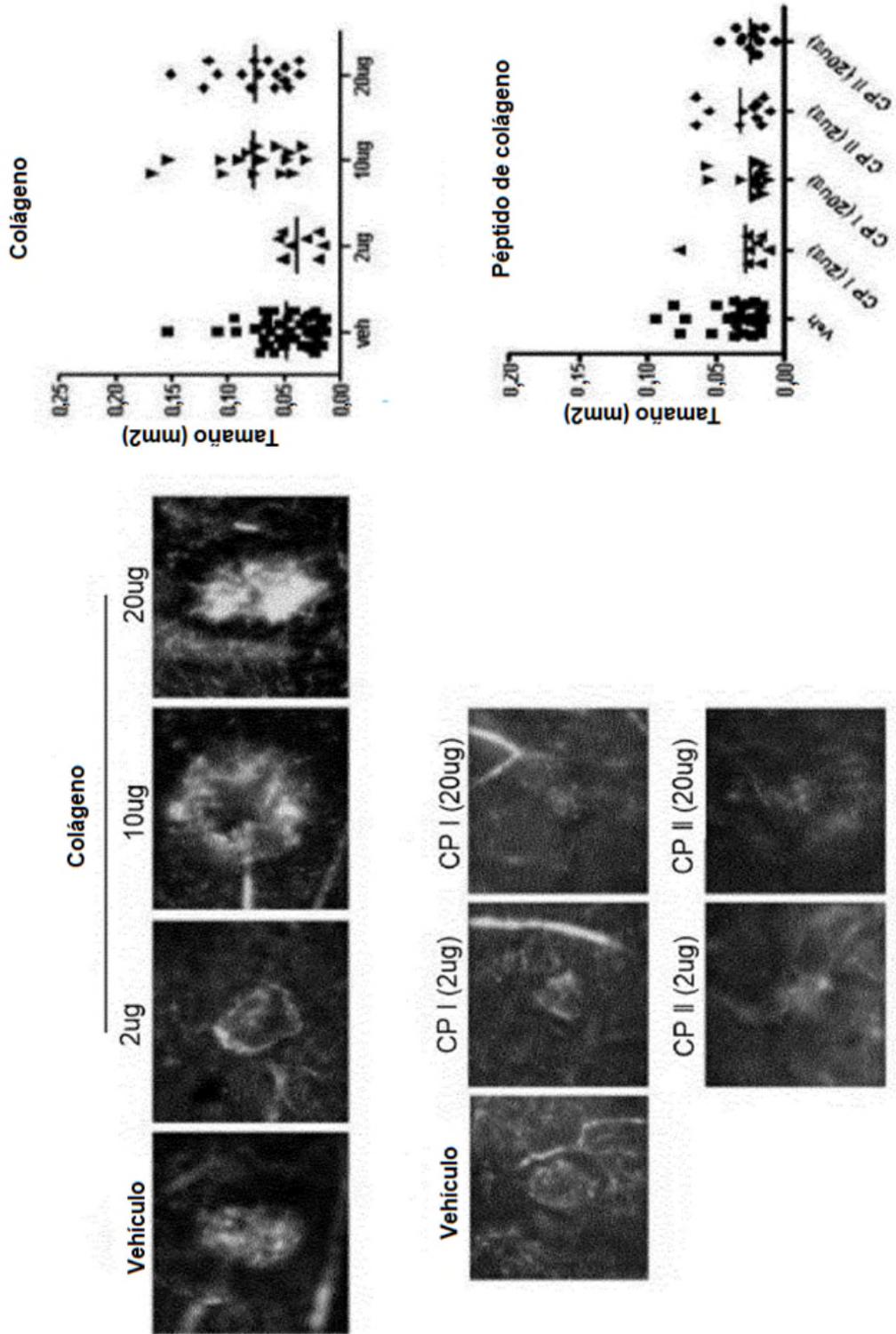


FIG. 12

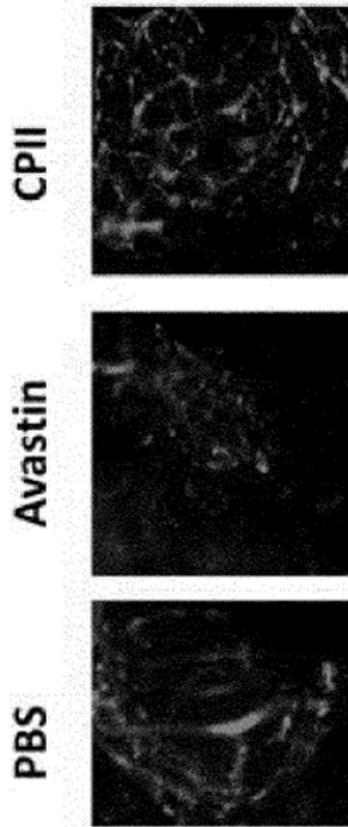
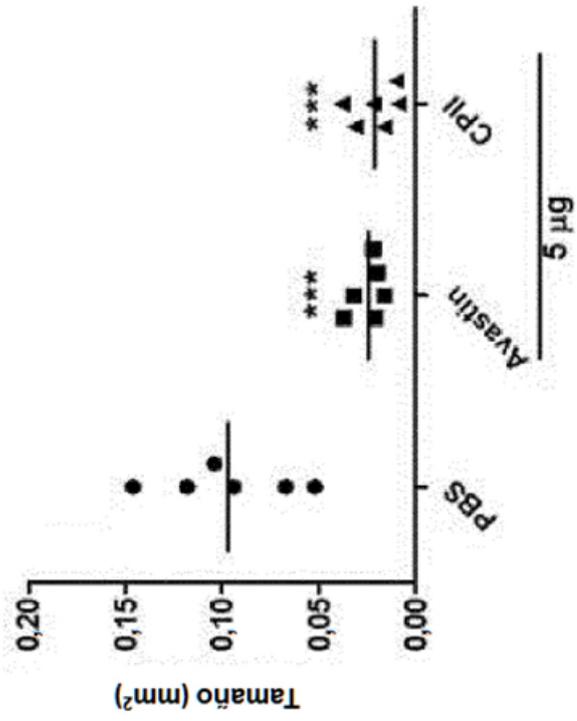


FIG. 13

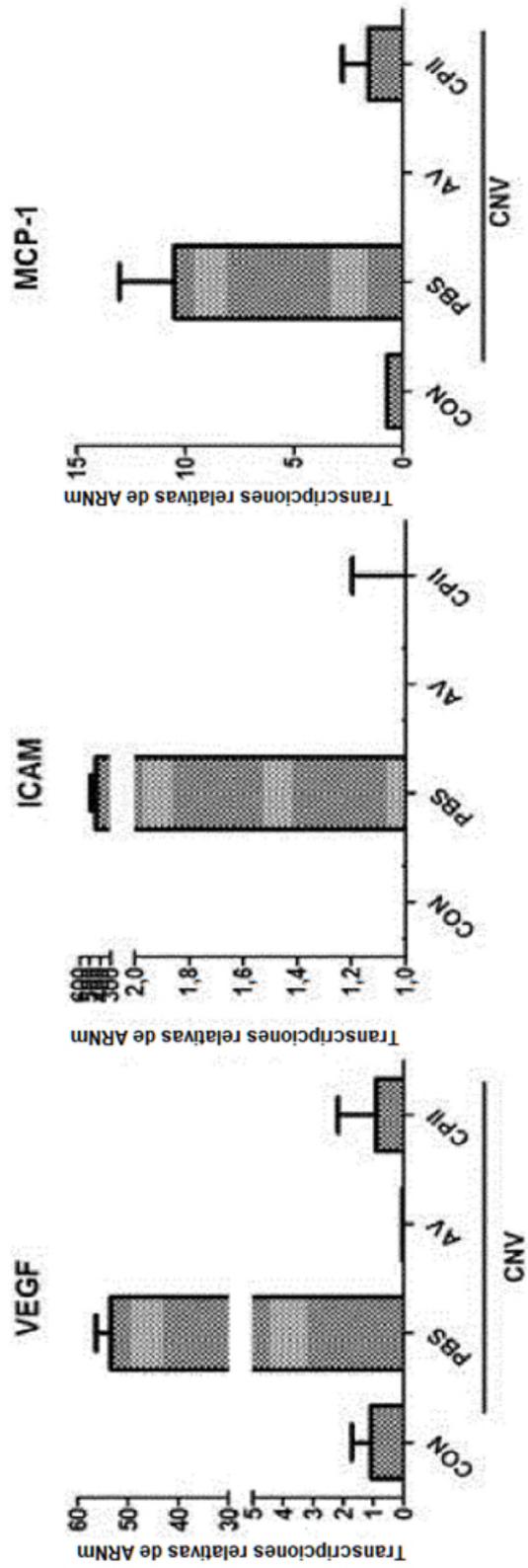


FIG. 14

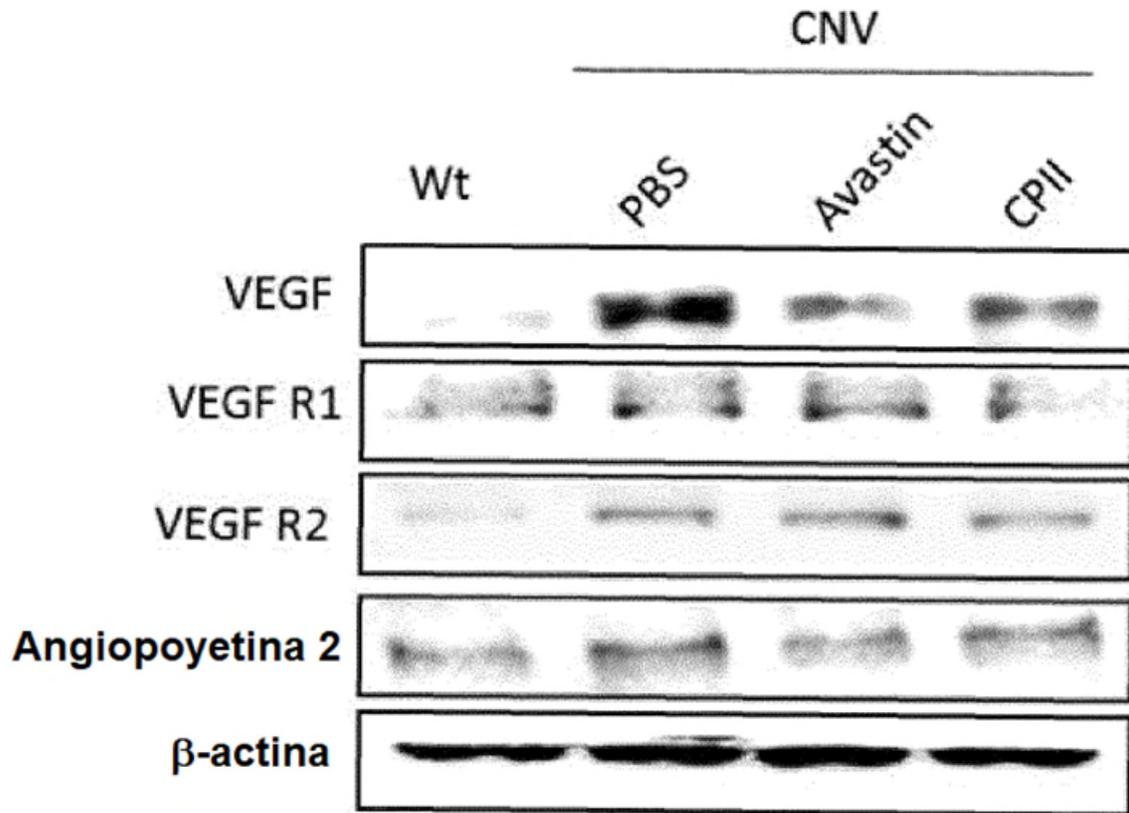


FIG. 15

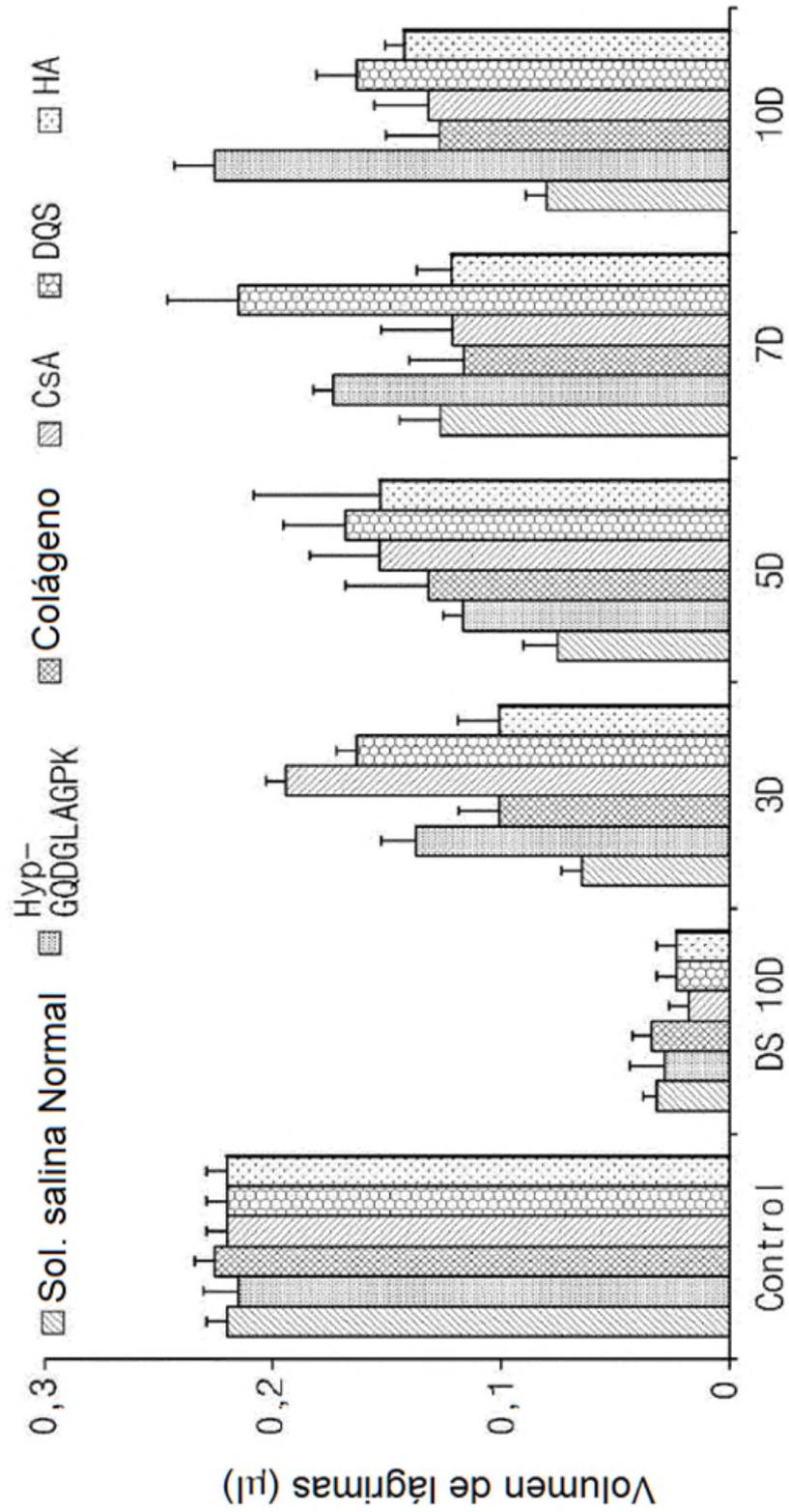


FIG. 16

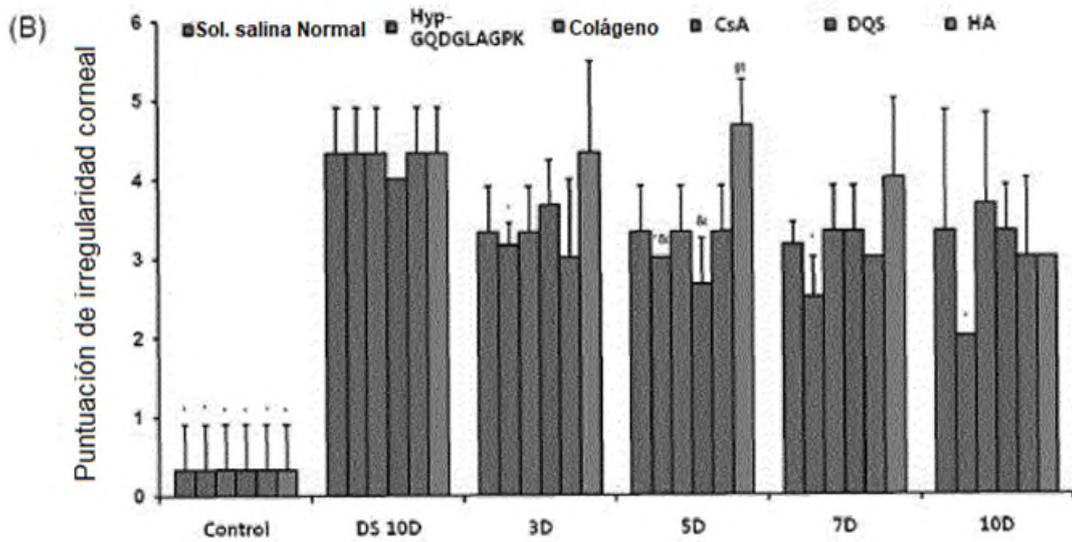
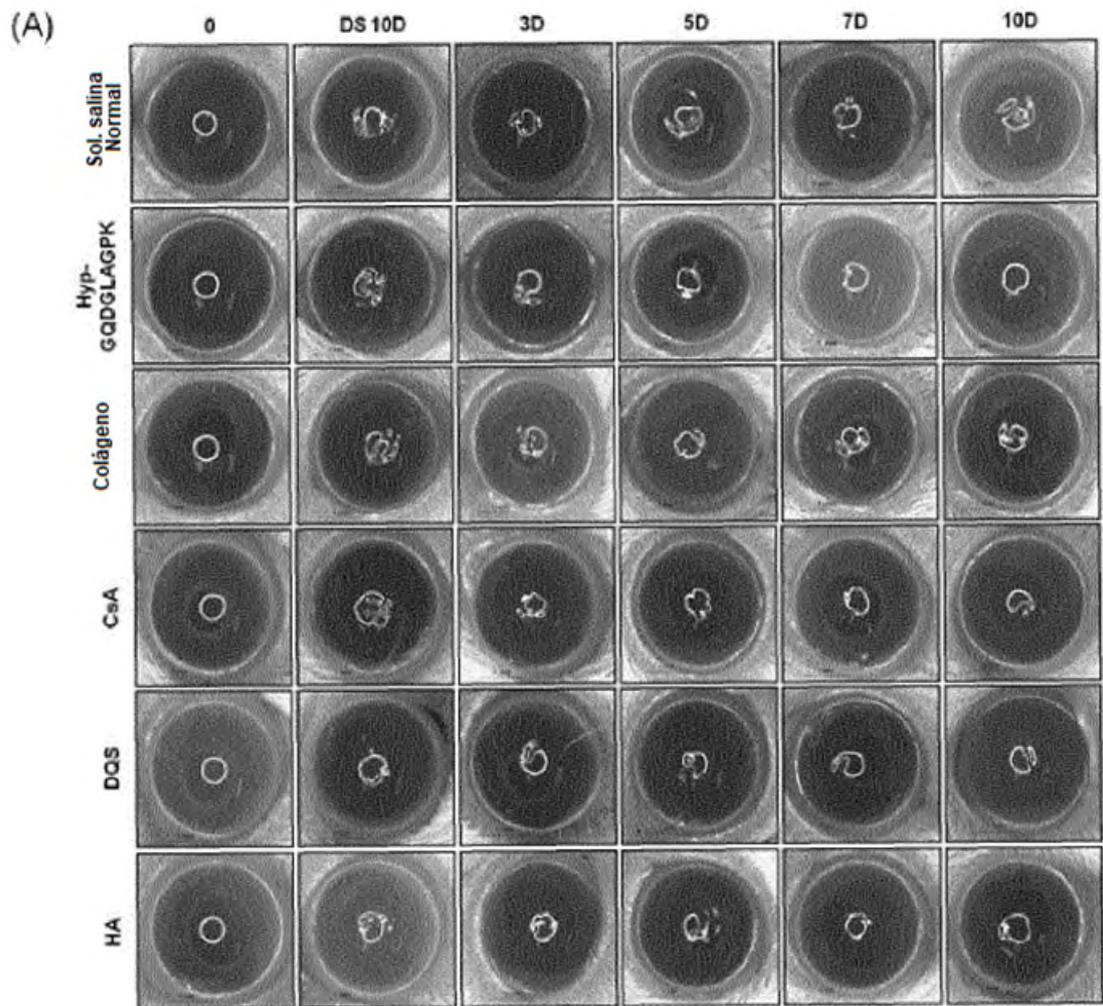


FIG. 17

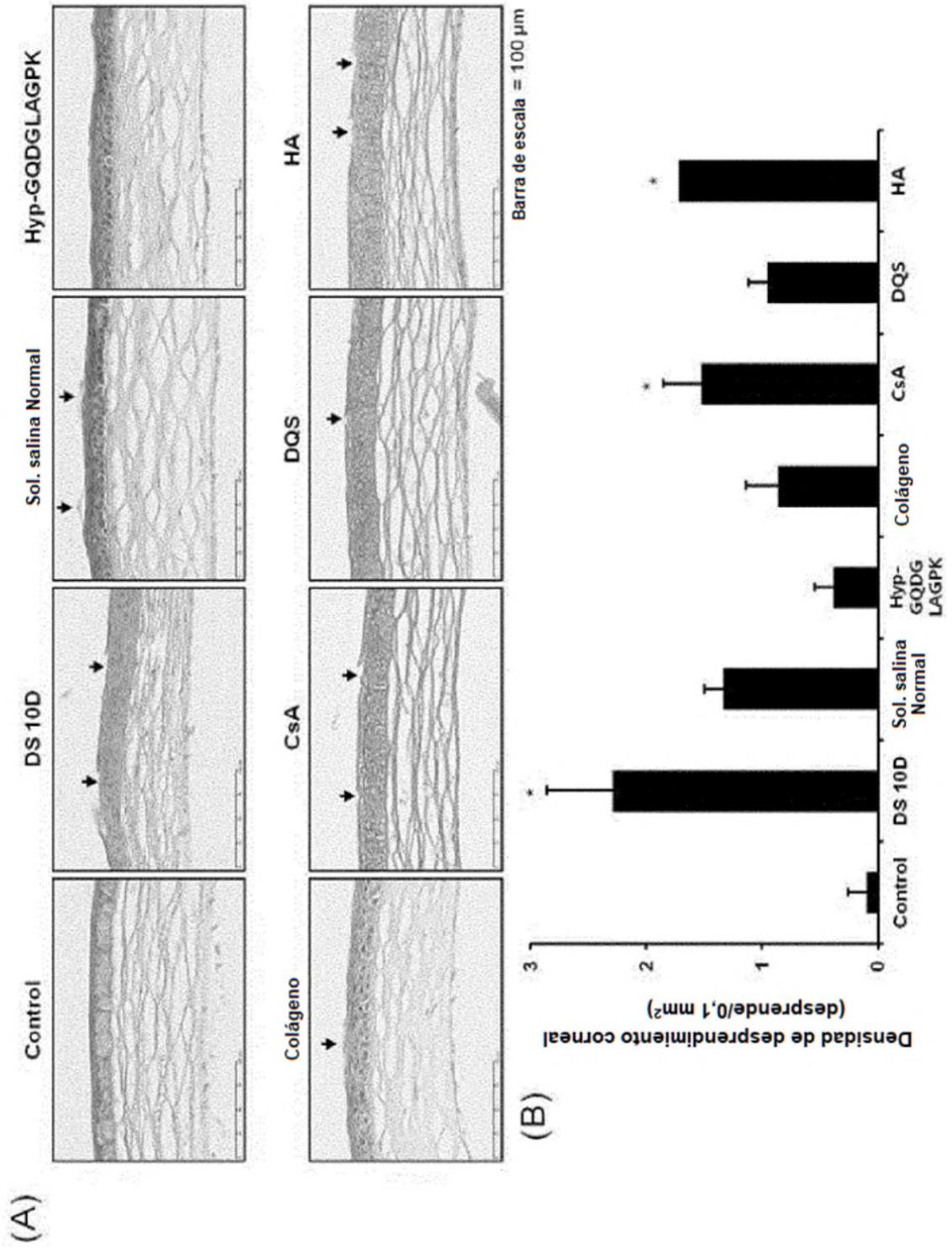


FIG. 18

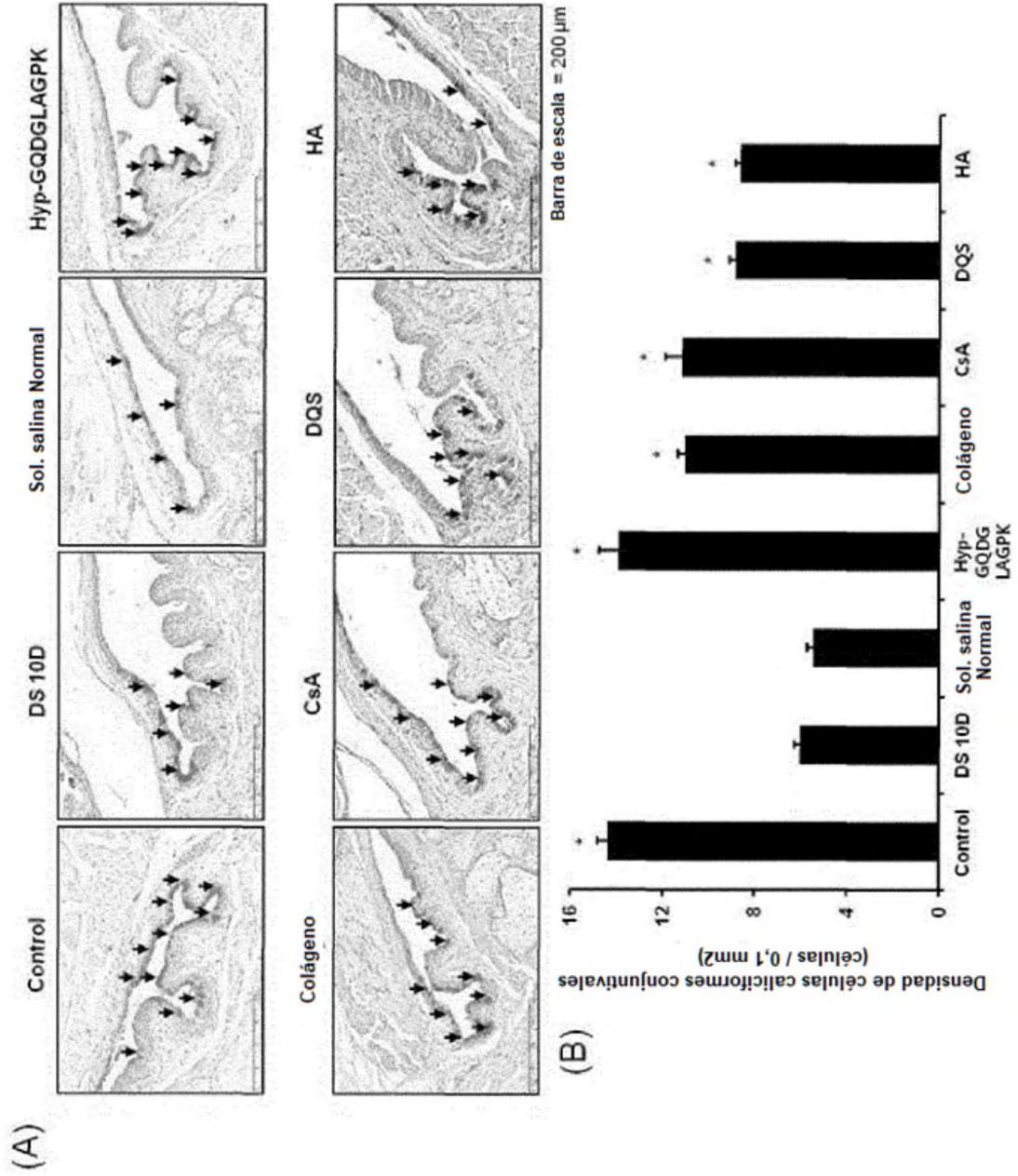


FIG. 19

