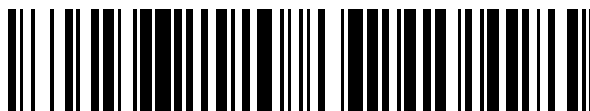


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 633**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2010 E 10812524 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2470191**

54 Título: **Métodos y composiciones para prevenir o tratar condiciones oftálmicas**

30 Prioridad:

24.08.2009 US 236440 P

28.08.2009 US 237745 P

26.05.2010 US 348470 P

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

22.08.2014

73 Titular/es:

STEALTH PEPTIDES INTERNATIONAL, INC.

(100.0%)

2nd Floor Le Prince de Galles 3-5 Avenue des

Citronniers

98000 Monaco, MC

72 Inventor/es:

LIU, LIPING;

TANG, SHIBO y

LIANG, XIAOLING

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 487 633 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

Métodos y composiciones para prevenir o tratar condiciones oftálmicas

Referencia cruzada con aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad con U.S. Provisional Application No. 61/236,440, archivada el 24 de agosto, 2009; U.S. Provisional Application No. 61/237,745, archivada el 28 de agosto, 2009; y U.S. Provisional Application No. 61/348,470, archivada 26 de Mayo 2010.

Campo técnico

10 La presente tecnología se relaciona generalmente con las composiciones y métodos de prevención o tratamiento de condiciones o enfermedades oftalmológicas. En particular, la presente tecnología se relaciona con la administración de péptidos catiónicos aromáticos en cantidades efectivas para prevenir o tratar condiciones o enfermedades oftalmológicas, por ejemplo, retinopatía diabética, cataratas, retinitis pigmentosa, glaucoma, neovascularización coroidea, y retinopatía inducida por el oxígeno, en sujetos mamíferos.

Antecedentes

15 La siguiente descripción se provee para ayudar al entendimiento del lector. Nada de la información proporcionada o las referencias citadas se admite por ser técnica anterior a la presente invención.

20 Las enfermedades y condiciones degenerativas del nervio óptico y la retina son las principales causas de ceguera en el mundo. Una condición degenerativa significativa de la retina es la degeneración macular relacionada con la edad (ARMD). La ARMD es la causa más común de ceguera en personas mayores de 50 en los EE. UU., y su prevalencia aumenta con la edad. ARMD se clasifica como húmeda (neovascular) o seca (no-neovascular); la forma seca de la enfermedad es más común. La degeneración macular se ha ido distorsionando y atenuando por lo general se asocia con la edad pero también se caracteriza por inflamación intra-ocular y angiogénesis (solamente ARMD húmeda) y/o infección intra-ocular. La posterior generación de radicales libre, lo que resulta en el daño tisular oxidativo, inflamación local y producción de factores de crecimiento (tales como VEGF y FGF) y mediadores inflamatorios, conduce a la neovascularización inapropiada en común con la forma húmeda de ARMD.

25 La retinopatía es la principal causa de ceguera en la diabetes de tipo I, y también es común en la diabetes de tipo II. El grado de retinopatía depende de la duración de la diabetes, y generalmente comienza a producirse diez o más años después del inicio de la diabetes. La retinopatía diabética se puede clasificar como no-proliferativa, donde la retinopatía se caracteriza por el aumento de la permeabilidad capilar, edema y exudados, o proliferativa, cuando la retinopatía se caracteriza por neovascularización que se extiende desde la retina al vítreo, cicatrices, depósito de tejido fibroso y la posibilidad de desprendimiento de la retina. La retinopatía diabética se cree que es causada por el desarrollo de proteínas glicosiladas debido al elevado nivel de glucosa en sangre. Varias otras retinopatías menos comunes incluyen membrana neovascular coroidea (CNVM), edema macular quístico (CME), membrana epiretinal (ERM) y el agujero macular.

30

35 El glaucoma se compone de una colección de enfermedades oculares que causan pérdida de visión por el daño del nervio óptico. La presión intraocular elevada (IOP) debido al drenaje ocular inadecuado es la causa primaria del glaucoma. Con frecuencia el glaucoma se desarrolla según el ojo envejece, o esto puede ocurrir como el resultado de una lesión ocular, inflamación, tumor o en casos avanzados de cataratas o diabetes. También se puede causar por el aumento de IOP causado por el tratamiento con esteroides. Las terapias de fármacos que se han demostrado por ser efectivas en el glaucoma reducen la IOP, ya sea disminuyendo la producción de humor vítreo o facilitando el drenaje ocular. Con frecuencia, tales agentes son vasodilatores y como tal actúan sobre el sistema nervioso simpático e incluyen antagonistas adrenérgicos.

40

Resumen

45 La presente tecnología se relaciona generalmente con el tratamiento o prevención de condiciones o enfermedades oftalmológicas en mamíferos mediante la administración de cantidades efectivas terapéuticamente de los péptidos catiónicos aromáticos a sujetos necesitados de los mismos.

La invención se define en las reivindicaciones y se dirige a un péptido representado por la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg- Phe-Lys-NH₂ para utilizar en el tratamiento o la prevención de una condición oftalmológica en donde la condición oftalmológica se selecciona del grupo que consiste de: retinitis pigmentosa, neovascularización coroidea, y retinopatía inducida por el oxígeno..

Se describe un método de tratamiento o prevención de una condición oftalmológica en un sujeto mamífero necesitado de este, el método que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. La condición oftalmológica se puede seleccionar del grupo que consiste de: retinopatía diabética, cataratas, retinitis pigmentosa, glaucoma, degeneración macular, neovascularización coroidea, degeneración de la retina, y retinopatía inducida por el oxígeno.

También se describe un método de tratamiento o prevención de condiciones oftalmológicas en un sujeto mamífero, que comprende la administración a dicho sujeto mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido catiónico aromático. En algunas modalidades, el péptido catiónico aromático es un péptido que tiene:

al menos una carga positiva neta;

10 un mínimo de cuatro aminoácidos;

un máximo de aproximadamente veinte aminoácidos;

una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) en donde $3p_m$ es el número más amplio que es menor o igual a $r + 1$; y una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) en donde $2a$ es el número más amplio que es menor o igual a $p_t + 1$, excepto que cuando a es 1, p_t también puede ser 1. En modalidades particulares, el sujeto mamífero es un ser humano.

15 $2p_m$ puede ser el número más amplio que es menor o igual a $r+1$, y puede ser igual a p_t . El péptido catiónico aromático puede ser un péptido soluble en agua que tiene un mínimo de dos o un mínimo de tres cargas positivas.

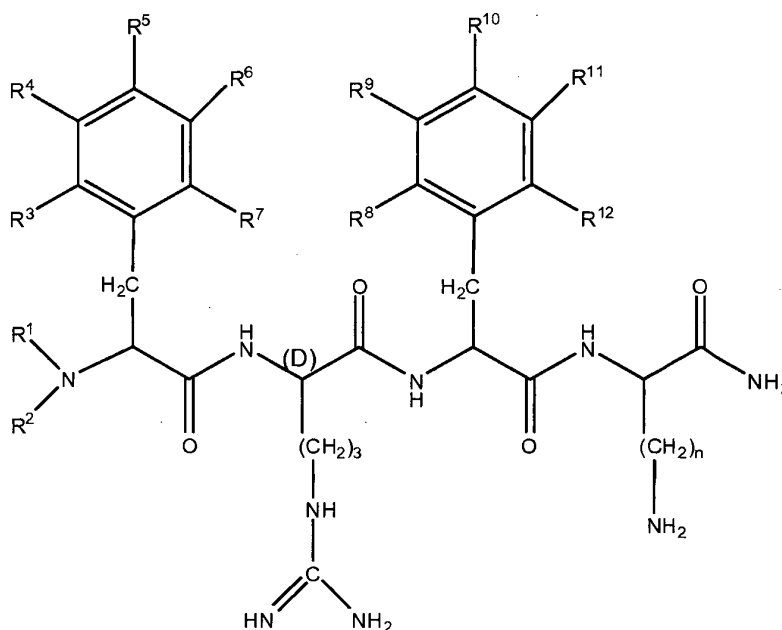
$2p_m$ puede ser el número más amplio que es menor o igual a $r+1$, y puede ser igual a p_t . El péptido catiónico aromático puede ser un péptido soluble en agua que tiene un mínimo de dos o un mínimo de tres cargas positivas.

20 El péptido descrito en este documento puede comprender uno o más aminoácidos de origen no natural, por ejemplo, uno o más D-aminoácidos. En algunas modalidades, el grupo carboxilo C-terminal del aminoácido en el terminal C es amidado. En ciertas modalidades, el péptido tiene un mínimo de cuatro aminoácidos. El péptido puede tener un máximo de aproximadamente 6, un máximo de aproximadamente 9, o un máximo de aproximadamente 12 aminoácidos.

En una modalidad descrita en este documento, el péptido puede tener la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) o 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En una modalidad particular, el péptido catiónico aromático tiene la fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (denominado indistintamente como SS-31, MTP-131, o Bendavia™).

25 En una modalidad descrita en este documento, el péptido se define por la fórmula I:

En una modalidad descrita en este documento, el péptido se define por la fórmula I:

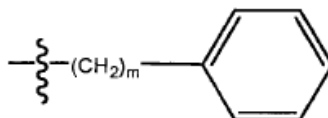


en donde R¹ y R² cada uno se selecciona independientemente de

30 (i) hidrógeno;

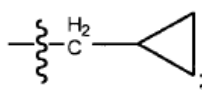
(ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;

(iii)

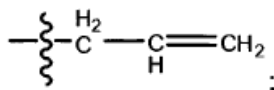


donde m = 1-3;

5 (iv)



(v)



R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² cada uno se selecciona independientemente de

10 (i) hidrógeno;

(ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;

(iii) alcoxi C₁-C₆;

(iv) amino;

(v) alquilamino C₁-C₄;

15 (vi) dialquilamino C₁-C₄;

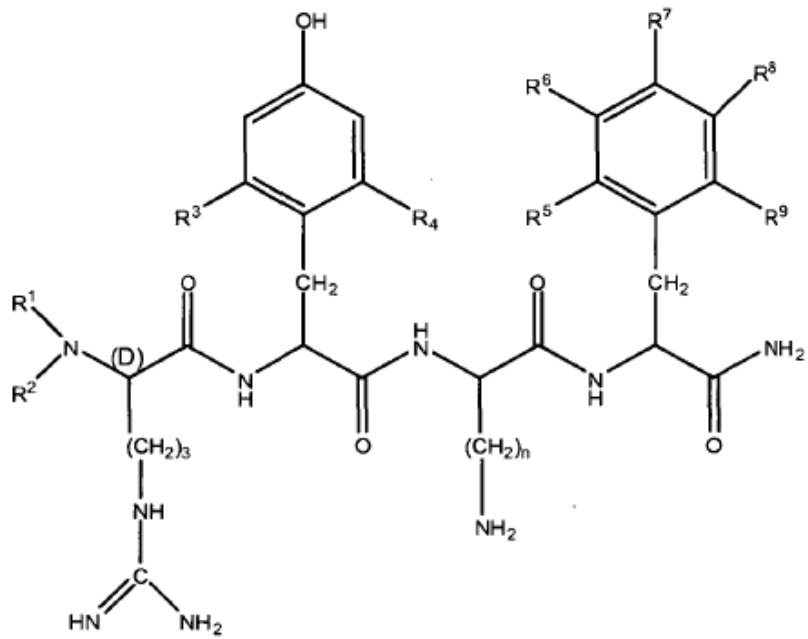
(vii) nitro;

(viii) hidroxilo;

(ix) halógeno, donde "halógeno" abarca cloro, flúor, bromo, y yodo; y n es un número entero de 1 a 5.

20 En una modalidad particular, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, y R¹² todos son hidrógeno; y n es 4. En otra modalidad, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, y R¹¹ todos son hidrógeno; R⁸ y R¹² son metilo; R¹⁰ es hidroxilo; y n es 4.

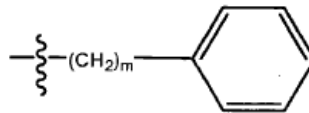
En una modalidad descrita en este documento, el péptido se define por la fórmula II:



en donde R^1 y R^2 cada uno se selecciona independientemente de

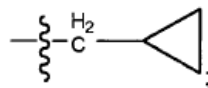
- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado;

5 (iii)

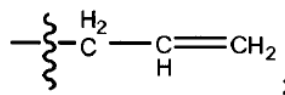


donde $m = 1-3$;

(iv)



10 (v)



R^3 y R^4 cada uno se selecciona independientemente de

- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado;

15 (iii) alcoxi C_1 - C_6 ;

- (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;
- (vi) dialquilamino C₁-C₄;
- (vii) nitro;
- 5 (viii) hidroxilo;
- (ix) halógeno, donde "halógeno" abarca cloro, flúor, bromo, y yodo;
- R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, y R⁹ cada uno se selecciona independientemente de
- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;
- 10 (iii) alcoxi C₁-C₆;
- (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;
- (vi) dialquilamino C₁-C₄;
- (vii) nitro;
- 15 (viii) hidroxilo;
- (ix) halógeno, donde "halógeno" abarca cloro, flúor, bromo, y yodo; y n es un número entero de 1 a 5.

Los péptidos catiónicos aromáticos se pueden administrar en una variedad de maneras. En algunas modalidades, los péptidos se pueden administrar por vía intraocular, oral, tópica, intranasal, intravenosa, subcutánea, o transdérmica (por ejemplo, por iontoforesis).

- 20 En un aspecto, la presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ formulado por administración tópica, iontofoférica, o intraocular.

- 25 En un aspecto, la presente divulgación provee una formulación oftálmica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En una modalidad, la formulación es soluble en la córnea, humor acuoso, y lentes de los ojos. En una modalidad, la formulación además comprende un conservante. En una modalidad, el conservante está presente en una concentración de menos de 1%.

- 30 En una modalidad, la formulación además comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste de: un antioxidante, un complejante de metal, un fármaco antiinflamatorio, un antibiótico, y un antihistamínico. En una modalidad, el antioxidante es la vitamina A, vitamina C, vitamina E, licopeno, selenio, ácido α-lipoico, coenzima Q, glutatión, o un carotenoide. En una modalidad, la formulación además comprende un agente activo seleccionado del grupo que consiste de: aceclidina, acetazolamida, anecortave, apraclonidina, atropina, azapentaceno, azelastina, bacitracin, befunolol, betametasona, betaxolol, bimatoprost, brimonidina, brinzolamida, carbacol, carteolol, celecoxib, cloramfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, cromoglicato, cromolina, ciclopentolato, ciclosporina, dapiprazol, demecario, dexametasona, diclofenaco, diclorfenamida, dipivefrin, dorzolamida, ecotiofato, emedastina, epinastina, epinefrina, eritromicina, etoxzolamida, eucatropina, fludrocortisona, fluorometolona, flurbiprofeno, fomivirsén, framicitina, ganciclovir, gatifloxacina, gentamicina, homatropina, hidrocortisona, idoxuridina, indometacina, isoflurofato, ketorolaco, ketotifen, latanoprost, levobetaxolol, levobunolol, levocabastina, levofloxacina, lodoxamida, loteprednol, medrisona, metazolamida, metipranolol, moxifloxacina, nafazolina, natamicina, nedocromil, neomicina, norfloxacina, ofloxacina, olopatadina, oximetazolina, pemirolast, pegaptanib, fenilefrina, fisostigmina, pilocarpina, pindolol, pirenoxina, polimixina B, prednisolona, proparacaína, ranibizumab, rimexolona, escopolamina, sezolamida, escualamina, sulfacetamida, suprofen, tetracaina, tetraciclina, tetrahidrozolona, tetrizolina, timolol, tobramicina, travoprost, triamcinulona, trifluorometazolamida, trifluridina, trimetoprima, tropicamida, unoprostona, vidarabina, xilometazolina, las sales de estos farmacéuticamente aceptables, y las combinaciones de los mismos.
- 40

Breve descripción de las figuras

- FIGs. 1A y 1B muestran los efectos de diferentes concentraciones de SS-31 (10 nM, 100 nM, 1 μ M y 10 μ M) utilizadas como co-tratamiento con glucosa 30 mM (HG). La FIG. 1A muestra el análisis de la apoptosis, como se evalúa mediante una citometría de flujo después de la tinción con Annexin V/PI, la cual mostró que las relaciones de supervivencia para HRECs (Q3) fueron 99.3%, 83.2%, 84.3%, 90.7%, 92.8%, y 94.3%, respectivamente 24 horas después del tratamiento. La FIG. 1B es una representación gráfica de la proporción de supervivencia para HRECs. Los datos para las concentraciones de SS-31 de 100 nM, 1 μ M, y 10 μ M fueron significativamente superiores que las vistas con las células expuestas a un alto contenido de glucosa en la ausencia del co-tratamiento con SS31. * $p < 0.05$ vs. grupo tratado con alto contenido de glucosa 30mM.
- FIGs. 2A-2F es una serie de micrográficos que muestran que el co-tratamiento con SS-31 redujo las especies de oxígeno reactivo (ROS) intracelular en HRECs expuestas a glucosa 30 mM durante 24 h y 48 h. La ROS intracelular se midió utilizando dihidroetidio. 2A, 2D medio de cultivo normal; 2B, 2E glucosa 30 mM; y 2C, 2F glucosa 30 mM + SS-31 (100 nM) a 24 y 48 h, respectivamente.
- FIGs. 3A y 3B muestran que SS-31 previene la pérdida de potencial mitocondrial de HRECs tratadas con alto contenido de glucosa. FIG. 3A. El $\Delta\Psi_m$ de HRECs se midió mediante una citometría de flujo después de la tinción con la sonda fluorescente JC-1. El tratamiento con alto contenido de glucosa (30 mM) resultó en una rápida pérdida de potencial de la membrana mitocondrial de las HRECs cultivadas a 24 y 48 horas. En contraste, el análisis de citometría de flujo mostró que glucosa 30mM co-tratado con SS-31, aumento el $\Delta\Psi_m$ en comparación con el grupo de alto contenido de glucosa sola. La FIG. 3B. Análisis cuantitativo de $\Delta\Psi_m$ en HRECs de alto contenido de glucosa co-tratadas con SS-31 por 24 y 48 horas, alto contenido de glucosa sola afectó adversamente $\Delta\Psi_m$. En contraste, SS-31 reestablece $\Delta\Psi_m$ a niveles control. Los valores representan la media \pm SD de seis experimentos separados realizados por triplicado. * $P < 0.05$.
- FIGs. 4A y 4D son imágenes microscópicas confocales que muestran que HRECs en el grupo de glucosa normal y el grupo co-tratado con SS-31 tienen la superposición más exacta de la tinción del citocromo c y la tinción de HSP60 a 24 y 48 horas, indicando la co-localización del citocromo c y las mitocondrias. Veinticuatro y 48 horas después del tratamiento, el citocromo c obviamente se incrementó en el citoplasma de HRECs tratadas con glucosa 30 mM. Las FIGs. 4B y 4E muestran el contenido del citocromo en mitocondrias y citoplasma como se determina por Western blot. Las FIGs. 4C y 4F muestran el análisis cuantitativo del porcentaje de contenido del citocromo en mitocondrias y citoplasma de HRECs co-tratadas con alto contenido de la glucosa y SS-31 durante 24 y 48 h.
- FIG. 5A y FIG. 5B muestran que el aumento de la expresión de caspasa-3 en HRECs tratadas con alto contenido de la glucosa (HG) se redujo mediante el co-tratamiento con SS-31, tal como se detectó por Western blot. La expresión de la caspasa-3 se normalizó a la expresión de β -actina. Las FIGs. 5C-E muestran que SS-31 aumenta la expresión de Trx2 en los HRECs tratadas con alto contenido de la glucosa. La FIG. 5C muestra el nivel de ARNm de Trx2 en HRECs expuestas a glucosa 30 mM tratadas con SS-31, durante 24 h y 48 h. La FIG. 5D muestra el nivel de expresión de la proteína de Trx2 medida por medio de Western blot. La FIG. 5E muestra el análisis cuantitativo del nivel de proteína de Trx2 en HRECs 24 y 48 h después de alto contenido de la glucosa con o sin co-tratamiento con SS-31.
- FIG. 6 es una fotografía de los efectos de SS-31 en las lentes de ratas diabéticas. Fila superior: lentes obtenidas de ratas diabéticas; fila inferior: lentes obtenidas de ratas diabéticas tratadas con SS-31 o SS-20.
- FIG. 7 es una serie de fotografías que muestran los efectos de SS-31 y SS-20 en las lentes de ratas diabéticas. La diabetes fue inducida por una dieta alta en grasa y estreptozotocina (HFD/STZ) (fila superior) o estreptozotocina (STZ) sola (fila inferior).
- FIG. 8 es una serie de micrográficos que muestran el epitelio del cristalino de ratas normales, ratas diabéticas, y ratas diabéticas tratadas con SS-31. La diabetes fue inducida por STZ.
- FIG. 9 es una serie de micrográficos que muestra el epitelio del cristalino de ratas normales, ratas diabéticas, y ratas diabéticas tratadas con SS-31. La diabetes fue inducida por HFD/STZ.
- FIG. 10 es una serie de gráficos que muestran la integridad de la barrera de retina sanguínea hemato retiniana de ratas normales (NRC), ratas diabéticas, y ratas diabéticas tratadas con SS-20 o SS-31, como se analiza por extravasación de azul de Evans. (A) diabetes inducida por STZ; (B) diabetes inducida por HFD/STZ.
- FIG. 11 es una serie de micrográficos que muestran microvasos retinales de ratas normales (NRC), ratas diabéticas (HFD/STZ), y ratas diabéticas tratadas con SS-31.

- FIG. 12 es una serie de micrográficos que muestran microvasos retinales de ratas normales, ratas diabéticas (STZ), y ratas diabéticas tratadas con SS-31.
- 5 FIGS. 13A-13D es una serie de micrográficos que muestran la distribución de la proteína de unión hermética claudina-5 en microvasos de la retina en ratas normales (A), ratas STZ (B), ratas STZ/SS-20-tratadas (C), o ratas tratadas con STZ/SS-31 (D).
- FIG. 14 es un gráfico que muestra la falta de citotoxicidad de SS-31 sobre células de red trabecular de individuos no enfermos (HTM) y células de red trabecular de pacientes con glaucoma (GTM) administrados con SS-31.
- 10 FIG. 15 es una serie de micrografías confocales que muestran que el co-tratamiento con SS-31 dependiente de la dosis inhibió la disminución del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) provocado por H_2O_2 200 μM en células de red trabecular de pacientes con glaucoma (GTM).
- FIG. 16 es una serie de gráficos que muestran que el co-tratamiento con SS-31 inhibió la disminución del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), como se mide por medio de TMRM y citometría de flujo, en células de red trabecular de pacientes con glaucoma (GTM) inducida por H_2O_2 200 μM .
- FIG. 17 es un gráfico de comparación del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en células GTM y HTM.
- 15 FIG. 18 es una serie de micrográficos que muestra los cambios de morfología en células GTM en respuesta al tratamiento con SS-31, como se observa utilizando microscopía de contraste de fase invertida.
- FIG. 19 es una serie de micrográficos que muestra que el co-tratamiento con SS-31 redujo la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial en células GTM causada por H_2O_2 400 μM de una manera dependiente de la dosis como se observa utilizando microscopía confocal.
- 20 FIG. 20 es una serie de micrográficos que muestra que el co-tratamiento con SS-31 redujo la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en células GTM causado por H_2O_2 400 μM como se observa mediante TMRM y microscopía confocal (ampliación 200x).
- FIG. 21 es una serie de micrográficos que muestran los cambios de morfología en células GTM en respuesta al tratamiento con SS-31 como se observa utilizando microscopía de contraste de fase invertida.
- 25 FIG. 22 es un gráfico que muestra que SS-31 no tiene efecto sobre la viabilidad de células primarias epiteliales de pigmento retinal (RPE) humanas (como se mide por medio del ensayo MTT).
- FIG. 23A es un gráfico que muestra el efecto de diferentes concentraciones de tBHP sobre la viabilidad (según se mide por medio de un ensayo MTT) de células RPE. La FIG. 23B es un gráfico que muestra los efectos de diferentes concentraciones de SS-31 sobre la viabilidad celular, cuando se exponen a un aumento de las concentraciones de tBHP.
- 30 FIG. 24A-24C es una serie de micrográficos que ilustra los efectos patológicos en un modelo de neovascularización coroidea (CNV) en ratón. La FIG. 24D es una gráfica que muestra el área de CNV en grupos control y tratados.
- FIG. 25 es una serie de micrográficos que ilustra diferentes hallazgos patológicos en un modelo en ratón de retinopatía inducida por el oxígeno (OIR). Note las áreas de vascularidad y nueva vascularización en un ratón P 17 OIR en comparación con un ratón normal P 17.
- 35 FIG. 26A-26D es una serie de micrográficos que muestran los efectos de la administración de SS-31 en el modelo en ratón de OIR. La FIG. 26E es una gráfica que muestra el área neovascular de los grupos control y tratados. SS-31 redujo el área vascular.
- FIG. 27A es un gráfico que muestra el efecto de diferentes dosis de tBHP sobre la viabilidad celular de una línea de células de cono 661 W derivada de un tumor retinal en ratón. La FIG. 27B es un gráfico que muestra el efecto de SS-31 1 μM en la muerte de células 661W inducida por la reducción de tBHP.
- 40 FIG. 28 es una serie de micrográficos que muestran el espesor de la capa nuclear exterior retinal (ONL) en un modelo en ratón de degeneración de la retina en ratones tratados con SS-31 y control.
- 45 FIG. 29 es una serie de micrográficos que muestran la densidad de células de cono en cantidades planas retinales teñidas con aglutinina de cacahuete (PNA), que tiñe selectivamente los segmentos interior y exterior del cono en ratones tratados con SS-31 y control.

FIG. 30 es una serie de micrográficos que muestran la tinción por acroleína, un marcador para daño lipídico oxidativo en un modelo en ratón de degeneración de la retina.

5 FIG. 31 es una serie de gráficas que muestran la intensidad de la fluorescencia de la producción de ROS intracelular en tres grupos de células RPE utilizando análisis FACS. La FIG. 31A muestra la producción de ROS en células control RPE; La FIG. 31B muestra la producción de ROS en células RPE tratadas con tBHP 500 μ M, durante 3 h; La FIG. 31C muestra la producción de ROS en células RPE tratadas con tBHP 500 μ M, durante 3 h y SS-31 1 μ M.

FIG. 32 es una serie de gráficas que muestra el análisis de MMP marcado por JC-1 en un ensayo FACS. Se analizaron tres diferentes concentraciones de grupos SS-31.

10 FIGs. 33A-33C es una serie de gráficas que muestra el efecto de SS-31 1 μ M sobre la disminución de MMP inducido por tBHP. FIG. 33A: Grupo control; FIG. 33B: grupo tBHP 500 μ M, durante 3 h; FIG. 33C: grupo SS-31 1 μ M, durante 4 h + tBHP 500 μ M, durante 3 h.

FIG. 33D es un gráfico de comparación de la proporción de fluorescencia para los diferentes grupos. *P<0.01, C vs. B.

15 FIGs. 34A-34C es una serie de gráficas que muestra el efecto de SS-31 sobre la apoptosis celular inducida por tBHP 250 μ M, durante 24 h. FIG. 34A: grupo control; FIG. 34B: grupo tBHP 250 μ M, durante 24 h; FIG. 34C: grupo SS-31 1 μ M, durante 4 h + 250 μ M tBHP, durante 24 h. FIG. 34D es un gráfico de comparación de la proporción de fluorescencia para los diferentes grupos. *P<0.05 C vs. B.

FIG. 35 es un gráfico que muestra el nivel de MDA inducido por tBHP en 3 grupos de células RPE. *P<0.05, grupo SS-31 1 μ M, durante 4 h + tBHP 250 μ M, durante 24 h vs tBHP 250 μ M, durante 24 h.

20 FIG. 36 es una gráfica que muestra la intensidad de la fluorescencia de TMRM de células GTM y HTM, en los grupos tratados con SS-31 y control, según se mide utilizando el análisis FACS.

FIG. 37 es una gráfica que muestra la intensidad de la fluorescencia de ROS de células GTM y HTM en grupos tratados con SS-31 y control, según se mide utilizando análisis FACS.

25 FIG. 38 es una serie de gráficas que muestra la apoptosis celular de los grupos tratados con SS-31 y control estimada por el porcentaje de células en el cuadrante Q2+Q4.

FIG. 39 es una serie de gráficas que muestra que SS-31 redujo la producción de ROS intracelular en células GTM3 e iHTM tratadas con H₂O₂.

FIG. 40 es una serie de gráficas que muestra que SS-31 protege contra la despolarización mitocondrial inducida por H₂O₂ de las células GTM3 e iHTM.

30 Descripción detallada

Se ha de apreciar que ciertos aspectos, modos, modalidades, variaciones y características de la invención se describen a continuación en varios niveles de detalle con el fin de proveer un entendimiento sustancial de la presente invención.

35 En la práctica de la presente invención, se utilizan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican en, *por ejemplo*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, Ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, Eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, Eds. (1984); *Animal Cell Culture*, Freshney, Ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning*; the series, *Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); and *Meth. Enzymol.*, Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente.

45 A continuación, se proveen las definiciones de ciertos términos como se utilizan en esta especificación. A menos que se define lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento generalmente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la cual esta invención pertenece.

Como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los plurales referentes a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

5 Como se utiliza en este documento, "aproximadamente" se entenderá por personas de experiencia común en la técnica y variará en cierta medida dependiendo del contexto en el que se utiliza. Si existen usos del término que no son claros a las personas de experiencia común en la técnica, dado el contexto en el que se utiliza, "aproximadamente" significará más o menos 10% del valor enumerado.

10 Como se utiliza en este documento, la "administración" de un agente, fármaco, o péptido a un sujeto incluye cualquier ruta para introducir o administrar a un sujeto un compuesto para realizar su función prevista. La administración se puede llevar a cabo por medio de cualquier ruta apropiada, incluyendo por vía oral, intraocular, intranasal, parenteral (por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea), o tópica. La administración incluye auto administración y la administración por otro.

15 Como se utiliza en este documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos de origen natural y aminoácidos sintéticos, también como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, también como los aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica como un aminoácido de origen natural, *i.e.*, un α -carbono que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *por ejemplo*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica como un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos pueden ser denominados en este documento por cualquiera de sus tres símbolos de letras conocidos comúnmente o por los símbolos de una letra recomendada por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

20

25

30 Como se utiliza en este documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que resulta en la prevención de, o una disminución de, los síntomas asociados con una condición oftalmológica. La cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo y la severidad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, severidad y tipo de enfermedad. El experto será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los métodos descritos en este documento, los péptidos catiónicos aromáticos pueden ser administrados a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de una condición oftalmológica. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de los péptidos catiónicos aromáticos se entiende como los niveles en los que los efectos fisiológicos de una condición oftalmológica son, como mínimo, mejorados.

35

40 Un polipéptido o péptido "aislado" o "purificado" son sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la célula o fuente de tejido del que se deriva el agente, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, un péptido catiónico aromático aislado debería ser libre de materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del agente. Tales materiales que interfieren pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos.

45 Como se utiliza en este documento, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, *i.e.*, isómeros peptídicos. El polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, denominadas comúnmente como péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas largas, generalmente denominadas como proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados del gen. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas, ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento postraducciona, o por medio de técnicas de modificación química que son bien conocidos en la técnica.

50

Como se utiliza en este documento, el término uso terapéutico "simultáneo" se refiere a la administración de al menos dos ingredientes activos por la misma vía y en el mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo.

Como se utiliza en este documento, el término uso terapéutico por "separado" se refiere a la administración de al menos dos ingredientes activos en el mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo por diferentes rutas.

Como se utiliza en este documento, el término uso terapéutico "secuencial" se refiere a la administración de al menos dos ingredientes activos a tiempos diferentes, siendo la ruta de administración idéntica o diferente. Más particularmente, uso secuencial se refiere a la administración completa de uno de los ingredientes activos antes de la administración del otro u otros principios. Por lo tanto es posible administrar uno de los ingredientes activos durante varios minutos, horas, o días antes de la administración del otro ingrediente o ingredientes activos. No hay tratamiento simultáneo en este caso.

Como se utiliza en este documento, los términos "tratamiento" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o retrasar (reducir) el trastorno o condición patológica específica. Un sujeto es "tratado" con éxito para una condición oftalmológica si, después de recibir una cantidad terapéutica de los péptidos catiónicos aromáticos de acuerdo con los métodos descritos en este documento, el sujeto muestra una reducción observable y/o que se puede medir en o ausencia de uno o más signos y síntomas de una condición oftalmológica. También se debe apreciar que los diversos modos de tratamiento o prevención de condiciones médicas según se describe tiene la intención de significar "sustancial", que incluye total pero también menos del tratamiento total o prevención, y en donde se logra algún resultado relevante biológica o médicamente.

Como se utiliza en este documento, "que previene" o "prevención" de un trastorno o condición se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o condición en la muestra tratada con respecto a una muestra control sin tratar, o retrasa el inicio o reduce la severidad de uno o más síntomas del trastorno o condición con respecto a la muestra control sin tratar.

Péptidos Catiónicos Aromáticos

La presente tecnología se relaciona con el tratamiento o prevención de una condición oftalmológica mediante la administración de ciertos péptidos catiónicos aromáticos. Sin desear estar limitados por la teoría, los péptidos catiónicos aromáticos pueden tratar o prevenir las condiciones o enfermedades oftalmológicas mediante la reducción de la gravedad o la ocurrencia del daño oxidativo en el ojo. Los péptidos catiónicos aromáticos son solubles en agua y altamente polares. A pesar de estas propiedades, los péptidos pueden penetrar fácilmente las membranas celulares. Los péptidos catiónicos aromáticos por lo general incluyen un mínimo de tres aminoácidos o un mínimo de cuatro aminoácidos, unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El número máximo de aminoácidos presente en los péptidos catiónicos aromáticos es aproximadamente veinte aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Adecuadamente, el número máximo de aminoácidos es aproximadamente doce, más preferiblemente aproximadamente nueve, y más preferiblemente aproximadamente seis.

Los aminoácidos de los péptidos catiónicos aromáticos pueden ser cualquier aminoácido. Como se utiliza en este documento, el término "aminoácido" se utiliza para referirse a cualquier molécula orgánica que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo. Por lo general, al menos un grupo amino está en la posición α con respecto a un grupo carboxilo. Los aminoácidos pueden ser de origen natural. Los aminoácidos de origen natural incluyen, por ejemplo, los veinte aminoácidos levógiros (L) más comunes que se encuentran normalmente en proteínas de mamífero, *i.e.*, alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano, (Trp), tirosina (Tyr), y valina (Val). Otros aminoácidos de origen natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos que se sintetizan en procesos metabólicos no asociados con la síntesis de proteína. Por ejemplo, los aminoácidos ornitina y citrulina se sintetizan en metabolismo de mamífero durante la producción de urea. Otro ejemplo de un aminoácido de origen natural incluye la hidroxiprolina (Hyp).

Los péptidos opcionalmente contienen uno o más aminoácidos de origen no natural. Adecuadamente, el péptido no tiene aminoácidos que sean de origen natural. Los aminoácidos de origen no natural pueden ser levógiros (L-), dextrógiros (D-), o mezclas de los mismos. Los aminoácidos de origen no-natural son aquellos aminoácidos que por lo general no se sintetizan en procesos metabólicos normales en organismos vivos, y no ocurren naturalmente en proteínas. Además, los aminoácidos de origen no natural apropiadamente tampoco son reconocidos por proteasas comunes. El aminoácido de origen no natural puede estar presente en cualquier posición en el péptido. Por ejemplo, el aminoácido de origen no natural puede estar en el terminal N, el terminal C, o en cualquier posición entre el terminal N y el terminal C.

Los aminoácidos no-naturales, por ejemplo, pueden comprender grupos alquilo, arilo, o alquilarilo no encontrados en aminoácidos naturales. Algunos ejemplos de aminoácidos de alquilo no-naturales incluyen ácido α -aminobutírico, ácido β -aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido δ -aminovalérico, y ácido ϵ -aminocaproico. Algunos ejemplos de aminoácidos de arilo no naturales incluyen ácido orto-, meta-, y para-aminobenzoico. Algunos ejemplos de aminoácidos alquilarilo no-naturales incluyen ácido orto-, meta-, y para-aminofenilacético, y ácido γ -fenil- β -aminobutírico. Los aminoácidos de origen no-natural incluyen derivados de aminoácidos de origen natural. Los

derivados de aminoácidos de origen natural, por ejemplo, pueden incluir la adición de uno o más grupos químicos al aminoácido de origen natural.

Por ejemplo, uno o más grupos químicos se pueden adicionar a uno o más de las posiciones 2', 3', 4', 5', o 6' del anillo aromático de un residuo de fenilalanina o tirosina, o las posiciones 4', 5', 6', o 7' del anillo benzo de un residuo de triptófano. El grupo puede ser cualquier grupo químico que se puede adicionar a un anillo aromático. Algunos ejemplos de tales grupos incluyen alquilo C₁-C₄ ramificado o sin ramificar, tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, o t-butilo, alquilo C₁-C₄ (i.e., alcoxi), amino, alquilamino C₁-C₄ y dialquilamino C₁-C₄ (por ejemplo, metilamino, dimetilamino), nitro, hidroxilo, halo (i.e., flúor, cloro, bromo, o yodo). Algunos ejemplos específicos de derivados de origen no natural de aminoácidos de origen natural incluyen norvalina (Nva) y norleucina (Nle).

Otro ejemplo de una modificación de un aminoácido en un péptido es la derivatización de un grupo carboxilo de un residuo del ácido aspártico o un ácido glutámico del péptido. Un ejemplo de derivatización es la amidación con amoniaco o con una amina primaria o secundaria, por ejemplo metilamina, etilamina, dimetilamina o dietilamina. Otro ejemplo de derivatización incluye esterificación con, por ejemplo, alcohol metílico o etílico. Otra dicha modificación incluye derivatización de un grupo amino de un residuo lisina, arginina, o histidina. Por ejemplo, tales grupos aminos se pueden acilar. Algunos grupos acilo apropiados incluyen, por ejemplo, un grupo benzoilo o un grupo alcanilo que comprende cualquiera de los grupos alquilo C₁-C₄ mencionados anteriormente, tales como un grupo acetilo o propionilo.

Los aminoácidos de origen no natural preferiblemente son resistentes, y más preferiblemente insensibles, a las proteasas comunes. Ejemplos de aminoácidos de origen no natural que son resistentes o insensibles a las proteasas incluyen la forma dextrógiro (D-) de cualquiera de los mencionados anteriormente L-aminoácidos de origen natural, también como L- y/o D- aminoácidos de origen no-natural. Los D-aminoácidos normalmente no se producen proteínas, a pesar de que se encuentran en ciertos antibióticos peptídicos que se sintetizan por medios distintos de la maquinaria de síntesis de proteína ribosomal de la célula. Como se utiliza en este documento, se considera que los D-aminoácidos son aminoácidos de origen no natural.

Con el fin de minimizar la sensibilidad de proteasa, los péptidos deberían tener menos de cinco, preferiblemente menos de cuatro, más preferiblemente menos de tres, y más preferiblemente, menos de dos L-aminoácidos continuos reconocidos por las proteasas comunes, independientemente de si los aminoácidos son de origen natural o no natural. Adecuadamente, el péptido tiene solamente D-aminoácidos, y no L-aminoácidos. Si el péptido contiene secuencias of aminoácidos sensibles a la proteasa, al menos uno de los aminoácidos es preferiblemente un D-aminoácido de origen no-natural, confiriendo de este modo la resistencia a la proteasa. Un ejemplo de una secuencia sensible a la proteasa incluye dos o más aminoácidos básicos continuos que se escinden fácilmente por proteasas comunes, tales como endopeptidasas y tripsina. Ejemplos de aminoácidos básicos incluyen arginina, lisina e histidina.

Los péptidos catiónicos aromáticos deberían tener un número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico en comparación con el número total de residuos de aminoácido en el péptido. El número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico entonces será denominado como (p_m). El número total de residuos de aminoácido en el péptido entonces será denominado como (r). El número mínimo de cargas positivas netas mencionadas a continuación están todos a pH fisiológico. El término "pH fisiológico" tal como se utiliza en este documento se refiere al pH normal en las células de los tejidos y órganos del cuerpo de mamífero. Por ejemplo, el pH fisiológico de un humano normalmente es aproximadamente 7.4, pero pH normal fisiológico en mamíferos pueden ser cualquier pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 7.8.

La "carga neta" tal como se utiliza en este documento se refiere al balance del número de cargas positivas y el número de cargas negativas llevadas por los aminoácidos presentes en el péptido. En esta especificación, se entiende que las cargas netas se miden a pH fisiológico. Los aminoácidos de origen natural que se cargan positivamente a pH fisiológico incluyen L-lisina, L-arginina, y L-histidina. Los aminoácidos de origen natural que se cargan negativamente a pH fisiológico incluyen ácido L- aspártico y ácido L- glutámico.

Por lo general, un péptido tiene un grupo amino N-terminal cargado positivamente y un grupo carboxilo C-terminal cargado negativamente. Las cargas anulan entre sí un pH fisiológico. Como un ejemplo de cálculo de carga neta, el péptido Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg tiene un aminoácido cargado negativamente (i.e., Glu) y cuatro aminoácidos cargados positivamente (i.e., dos residuos Arg, uno Lys, y uno His). Por lo tanto, el péptido anterior tiene una carga positiva neta de tres.

En una modalidad, los péptidos catiónicos aromáticos tienen una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) en donde $3p_m$ es el número más amplio que es menor o igual a $r + 1$. En esta modalidad, la relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) es de la siguiente manera:

TABLA 1. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($3p_m \leq p+1$)

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p _m)	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

5 En otra modalidad, los péptidos catiónicos aromáticos tienen una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) en donde 2p_m es el número más amplio que es menor o igual a r + 1. En esta modalidad, la relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) es de la siguiente manera:

TABLA 2. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($2p_m \leq p+1$)

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p _m)	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

10 En una modalidad, el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) son iguales. En otra modalidad, los péptidos tienen tres o cuatro residuos de aminoácido y un mínimo de una carga positiva neta, preferiblemente, un mínimo de dos cargas positivas netas y más preferiblemente un mínimo de tres cargas positivas netas.

15 También es importante que los péptidos catiónicos aromáticos tengan un número mínimo de grupos aromáticos en comparación con el número total de cargas positivas netas (p_t). El número mínimo de grupos aromáticos a continuación será denominado como (a). Los aminoácidos de origen natural que tienen un grupo aromático incluyen los aminoácidos histidina, triptófano, tirosina, y fenilalanina. Por ejemplo, el hexapéptido Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp tiene una carga positiva neta de dos (aportada por los residuos de lisina y arginina) y tres grupos aromáticos (aportada por los residuos de tirosina, fenilalanina y triptófano).

20 Los péptidos catiónicos aromáticos también deberían tener una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas a pH fisiológico (p_t) en donde 3a es el número más amplio que es menor o igual a p_t + 1, excepto que cuando p_t es 1, a también puede ser 1. En esta modalidad, la relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) es de la siguiente manera:

TABLA 3. Grupos aromáticos y cargas positivas netas ($3a \leq p_t+1$ o $a = p_t=1$)

(p _t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

25 En otra modalidad, los péptidos catiónicos aromáticos tienen una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) en donde 2a es el número más amplio que es menor o igual a p_t + 1. En esta modalidad, la relación entre el número mínimo de residuos aromáticos de aminoácido (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) es de la siguiente manera:

30 **TABLA 4. Grupos aromáticos y cargas positivas netas ($2a \leq p_t+1$ o $a = p_t=1$)**

(p _t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

En otra modalidad, el número de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) son iguales.

Los grupos carboxilo, especialmente el grupo carboxilo terminal de un aminoácido C-terminal, preferiblemente son amidados con, por ejemplo, amoníaco para formar la amida C-terminal. Alternativamente, el grupo carboxilo terminal del aminoácido C-terminal puede ser amidado con cualquier amina primaria o secundaria. La amina primaria o secundaria, por ejemplo, puede ser un alquilo, especialmente un alquilo C₁-C₄ ramificado o sin ramificar, o una amina de arilo. De acuerdo con ello, el aminoácido en el terminal C del péptido se puede convertir a un grupo amido, N-metilamido, N-etilamido, N,N-dimetilamido, N,N-dietilamido, N-metil-N-etilamido, N-fenilamido o N-fenil-N-etilamido. Los grupos carboxilato libres de los residuos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, y ácido glutámico no se producen en el terminal C de los péptidos catiónicos aromáticos también puede ser amidados donde quiera que se produzcan dentro del péptido. La amidación en estas posiciones internas puede ser con amoníaco o cualquiera de las aminas primarias o secundarias descritas anteriormente.

En una modalidad, el péptido catiónico aromático es un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y al menos un aminoácido aromático. En una modalidad particular, el péptido catiónico aromático es un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y dos aminoácidos aromáticos.

Los péptidos aromáticos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes ejemplos de péptidos:

15 Lys-D-Arg-Tyr-NH₂

Phe-D-Arg-His

D-Tyr-Trp-Lys-NH₂

Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂

Tyr-His-D-Gly-Met

20 Phe-Arg-D-His-Asp

Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂

Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg

D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg

Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂

25 Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His

Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂

Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂

Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys

Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂

30 Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys

Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂

D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂

Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe

Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe

35 Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂

Phe-Try-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr

Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys

Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂

Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly

D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂

Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe

5 His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂

Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp

Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂

10 En una modalidad, un péptido que tiene actividad contra el receptor mu-opioide tiene la fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (denominado en este documento como "SS-01"). SS-01 tiene una carga positiva neta de tres, aportada por los aminoácidos tirosina, arginina, y lisina y tiene dos grupos aromáticos aportados por los aminoácidos fenilalanina y tirosina. La tirosina de SS-01 puede ser un derivado modificado de tirosina tal como en 2',6'-dimetiltirosina para producir el compuesto que tiene la fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (denominado en este documento como "SS-02"). SS-02 tiene un peso molecular de 640 y lleva una carga positiva tres neta a pH fisiológico. SS-02 penetra fácilmente la membrana plasmática de varios tipos de células de mamífero de un manera independiente de la energía (Zhao et al., J. Pharmacol Exp Ther. 304: 425-432, 2003).

15 Los péptidos que no tienen actividad contra el receptor mu-opioide generalmente no tienen un residuo de tirosina o un derivado de tirosina en el terminal N (*i.e.*, posición del aminoácido 1). El aminoácido en el terminal N puede ser cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural distinto de la tirosina. En una modalidad, el aminoácido en el terminal N es fenilalanina o su derivado. Ejemplos de derivados de fenilalanina incluyen 2'-metilfenilalanina (Mmp), 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp), N,2',6'-trimetilfenilalanina (Tmp), y 2'-hidroxi-6'-metilfenilalanina (Hmp).

20 Un ejemplo de un péptido catiónico aromático que no tiene actividad contra el receptor mu-opioide tiene la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (denominado en este documento como "SS-20"). Alternativamente, la fenilalanina terminal-N puede ser un derivado de fenilalanina tal como 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp). SS-01 que contiene 2',6'-dimetilfenilalanina en la posición del aminoácido 1, tiene la fórmula 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En una modalidad, la secuencia del aminoácido de SS-02 se reordena de tal manera que Dmt no está en el terminal N. Un ejemplo de dicho péptido catiónico aromático que no tiene actividad contra el receptor mu-opioide tiene la fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31).

25 SS-01, SS-20, SS-31, y sus derivados además pueden incluir análogos funcionales. Un péptido se considera un análogo funcional de SS-01, SS-20, o SS-31 si el análogo tiene la misma función que SS-01, SS-20, o SS-31. El análogo, por ejemplo, puede ser una variante de sustitución de SS-01, SS-20, o SS-31, en donde uno o más aminoácidos se sustituyen por otro aminoácido.

30 Las variantes de sustitución apropiadas de SS-01, SS-20, o SS-31 incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con sus características fisicoquímicas de la siguiente manera:

(a) Aminoácidos no-polares: Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys (C);

(b) Aminoácidos ácidos: Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);

(c) Aminoácidos básicos: His(H) Arg(R) Lys(K);

(d) Aminoácidos hidrofóbicos: Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V); y

40 (e) Aminoácidos aromáticos: Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His (H).

Las sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en el mismo grupo se denominan como una sustitución conservadora y puede preservar las características fisicoquímicas del péptido original. En contraste, las sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en un grupo diferente generalmente es más probable que altere las características del péptido original.

45 En algunas modalidades, el péptido catiónico aromático tiene una fórmula como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Análogos de péptidos con Actividad Mu-Opioide

Posición del Aminoácido 1	Posición del Aminoácido 2	Posición del Aminoácido 3	Posición del Aminoácido 4	Modificación terminal C
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-dns	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-atn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(ácido 2-aminoheptanoico)	NH ₂
Bio-2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂

ES 2 487 633 T3

2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂

ES 2 487 633 T3

2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lvs	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg	NH ₂

ES 2 487 633 T3

2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂

ES 2 487 633 T3

Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂

Dab = diaminobutírico

Dap = ácido diaminopropiónico

Dmt = dimetiltirosina

Mmt = 2'-metiltirosina

Tmt = N, 2',6'-trimetiltirosina

Hmt = 2'-hidroxi,6'-metiltirosina

dnsDap = ácido β-dansil-L-α, β - diaminopropiónico

atnDap = ácido β-antraniloil-L-α, β- diaminopropiónico

Bio = biotina

Ejemplos de otros péptidos catiónicos aromáticos que no activan los receptores mu-opioides incluyen, pero no se limitan a, los péptidos catiónicos aromáticos mostrados en la Tabla 6.

TABLA 6. Análogos de péptidos Carentes de Actividad Mu-Opioide

Posición del Aminoácido 1	Posición del Aminoácido 2	Posición del Aminoácido 3	Posición del Aminoácido 4	Modificación del Terminal C
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys	NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt	NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys	NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe	NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt	NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg	NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt	NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys	NH ₂
Phe	Dmt	Lys	D-Arg	NH ₂
Lys	Phe	D-Arg	Dmt	NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg	NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe	NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg	NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt	NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp	NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
Trp	D-Arg	Trp	Lys	NH ₂
Trp	D-Arg	Dmt	Lys	NH ₂

D-Arg	Trp	Lys	Phe	NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys	NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt	NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys	NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe	NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt	NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Cha = ciclohexil alanina				

Los aminoácidos de los péptidos mostrados en la Tabla 5 y 6 pueden estar tanto en la configuración L- como la D-.

Los péptidos pueden ser sintetizados por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos apropiados para la síntesis química de la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart and Young in Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, Pierce Chemical Company (1984), y en Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, New York (1997).

Usos terapéuticos y profilácticos de péptidos catiónicos aromáticos.

Los péptidos catiónicos aromáticos descritos en este documento son útiles para prevenir o tratar una enfermedad. Específicamente, la divulgación provee por tanto métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) una condición o enfermedad oftálmica. De acuerdo con ello, los métodos descritos en este documento proporcionados para la prevención y/o tratamiento de una condición oftalmológica en un sujeto, mediante la administración de una cantidad efectiva de un péptido catiónico aromático a un sujeto necesitado de este. Por ejemplo, a un sujeto se le puede administrar unas composiciones de un péptido catiónico aromático en un esfuerzo para mejorar uno o más de los factores que contribuyen a una condición o enfermedad oftálmica.

Un aspecto de la tecnología incluye métodos de reducción de una condición oftalmológica en un sujeto para propósitos terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones o medicamentos se administran a un sujeto que se sospecha de, o que ya sufre de dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. Como tal, la divulgación provee los métodos de tratamiento de un individuo aquejado con una condición oftalmológica. En algunas modalidades, la tecnología provee un método de tratamiento o prevención de trastornos oftalmológicos específicos, tales como retinopatía diabética, cataratas, retinitis pigmentosa, glaucoma, neovascularización coroidea, degeneración de la retina, y retinopatía inducida por el oxígeno, en un mamífero por medio de la administración de un péptido catiónico aromático.

En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir la retinopatía diabética. La retinopatía diabética se caracteriza por microaneurismas capilares y hemorragia de punto. A partir de entonces, las obstrucciones vasculares causan parches en copos de algodón para formar sobre la retina. Además, se pueden formar edema retinal y/o exudados duros en individuos con retinopatía diabética debido al aumento de hiperpermeabilidad vascular. Posteriormente, la neovascularización aparece y el desprendimiento de retina se causa por la tracción del tejido conjuntivo cultivado en el cuerpo vítreo. También puede ocurrir que la rubeosis del iris y el glaucoma neovascular, a su vez, puedan conducir a la ceguera. Los síntomas de retinopatía diabética incluyen, pero no se limitan a, dificultades para leer, visión borrosa, pérdida repentina de la visión en un ojo, ver anillos alrededor de las luces, ver manchas oscuras, y/o ver luces intermitentes.

En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir cataratas. La catarata es una enfermedad congénita o adquirida caracterizada por una reducción en la claridad de la lente natural. Los individuos con cataratas pueden mostrar uno o más síntomas, incluyendo, pero no limitando a, nubosidad en la superficie de la lente, nubosidad en el interior de la lente, y/o hinchazón de la lente. Ejemplos típicos de enfermedades asociadas con las cataratas congénitas son pseudo-ataratas, cataratas de membrana, cataratas coronarias, cataratas lamelares, catarata punteada, y catarata filamentosas. Ejemplos típicos de enfermedades

asociadas con las cataratas adquiridas son las cataratas geriátricas, cataratas secundarias, cataratas pardas, cataratas complicadas, cataratas diabéticas, y cataratas traumáticas. Las cataratas adquiridas también son inducibles por shock eléctrico, radiación, ultrasonido, fármacos, enfermedades sistémicas, y trastornos nutricionales. Las cataratas adquiridas además incluyen cataratas postoperativas.

5 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir retinitis pigmentosa. La retinitis pigmentosa es un trastorno que se caracteriza por daño celular de barra y/o cono. La presencia de líneas oscuras en la retina es típico en individuos que sufren de retinitis pigmentosa. Los individuos con retinitis pigmentosa también presentan con una variedad de síntomas incluyendo, pero no limitando a, dolores de cabeza, entumecimiento u hormigueo en las extremidades, destellos de luz, y/o cambios de visión. Véase, *por ejemplo*, Heckenlively et al., Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol. 105(5): 504-511 (1988).

15 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir el glaucoma. El glaucoma es una enfermedad genética caracterizada por un aumento en la presión intraocular, lo que conduce a una disminución de la visión. El glaucoma puede proceder de varias condiciones oftalmológicas que ya están presentes en un individuo, tales como, heridas, cirugía, y otras malformaciones estructurales. Aunque el glaucoma puede ocurrir a cualquier edad, se desarrolla con frecuencia en individuos entrados en años y conduce a la ceguera. Los pacientes con glaucoma por lo general tienen una presión intraocular en exceso de 21 mm de Hg. Sin embargo, el glaucoma de tensión normal, donde las alteraciones glaucomatosas se encuentran en el campo visual y la papila óptica, puede ocurrir en la ausencia de dicho aumento de presiones intraoculares, *i.e.*, superior a 21 mm de Hg. Los síntomas del glaucoma incluyen, pero no se limitan a, visión borrosa, dolor ocular intenso, dolor de cabeza, ver halos alrededor de las luces, náuseas, y/o vómitos.

25 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir la degeneración macular. Por lo general, la degeneración macular es una enfermedad relacionada con la edad. Las categorías generales de la degeneración macular incluyen degeneración macular húmeda, seca y no relacionada con la edad. La degeneración macular seca, que representa al rededor del 80-90 por ciento de todos los casos, también se conoce como degeneración macular atrófica, no exudativa, o drusenoides. Con la degeneración macular seca, por lo general se acumulan drusas por debajo del tejido del epitelio del pigmento de la retina. Posteriormente se produce la pérdida de visión cuando las drusas interfieren con la función de fotoreceptores en la macula. Los síntomas de la degeneración macular seca incluyen, pero no se limitan a, visión distorsionada, distorsión del centro de visión, distorsión de la luz y la oscuridad, y/o cambios en la percepción del color. La degeneración macular seca puede dar lugar a la pérdida gradual de la visión.

35 La degeneración macular húmeda también se conoce como neovascularización, neovascularización subretiniana, exudativa, o degeneración disciforme. Con la degeneración macular húmeda, los vasos sanguíneos anormales crecen por debajo de la macula. Los vasos sanguíneos dejan escapar líquido en la macula y dañan las células fotoreceptoras. La degeneración macular húmeda puede progresar rápidamente y causar daño severo a la visión central. La degeneración macular seca y húmeda tienen síntomas idénticos. La degeneración macular no relacionada con la edad, sin embargo, es poco frecuente y se puede vincular con factores hereditarios, diabetes, deficiencias nutricionales, lesión, infección, u otros factores. Los síntomas de la degeneración macular no relacionada con la edad también incluyen, pero no se limitan a, visión distorsionada, distorsión del centro de visión, distorsión de la luz y de la oscuridad, y/o cambios en la percepción del color.

45 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir la neovascularización coroidea. La neovascularización coroidea (CNV) es una enfermedad caracterizada por el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en la capa coroide del ojo. Los vasos sanguíneos recién formados crecen en las coroideas, a través de la membrana de Bruch, e invaden el espacio subretinal. CNV pueden conducir al deterioro de la visión o a la pérdida completa de la visión. Los síntomas de CNV incluyen, pero no se limitan a, percepción de parpadeo, luces parpadeantes, o manchas grises en el ojo u ojos afectados, visión borrosa, visión distorsionada, y/o pérdida de visión.

50 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir la degeneración de la retina. La degeneración de la retina es una enfermedad genética que se relaciona con el desprendimiento de la retina. El tejido de la retina se puede degenerar por diversas razones, tales como, oclusión venosa o de la arteria, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, y/o fibroplasia retrolental. La degradación de la retina generalmente incluye retinosquiasis, degeneración Lattice, y se relaciona con la degeneración macular progresiva. Los síntomas de la degradación de la retina incluyen, pero no se limitan a, visión deteriorada, pérdida de visión, ceguera nocturna, visión de túnel, pérdida de la visión periférica, desprendimiento de retina, y/o sensibilidad a la luz.

55 En una modalidad, un péptido catiónico aromático se administra a un sujeto para tratar o prevenir la retinopatía inducida por el oxígeno. La retinopatía inducida por el oxígeno (OIR) es una enfermedad caracterizada por la degeneración microvascular. OIR es un modelo establecido para el estudio de la retinopatía del prematuro. OIR se asocia con el daño de células vasculares que culmina en un neovascularización anormal. La degeneración

microvascular conduce a la isquemia que contribuye a los cambios físicos asociados con OIR. El estrés oxidativo también juega un papel importante en la vaso-obliteración de OIR donde la células endoteliales son propensas al daño peroxidativo. Los pericitos, células del músculo liso, y astrocitos perivascuales, sin embargo, generalmente son resistentes a lesión peroxidativa. Véase, por ejemplo, Beauchamp et al., Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy, JAppl Physiol. 90: 2279-2288 (2001). OIR, incluyendo la retinopatía del prematuro, generalmente es asintomática. Sin embargo, movimientos anormales de los ojos, ojos cruzados, miopía severa, y/o leucocoria, pueden ser un signo OIR o retinopatía del prematuro.

La invención provee un péptido representado por la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg- Phe-Lys-NH₂ para utilizar en el tratamiento o prevención de una condición oftalmológica en donde la condición oftalmológica se selecciona del grupo que consiste de: retinitis pigmentosa, neovascularización coroidea, y retinopatía inducida por el oxígeno. Los sujetos con riesgo de una condición oftalmológica se pueden identificar, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico como se describe en este documento. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos de péptidos catiónicos aromáticos a un sujeto susceptible a, o de otra manera en riesgo de una enfermedad o condición en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad, o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo la bioquímica, histología y/o síntomas conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. La administración de una profiláctica aromática-catiónica puede ocurrir antes de la manifestación de síntomas característicos de la aberración, de tal manera que una enfermedad o trastorno se evita o, alternativamente, se retrasa en su progresión. Dependiendo del tipo de aberración, por ejemplo, se puede utilizar un péptido catiónico aromático que actúa para aumentar o mejorar la función mitocondrial o reducir el daño oxidativo para tratar el sujeto. El compuesto apropiado se puede determinar basándose en ensayos de selección descritos en este documento.

Determinación del Efecto Biológico del Tratamiento Basado en Péptidos Catiónicos Aromáticos. En diversas modalidades, los ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo* se realizan para determinar el efecto de un agente terapéutico basado en péptidos catiónicos aromáticos específicos y si su administración se indica para el tratamiento. En diversas modalidades, los ensayos *in vitro* se pueden realizar con células representativas del tipo(s) implicado(s) en el trastorno del sujeto, para determinar si un agente terapéutico basado en péptidos catiónicos dado ejerce el efecto deseado sobre el tipo(s) de célula(s). Los compuestos para utilizar en la terapia se pueden probar en apropiados sistemas de modelo de animal incluyendo, pero no limitando a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, y similares, antes de probar en sujetos humanos. Del mismo modo, para pruebas *in vivo*, cualquiera de los sistemas de modelo de animal conocidos en la técnica se puede utilizar antes de la administración a sujetos humanos. En una modalidad, la administración de un péptido catiónico aromático a un sujeto que muestra los síntomas asociados con una condición oftalmológica causará una mejora en uno o más de los síntomas.

Modos de administración y dosificaciones efectivas

Se puede emplear cualquier método conocido por los expertos en la técnica para poner en contacto una célula, órgano o tejido con un péptido. Los métodos apropiados incluyen métodos *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Los métodos *in vivo* por lo general incluyen la administración de un péptido catiónico aromático, tal como los descritos anteriormente, a un mamífero, preferiblemente un humano. Cuando se utiliza *in vivo* para terapia, los péptidos catiónicos aromáticos se administran al sujeto en cantidades efectivas (*i.e.*, cantidades que tienen efecto terapéutico deseado). La dosis y régimen de dosificación dependerá del grado de la condición oftalmológica en el sujeto, las características del péptido catiónico aromático particular utilizado, por ejemplo, su índice terapéutico, el sujeto, y la historia del sujeto.

La cantidad efectiva se puede determinar durante las pruebas pre-clínicas y pruebas clínicas mediante métodos familiares para los métodos y los clínicos. Una cantidad efectiva de un péptido útil en los métodos de la presente invención, preferiblemente en una composición farmacéutica, se puede administrar a un mamífero necesitado de este por cualquiera de un número de métodos bien conocidos para la administración de los compuestos farmacéuticos. En algunas modalidades, el péptido se puede administrar sistémicamente, por vía tópica, o por vía intraocular.

Los péptidos catiónicos aromáticos descritos en este documento se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas para la administración, por separado o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o prevención de un trastorno descrito en este documento. Tales composiciones por lo general incluyen el agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en este documento el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas por lo general se formulan para ser compatibles con su ruta de administración pretendida. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea), oral, inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, iontoforética, y

transmucosa. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; soluciones reguladoras tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis elaborados de vidrio o plástico. Para conveniencia del paciente o el tratamiento médico, la formulación de dosificación se puede proveer en un kit que contiene todo el equipo necesario (por ejemplo, viales de fármaco, viales de diluyente, jeringas y agujas) para una ruta de tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para usos inyectables pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores apropiados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina reguladora de fosfato (PBS). En todos los casos, una composición para la administración parenteral debe ser estéril y debe ser fluido en la medida de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de un péptido catiónico aromático pueden incluir un portador, que puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomerasol, y similares. El glutatión y otros antioxidantes se pueden incluir para prevenir la oxidación. En muchos casos, puede ser deseable incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, métodos típicos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, que pueden producir un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Para aplicaciones oftálmicas, el compuesto terapéutico se formula en soluciones, suspensiones, y ungüentos apropiados para utilizar en el ojo. Para formulaciones oftálmicas en general, ver Mitra (ed.), Ophthalmic Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. (1993) y también Havener, W. H., Ocular Pharmacology, C.V. Mosby Co., St. Louis (1983). Las composiciones farmacéuticas oftálmicas se pueden adaptar para la administración tópica al ojo en la forma de soluciones, suspensiones, ungüentos, cremas o como un inserto sólido. Para una dosis única, se pueden aplicar al ojo humano entre 0.1 ng a 5000 µg, 1 ng a 500 µg, o 10 ng a 100 µg de los péptidos catiónicos aromáticos.

La preparación oftálmica puede contener sustancias auxiliares no-tóxicas tales como componentes antibacterianos que no sean perjudiciales en el uso, por ejemplo, timerosal, cloruro de benzalconio, metil y propil parabeno, bromuro de benzododecinio, alcohol bencílico, o feniletanol; ingredientes de soluciones reguladoras tales como soluciones reguladoras de cloruro de sodio, borato de sodio, acetato de sodio, citrato de sodio, o gluconato; y otros ingredientes convencionales tales como monolaurato de sorbitán, trietanolamina, monopalmitilato de polioxietilén sorbitan, ácido etilendiamina tetraacético, y similares.

La solución o suspensión oftálmica se puede administrar tan a menudo como sea necesario para mantener un nivel aceptable del péptido catiónico aromático en el ojo. La administración a los ojos de los mamíferos puede ser aproximadamente una vez o dos veces al día.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en la forma de comprimidos, pastillas, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Como parte de la composición, se pueden incluir agentes de enlace farmacéuticamente compatibles, y/o los adyuvantes materiales. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o los compuestos de una

naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tales como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar en la forma de una pulverización de aerosol a partir de un dispensador o recipiente presurizado que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en U.S. Pat. No. 6,468,798.

La administración sistémica de un compuesto terapéutico como se describe en este documento también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración por vía transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para que la barrera sea permeada. Dichos penetrantes por lo general se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración por vía transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración por vía transmucosa se puede lograr a través del uso de aerosoles nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas que por lo general se conocen en la técnica. En una modalidad, la administración transdérmica se puede realizar por iontoforesis.

Una proteína o péptido terapéutico se puede formular en un sistema portador. El portador puede ser un sistema coloide. El sistema coloide puede ser un liposoma, un vehículo bicapa fosfolípido. En una modalidad, el péptido terapéutico se encapsula en un liposoma mientras que mantiene la integridad del péptido. Como un experto en la técnica apreciaría, existen una variedad de métodos para preparar los liposomas. (Véase Lichtenberg et al., *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988); Anselem et al., *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). Las formulaciones liposomales pueden retrasar la eliminación y aumentar la absorción celular (Véase Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8):915-923 (2000)). Un agente activo también se puede cargar en una partícula preparada a partir de ingredientes farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero no limitando a, polímeros o liposomas solubles, insolubles, permeables, impermeables, biodegradables o gastroretentivo. Tales partículas incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas, nanopartículas biodegradables, micropartículas, micropartículas biodegradables, nanoesferas, nanoesferas biodegradables, microesferas, microsferas biodegradables, cápsulas, emulsiones, liposomas, micelas y sistemas de vector viral.

El portador también puede ser un polímero, por ejemplo, una matriz de polímero biocompatible, biodegradable. En una modalidad, el péptido terapéutico puede ser embebido en la matriz de polímero, mientras que mantiene la integridad de la proteína. El polímero puede ser natural, tal como polipéptidos, proteínas o polisacáridos, o sintético, tal como ácidos poli- α -hidroxi. Ejemplos incluyen portadores fabricados de, por ejemplo, colágeno, fibronectina, elastina, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, polisacárido, fibrina, gelatina, y las combinaciones de los mismos. En una modalidad, el polímero es ácido poli-láctico (PLA) o ácido copoli-láctico/glicólico (PGLA). Las matrices poliméricas se pueden preparar y aislar en una variedad de formas y tamaños, incluyendo microsferas y nanoesferas. Las formulaciones del polímero pueden conducir a una duración prolongada del efecto terapéutico. (Véase Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8):915-923 (2000)). En pruebas clínicas se ha utilizado una formulación del polímero para la hormona de crecimiento humana (hGH). (Véase Kozarich and Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552 (1998)).

Ejemplos de formulaciones de liberación sostenida de microesferas de polímeros se describen en PCT publication WO 99/15154 (Tracy et al.), U.S. Pat. Nos. 5,674,534 y 5,716,644 (ambos para Zale et al.), PCT publication WO 96/40073 (Zale et al.), y PCT publication WO 00/38651 (Shah et al.). U.S. Pat. Nos. 5,674,534 y 5,716,644 y PCT publication WO 96/40073 describe una matriz polimérica que contiene partículas de eritropoyetina que están estabilizadas contra la agregación con una sal.

En algunas modalidades, los compuestos terapéuticos se preparan con portadores que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliacético. Tales formulaciones se pueden preparar utilizando técnicas conocidas. Los materiales también se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células específicas con anticuerpos monoclonales para antígenos específicos a las células) también pueden ser utilizadas como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, según se describe en U.S. Pat. No. 4,522,811.

Los compuestos terapéuticos también se pueden formular para mejorar la administración intracelular. Por ejemplo, se conocen en la técnica sistemas de administración liposomal, véase, *por ejemplo*, Chonn and Cullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems," *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708 (1995); Weiner, "Liposomes for Protein Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes," *Immunomethods* 4 (3) 201-9

(1994); and Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems," Trends Biotechnol. 13 (12):527-37 (1995). Mizguchi et al., Cancer Lett. 100:63-69 (1996), describe el uso de liposomas fusogénicos para administrar una proteína a las células tanto *in vivo* como *in vitro*.

La dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos se pueden determinar por medio de procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos altos. Aunque se pueden utilizar los compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirige tales compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios de animales se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para utilizar en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos de animales para lograr un rango de concentración en el plasma circulante que incluye la IC50 (*i.e.*, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión la dosis útil en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

Por lo general, una cantidad efectiva de los péptidos catiónicos aromáticos, suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, varía de aproximadamente 0.000001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 10,000 mg por kilogramo de peso corporal por día. Preferiblemente, los rangos de dosificación son de aproximadamente 0.0001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal cada día, cada dos días o cada tres días o dentro del rango de 1-10 mg/kg cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. En una modalidad, una dosificación única del péptido varía de 0.1-10,000 microgramos por kg de peso corporal. En una modalidad, las concentraciones del péptido catiónico aromático en un portador varían de 0.2 a 2000 microgramos por mililitro administrado. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por día o una vez a la semana. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica por las mediciones de los niveles en sangre de glucosa o insulina en el sujeto y ajustando la dosificación o administración en consecuencia. En aplicaciones terapéuticas, una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos algunas veces se necesita hasta que el progreso de la enfermedad se redujo o terminó, y preferiblemente hasta que el sujeto muestra mejora parcial o completa de síntomas de enfermedad. A partir de entonces, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

En algunas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido catiónico aromático se puede definir como una concentración de péptido al tejido diana de 10⁻¹¹ a 10⁻⁶ molar, por ejemplo, aproximadamente 10⁻⁷ molar. Esta concentración se puede administrar por medio de dosis sistémicas de 0.001 a 100 mg/kg o dosis equivalentes mediante el área superficial del cuerpo. La programación de la dosis se debería optimizar para mantener la concentración terapéutica al tejido diana, más preferiblemente mediante la administración de dosis única o semanalmente, pero también incluyendo la administración continua (por ejemplo, infusión parenteral o aplicación transdérmica).

En algunas modalidades, la dosificación del péptido catiónico aromático se provee a un nivel de dosis "bajo," "medio," o "alto". En una modalidad, la dosis baja se provee de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 0.5 mg/kg/h, apropiadamente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 mg/kg/h. En una modalidad, la dosis media se provee de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.0 mg/kg/h, en conformidad de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 mg/kg/h. En una modalidad, la dosis alta se provee de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mg/kg/h, en conformidad de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 mg/kg/h.

El experto apreciará que ciertos factores pueden influir la dosificación y el tiempo requerido para tratar efectivamente un sujeto incluyendo pero no limitando a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones terapéuticas descritas en este documento puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

El experto apreciará que ciertos factores pueden influir la dosificación y el tiempo requerido para tratar efectivamente un sujeto incluyendo pero no limitando a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad

terapéuticamente efectiva de las composiciones terapéuticas descritas en este documento puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

5 Los mamíferos tratados de acuerdo con los métodos actuales pueden ser cualquier mamífero, incluyendo, por ejemplo, animales de granja, tales como ovejas, cerdos, vacas, y caballos ; animales de compañía, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, tales como ratas, ratones y conejos. En una modalidad preferida, el mamífero es un ser humano.

Terapia de combinación con un péptido catiónico aromático y otros agentes terapéuticos

10 En ciertos casos, puede ser apropiado administrar al menos uno de los péptidos catiónicos aromáticos descritos en este documento (o una sal farmacéuticamente aceptable, éster, amida, profármaco, o solvato) en combinación con otro agente terapéutico. Solamente a modo de ejemplo, si uno de los efectos secundarios experimentados por un paciente al recibir uno de los péptidos catiónicos aromáticos en este documento es la inflamación, entonces puede ser apropiado administrar un agente antiinflamatorio en combinación con el agente terapéutico inicial. O, solamente a modo de ejemplo, la eficacia terapéutica de uno de los compuestos descritos en este documento se puede mejorar mediante la administración de un adyuvante (*i.e.*, el adyuvante por sí mismo solamente puede tener un beneficio terapéutico mínimo, pero en combinación con otro agente terapéutico, el beneficio terapéutico general para el paciente se mejora). O, solamente a modo de ejemplo, el beneficio experimentado por un paciente se puede aumentar por medio de la administración de uno de los compuestos descritos en este documento con otro agente terapéutico (que también incluye un régimen terapéutico) que también tiene beneficio terapéutico en la prevención o tratamiento de condiciones oftalmológicas. Solamente a modo de ejemplo, en un tratamiento para la degeneración macular que involucra la administración de uno de los péptidos catiónicos aromáticos descritos en este documento, el incremento del beneficio terapéutico también se puede producir al proporcionar al paciente con otros agentes terapéuticos o terapias para la degeneración macular. En cualquier caso, independientemente de la enfermedad oftálmica, trastorno o condición que se trata, el beneficio global experimentado por el paciente puede ser simplemente aditivo de los dos agentes terapéuticos o el paciente puede experimentar un beneficio sinérgico.

25 Los ejemplos específicos, no limitantes de posibles terapias de combinación incluyen el uso de al menos un péptido catiónico aromático con inductores de óxido nítrico (NO), estatinas, fosfolípidos cargados negativamente, antioxidantes, minerales, agentes antiinflamatorios, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de la matriz metaloproteinasas, y carotenoides. En varios casos, los agentes de combinación apropiados pueden caer dentro de las categorías múltiples (solamente a modo de ejemplo, la luteína es un antioxidante y un carotenoide). Además, los péptidos catiónicos aromáticos también pueden ser administrados con agentes adicionales que pueden proporcionar el beneficio para el paciente, incluyendo solamente a modo de ejemplo la ciclosporina A.

30 Además, los péptidos catiónicos aromáticos también se pueden utilizar en combinación con procedimientos que pueden proporcionar beneficio sinérgico o adicional para el paciente, incluyendo, solamente a modo de ejemplo, el uso de reoféresis extracorpórea (también conocida como filtración diferencial de membrana), el uso de telescopios en miniatura implantables, fotocoagulación con láser de drusas, y terapia de microestimulación.

35 Se ha demostrado que el uso de antioxidantes beneficia a los pacientes con distrofias y degeneraciones maculares. Véase, *por ejemplo*, Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001); Sparrow, et al., J. Biol. Chem., 278:18207-13 (2003). Ejemplos de apropiados antioxidantes que podrían ser utilizados en combinación con al menos un péptido catiónico aromático incluyen vitamina C, vitamina E, beta-caroteno y otros carotenoides, coenzima Q, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido (también conocida como Tempol), la luteína, hidroxitolueno butilado, resveratrol, un análogo de trolox (PNU-83836-E), y extracto de arándanos.

40 También se ha demostrado que el uso de ciertos minerales beneficia a los pacientes con distrofias y degeneraciones maculares. Véase, *por ejemplo*, Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001). Ejemplos de minerales apropiados que podrían ser utilizados en combinación con al menos un péptido catiónico aromático incluyen minerales que contienen cobre, tales como óxido cúprico; minerales que contienen Zinc, tales como óxido de zinc; y compuestos que contienen selenio.

45 También se ha demostrado que el uso de ciertos fosfolípidos cargados negativamente beneficia a los pacientes con distrofias y degeneraciones maculares. Véase, *por ejemplo*, Shaban & Richter, Biol. Chem., 383:537-45 (2002); Shaban, et al., Exp. Eye Res., 75:99-108 (2002). Ejemplos de apropiados fosfolípidos cargados negativamente que podrían ser utilizados en combinación con al menos un péptido catiónico aromático incluyen cardiolipina y fosfatidilglicerol. Los fosfolípidos neutros y/o cargados positivamente también pueden proporcionar beneficio a los pacientes con distrofias y degeneraciones maculares cuando se utilizan en combinación con los péptidos catiónicos aromáticos.

55 El uso de ciertos carotenoides se ha correlacionado con el mantenimiento de la fotoprotección necesaria en las células fotorreceptoras. Los carotenoides son pigmentos de origen natural de color amarillo a rojo del grupo

terpenoide que se puede encontrar en plantas, algas, bacterias, y ciertos animales, tales como aves y crustáceos. Los carotenoides son una clase grande de moléculas en las cuales se han identificado más de 600 carotenoides de origen natural. Los carotenoides incluyen hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados, alcohólicos (xantofilos). Estos incluyen actinioeritrol, astaxantina, cantaxantina, capsantina, capsorubina, β -8'-apo-carotenal (apo-carotenal), β -12'-apo-carotenal, α -caroteno, β -caroteno, "caroteno" (una mezcla de α - y β -carotenos), γ -carotenos, β -cirptoxantina, la luteína, licopeno, violeritrina, zeaxantina, y ésteres de miembros de los mismos que contienen hidroxilo- o carboxilo. Muchos de los carotenoides existen en la naturaleza como las formas cis- y transisoméricas, mientras que los compuestos sintéticos frecuentemente son mezclas racémicas.

En humanos, la retina acumula selectivamente principalmente dos carotenoides: la zeaxantina y la luteína. Estos dos carotenoides están pensados para ayudar en la protección de la retina ya que son poderosos antioxidantes y absorben la luz azul. Los estudios con codornices establecen que los grupos criados con dietas deficientes de carotenoides tuvieron retinas con bajas concentraciones de zeaxantina y sufrieron de daños de luz severos, como lo demuestra un número muy alto de células fotorreceptoras apoptóticas, mientras que el grupo con concentraciones altas de zeaxantina tuvieron un daño mínimo. Ejemplos de apropiados carotenoides en combinación con al menos un péptido catiónico aromático incluyen la luteína y zeaxantina, también como cualquiera de los carotenoides mencionados anteriormente.

Los inductores de óxido nítrico apropiados incluyen compuestos que estimulan el NO endógeno o niveles elevados del factor de relajamiento derivado del endotelio endógeno (*EDRF*) *in vivo* o son sustratos de óxido nítrico sintasa. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, L-arginina, L-homoarginina, y N-hidroxi-L-arginina, incluyendo sus análogos nitrosados y nitrosilados (*por ejemplo*, L-arginina nitrosada, L-arginina nitrosilada, N-hidroxi-L-arginina nitrosada, N-hidroxi-L-arginina nitrosilada, L-homoarginina nitrosada y L-homoarginina nitrosilada), los precursores de L-arginina y/o las sales de los mismos fisiológicamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, citrulina, ornitina, glutamina, lisina, polipéptidos que comprenden al menos uno de estos aminoácidos, inhibidores de la enzima arginasa (*por ejemplo*, N-hidroxi-L-arginina y ácido 2(S)-amino-6-boronoheptanoico) y los sustratos de óxido nítrico sintasa, citoquinas, adenosina, bradicina, calreticulina, bisacodilo, y fenoltaleína. EDRF es un factor relajante vascular secretado por el endotelio, y ha sido identificado como óxido nítrico o un derivado de los mismos estrechamente relacionados (Palmer et al, *Nature*, 327:524-526 (1987); Ignarro et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9265-9269 (1987)).

Las estatinas actúan como agentes reductores de lípidos y/o inductores de óxido nítrico apropiado. Además, se ha demostrado una relación entre el uso de la estatina y el retraso en la aparición o desarrollo de la degeneración macular. G. McGwin, et al., *British Journal of Ophthalmology*, 87:1121-25 (2003). Las estatinas por lo tanto pueden proporcionar beneficio a un paciente que sufre de una condición oftalmológica (tal como las distrofias y degeneraciones maculares, y las distrofias retinales) cuando se administra en combinación con los péptidos catiónicos aromáticos. las estatinas apropiadas incluyen, solamente a modo de ejemplo, rosuvastatina, pitivastatina, simvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatin, fluvastatina, compactina, lovastatina, dalvastatina, fluindostatina, atorvastatina, atorvastatina calcio (la cual es la sal hemicalcio de la atorvastatina), y la dihidrocompactina.

Los agentes antiinflamatorios apropiados con los cuales los péptidos catiónicos aromáticos se pueden utilizar incluyen, solamente a modo de ejemplo, la aspirina y otros salicilatos, cromolina, nedocromil, teofilina, zileuton, zafirlukast, montelukast, pranlukast, indometacina, e inhibidores de la lipoxigenasa; fármacos antiinflamatorios no-esteroidales (NSAIDs) (tales como ibuprofeno y naproxeno); prednisona, dexametasona, inhibidores de la ciclooxigenasa (*i.e.*, inhibidores de COX-1 y/o COX-2 tales como NaproxenTM, o CelebrexTM); estatinas (solamente a modo de ejemplo, rosuvastatina, pitivastatina, simvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatina, fluvastatina, compactina, lovastatina, dalvastatina, fluindostatina, atorvastatina, atorvastatina calcio (la cual es la sal hemicalcio de la atorvastatina), y los esteroides disociados.

Los inhibidores de las metaloproteinasas de las matrices (MMPs) apropiadas también se pueden administrar en combinación con los péptidos catiónicos aromáticos con el fin de tratar las condiciones oftalmológicas o los síntomas asociados con degeneraciones maculares o de la retina. Las MMPs son conocidas por hidrolizar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular. Estas proteinasas desempeñan un papel central en muchos procesos biológicos tales como la remodelación del tejido normal, la embriogénesis, la cicatrización de las heridas y la angiogénesis. Sin embargo, la expresión excesiva de MMP se ha observado en muchos estados de la enfermedad, incluyendo degeneración macular. Se han identificado muchas MMPs, la mayoría de los cuales son endopeptidasas con multidominio de zinc. Se conoce un número de inhibidores de la metaloproteinasa (véase por ejemplo la revisión de los inhibidores de MMP por Whittaker M. et al, *Chemical Reviews* 99(9):2735-2776 (1999)). Los ejemplos representativos de los Inhibidores de MMP incluyen Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas (TIMPs) (por ejemplo, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, o TIMP-4), α -2-macroglobulina, tetraciclinas (por ejemplo, tetraciclina, minociclina, y doxiciclina), hidroxamatos (por ejemplo, BATIMASTAT, MARIMISTAT y TROCADE), quelantes (*por ejemplo*, EDTA, cisteína, acetilcisteína, D-penicilamina, y sales de oro), fragmentos de MMP sintéticos, succinil mercaptopurinas, fosfonamidatos, y ácidos hidroxamínicos. Ejemplos de inhibidores de MMP que se pueden utilizar

en combinación con péptidos catiónicos aromáticos incluyen, solamente a modo de ejemplo, cualquiera de los inhibidores mencionados anteriormente.

También se ha demostrado que el uso de fármacos antiangiogénicos o anti-VEGF para proporcionar beneficio a los pacientes con distrofias y degeneraciones maculares. Ejemplos de fármacos apropiados antiangiogénicos o anti-VEGF que podrían ser utilizados en combinación con al menos un péptido catiónico aromático incluyen Rhufab V2 (Lucentis™), Triptofanil-tRNA sintetasa (TrpRS), Eye001 (Aptámero Pegilado Anti-VEGF), escualamina, Retaane™ 15 mg (acetato de anecortavo para suspensión de depósito; Alcon, Inc.), Profármaco de Combretastatina A4 (CA4P), Macugen™, Mifeprex™ (mifepristona--ru486), subtenon acetónido de triamcinolona, acetónido de triamcinolona cristalino intravítreo, Prinomastat (AG3340--inhibidor de la metaloproteínasa de la matriz sintética, Pfizer), acetónido de fluocinolona (incluyendo implante intraocular fluocinolona, Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), inhibidores de VEGFR (Sugen), y VEGF-Trap (Regeneron/Aventis).

Otras terapias farmacéuticas que han sido utilizadas para aliviar el deterioro visual se puede utilizar en combinación con al menos un péptido catiónico aromático. Tales tratamientos incluyen pero no se limitan a agentes tales como Visudyne™ con el uso de un láser no térmico, PKC 412, Endovion (NeuroSearch A/S), factores neurotróficos, incluyendo a modo de ejemplo Factor Neurotrófico Derivado de células Gliales y Factor Neurotrófico Ciliar, diatazem, dorzolamida, Phototrop, 9-cisretinal, medicación de los ojos (incluyendo Terapia Echo) incluyendo yoduro de fosfolina o ecotiofato o inhibidores de la anhidrasa carbónica, AE-941 (AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (Sirna Therapeutics, Inc.), pegaptanib (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), neurotrofinas (incluyendo, solamente a modo de ejemplo, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), ranibizumab (Genentech), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), antagonistas de la integrina (incluyendo los de Jerini AG y Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), talidomida (como se utiliza, por ejemplo, por EntreMed, Inc.), cardiotrofina-1 (Genentech), 2-metoxiestradiol (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), tetratiomolibdato (University of Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), compuesto microalgal (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group p1c), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzima/Celtrix), inhibidores de la tirosina quinasa (Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), neuroprotectores ganglionarios de células de la retina (Cogent Neurosciences), derivados de N-nitropirazol (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), y ciclosporina A.

En cualquier caso, los agentes terapéuticos múltiples se pueden administrar en cualquier orden o incluso simultáneamente. Si simultáneamente, los agentes terapéuticos múltiples se pueden proveer en una forma única, unificada, o en formas múltiples (solamente a modo de ejemplo, ya sea como una solución única o como dos soluciones separadas). Uno de los agentes terapéuticos se pueden dar en dosis múltiples, o ambos se pueden dar como dosis múltiples. Si no simultáneo, el tiempo entre la dosis múltiple puede variar de más de zero semanas a menos de aproximadamente cuatro semanas, menos de aproximadamente seis semanas, menos de aproximadamente 2 meses, menos de aproximadamente 4 meses, menos de aproximadamente 6 meses, o menos de aproximadamente un año. Además, los métodos de combinación, composiciones y formulaciones no deben limitarse al uso de solamente dos agentes. Solamente a modo de ejemplo, un péptido catiónico aromático se puede proveer con al menos un antioxidante y al menos un fosfolípido cargado negativamente; o un péptido catiónico aromático se puede proveer con al menos un antioxidante y al menos un inductor de la producción de óxido nítrico; o un péptido catiónico aromático se puede proveer con al menos un inductor de la producción de óxido nítrico y al menos un fosfolípido cargado negativamente; y así sucesivamente.

Además, un péptido catiónico aromático también se puede utilizar en combinación con procedimientos que pueden proporcionar beneficios adicionales o sinérgicos al paciente. Los procedimientos conocidos, propuestos o considerados para aliviar el deterioro visual incluyen pero no se limitan a "translocación de retina limitada", terapia fotodinámica (incluyendo, solamente a modo de ejemplo, PDT dirigido al receptor, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfímero de sodio para inyección con PDT; verteporfina, QLT Inc.; rostoporfina con PDT, Miravent Medical Technologies; talaporfina de sodio con PDT, Nippon Petroleum; motexafina lutetio, Pharmacyclics, Inc.), oligonucleótidos antisentido (incluyendo, a modo de ejemplo, los productos probados mediante Novagali Pharma SA y ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals), fotocoagulación con láser, láser de drusas, cirugía del agujero macular, cirugía de translocación macular, telescopios de miniatura implantables, Angiografía Phi-Motion (también conocida como Terapia Micro-Laser y Tratamiento Feeder Vessel), Terapia de Iones y Protones, terapia de microestimulación, Desprendimiento de la retina y Cirugía del Vitreo, Introflección Escleral, Cirugía Submacular, Termoterapia Transpupilar, terapia del Fotosistema I, uso de interferencia de ARN (iARN), reoféresis extracorpórea (también conocida como filtración diferencial de membrana y Reoterapia), implantación de microchip, terapia de células madre, terapia de reemplazo de genes, terapia de gen de ribozima (incluyendo terapia génica para el elemento de la hipoxia, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; terapia génica del PDEF, GenVec), trasplante de células retinales/fotoreceptor (incluyendo células epiteliales de la retina trasplantables, Diacrin, Inc.; trasplante de células de la retina, Cell Genesys, Inc.), y acupuntura.

Otras combinaciones que se pueden utilizar para beneficiar a un individuo incluyen el uso de pruebas genéticas para determinar si el individuo es un portador de un gen mutante que se sabe que se correlaciona con ciertas condiciones

oftalmológicas. Solamente a modo de ejemplo, se piensa que los defectos en el gen ABCA4 humano se asocian con cinco fenotipos distintos de la retina incluyendo enfermedad de Stargardt, distrofia de conos y bastones, degeneración macular relacionada con la edad y retinitis pigmentosa. Véase por ejemplo, Allikmets et al., *Science*, 277:1805-07 (1997); Lewis et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 64:422-34 (1999); Stone et al., *Nature Genetics*, 20:328-29 (1998); Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67:793-799 (2000); Klevering, et al., *Ophthalmology*, 11 1:546-553 (2004). Además, una forma dominante autosomal de la Enfermedad de Stargardt es causada por mutaciones en el gen ELOV4. Véase Karan, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). Se espera que los pacientes que poseen cualquiera de las mutaciones encuentren beneficio terapéutico y/o profiláctico en los métodos descritos en este documento.

EJEMPLOS

10 La presente invención además se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Ejemplo Referencia 1 - Prevención de lesión inducida por glucosa alta de células epiteliales de la retina humana

Los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención de lesión inducida por alto contenido de glucosa en células epiteliales de la retina humana (HREC) se investigaron en HRECs cultivadas.

15 Los métodos del cultivo de HREC útiles en los estudios de la presente invención se conocen. Véase generalmente, Li B, Tang SB, Zhang G, Chen JH, Li BJ. Culture and characterization of human retinal capillary endothelial cell. *Chin Ophthal Res* 2005; 23: 20-2; Premanand C, Rema M, Sameer MZ, Sujatha M, Balasubramanyam M. Effect of curcumin on proliferation of human retinal endothelial cells under in vitro conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2179-84.

20 En resumen, las células HREC se dividieron en tres grupos: un grupo control normal; un grupo se administró con glucosa 30 mM; y un grupo se administró con glucosa 30 mM + SS-31. Se midió la supervivencia de HRECs en alto contenido de la glucosa co-tratada con diferentes concentraciones de SS-31 (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M) utilizando un ensayo Annexin V+PI y citometría de flujo. Véase generalmente, Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., and van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415; Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., and Roos, D. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 85: 532; Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184: 39; Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207.

35 La supervivencia de HRECs en alto contenido de glucosa co-tratada con SS-31 se analizó a las 24 h y 48 h. Los resultados se muestran en la FIG. 1, e indican que la supervivencia de HRECs se mejoró significativamente con la administración de SS-31, con una reducción de las células apoptóticas y necróticas. El tratamiento de SS-31 también reduce la producción de ROS (FIG. 2).

40 Se examinó la evaluación de SS-31 como un protector contra la pérdida potencial mitocondrial de HRECs tratadas con alto contenido de glucosa. Para determinar si una ruta mediada por las mitocondrias fue importante en el efecto protector de SS31 contra la muerte celular inducida por el contenido alto de glucosa, $\Delta\Psi_m$ se midió mediante citometría de flujo. Después del tratamiento las HRECs con alto contenido de glucosa sin SS31, durante 24 o 48 horas, se detectó una rápida pérdida de potencial de la membrana mitocondrial por sonda fluorescente JC-1 como se indica mediante una disminución significativa de la proporción de fluorescencia rojo a verde observada en el grupo de alta glucosa. En contraste, $\Delta\Psi_m$ en el grupo co-tratado con SS31 100 nM permaneció virtualmente sin cambios y fue comparable con el grupo control de glucosa normal (FIG. 3). Estos datos sugieren que SS31 impidió la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial causada por exposición a un ambiente de alto contenido de glucosa.

50 La glucosa (30 mmol/L) indujo la liberación del citocromo c de las mitocondrias de HRECs. Las HRECs fijadas fueron inmunomarcadas con un anticuerpo de citocromo c y un anticuerpo de proteína específica mitocondrial (HSP60). El análisis microscópico confocal mostró que HRECs en cultivo normal y en SS-31 co-tratado con glucosa tienen tinción de citocromo c y tinción de mitocondrias solapantes, indicando la colocalización del citocromo c y las mitocondrias (FIG. 4). Después del tratamiento con glucosa 30 mmol/L, durante 24 h o 48 h, algún citocromo c se observó en el citoplasma de HRECs, indicando que la glucosa induce la liberación del citocromo c de las mitocondrias al citoplasma en las células HREC, pero SS-31 puede disminuir dicha translocación entre las mitocondrias y el citoplasma.

La prevención de la liberación del citocromo c de las mitocondrias resultó en una reducción de la actividad de la caspasa-3. Como se muestra en la FIG. 5, SS-31 disminuyó la expresión de la proteína de la caspasa-3 en HRECs tratadas con un alto contenido de la glucosa. El nivel de escisión de la expresión de la caspasa-3 de la proteína se midió mediante Western blot (FIG. 5A). Cuando HRECs fueron expuestas a glucosa 30 mM durante 24 h y 48 h, aumentó considerablemente el nivel de expresión de la caspasa-3. Al mismo tiempo, en el grupo co-tratado con SS-31, mostró una marcada disminución del nivel de proteína caspasa-3 (*p<0.05). La FIG. 5B muestra un análisis cuantitativo del nivel de expresión de la caspasa-3 de HRECs en alto contenido de glucosa co-tratado con SS-31, durante 24 y 48h.

SS-31 aumentó la expresión de Trx2 en las HRECs tratadas con alto contenido de la glucosa. La FIG. 5C muestra el nivel de ARNm de Trx2 en HRECs expuesto a glucosa 30 mM co-tratado con SS-31, durante 24 h y 48 h. El nivel de expresión de ARNm de Trx2 se midió mediante PCR a tiempo real cuantitativo. Los niveles de ARNm relativos de Trx2 fueron normalizados por los niveles de ARNm 18S (* p<0.05 vs. el grupo medio de glucosa normal y el grupo tratado con alto contenido de glucosa 30 mM). Tres muestras independientes se utilizaron para cada punto de tiempo. La FIG. 5D muestra el nivel de expresión de la proteína de Trx2 como se mide por medio de Western blot. La expresión de la proteína de Trx2 en el grupo de alto contenido de la glucosa co-tratado con SS-31 aumentó significativamente en comparación con el grupo de glucosa normal (*p<0.05). La FIG. 5E muestra el análisis cuantitativo del nivel de proteína de Trx2 en HRECs 24 y 48 h después del tratamiento con un alto contenido de la glucosa con o sin SS-31.

Estos resultados indican que SS-31 puede promover la supervivencia de las células HREC en un ambiente de contenido alto de glucosa. Como tal, SS-31 y otros péptidos catiónicos aromáticos pueden ser útiles en los métodos para la prevención de retinopatía diabética.

Ejemplo Referencia 2 - Prevención de la retinopatía diabética en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa

Los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención del desarrollo de retinopatía diabética se investigaron en un modelo de rata Sprague-Dawley. El ejemplo describe los resultados de tales experimentos.

Un modelo en rata de diabetes se estableció mediante la combinación de 6-semanas de HFD y dosis baja de STZ (30 mg/kg) inyección o una sola dosis alta de STZ (65 mg/kg) en ratas SD. Véase *generalmente*, K. Srinivasan, B. Viswanad, Lydia Asrat, C.L. Kaul and P. Ramarao, Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening, *Pharmacological Research*, 52(4): 313-320, 2005. Ratas del mismo lote alimentadas con pienso normal (NRC) se utilizaron como un control. Las Tablas 7-10 muestran el cronograma terapéutico y el protocolo experimental.

TABLA 7. Grupos de Tratamiento - Modelo HFD/STZ

Grupo	Número de Ratas	Modelo	Tratamiento	Dosificación y Ruta
A	12	HFD/STZ	SS-31	10 mg/kg s.c
B	12	HFD/STZ	SS-31	3 mg/kg s.c.
C	12	HFD/STZ	SS-31	1 mg/kg s.c.
D	10	HFD/STZ	SS-20	10 mg/kg s.c.
E	10	HFD/STZ	SS-20	3 mg/kg s.c.
F	10	HFD/STZ	Solución salina	Vol. igual s.c.
G	10	NRC	Solución salina	Vol. igual s.c.

35

TABLA 8. Horario Terapéutico - Modelo HFD/STZ

Duración	Objetivo	Grupos Diabéticos (A,B,C,D,E,F)	Grupo Control (G)
1ª Semana	Aclimatación	Alimentación Normal de Rata	
2ª - 7ª Semana	Manipulación de la Dieta	Dieta Alta en Grasa	Alimentación Normal de Rata
Final de 7ª Semana	Inyección STZ	STZ 30 mg/kg, i.p., una vez	Solución reguladora de citrato
8ª - 27 Semana	Inducción de Diabetes	Dieta alta en grasa hasta la semana 21, luego se cambia a alimentación normal de rata	Alimentación Normal de Rata
Semana 28 - 37	Tratamiento Peptídico	Tratamiento Peptídico (ver Tabla 7)	Grupo G: 2 mL/kg, s.c.
Semana 38	Muestras de sangre y orina recolectadas a las 24h, y órganos vitales recolectados		

TABLA 9. Grupos de Tratamiento - Modelo STZ

Grupo	Número de Ratas	Modelo	Tratamiento	Dosificación y Ruta
A	11	Diabetes	SS-31	10 mg/kg s.c
B	11	Diabetes	SS-20	10 mg/kg s.c.
C	10	Diabetes	Solución salina	Vol. igual s.c.
D	10	Normal	Solución salina	Vol. igual s.c.

5

TABLA 10. Horario Terapéutico - Modelo STZ

Duración	Objetivo	Grupos Diabéticos (A,B,C)	Grupo Control (D)
1ª y 3ª Semana	Aclimatación	Alimentación Normal de Rata	
Final de 3ª Semana	Inyección STZ	STZ 30 mg/kg, i.p., una vez	Solución reguladora de citrato
4ª - 18ª Semana	Inducción de Complicaciones Diabéticas	Alimentación Normal de Rata	
Semana 19 - 19	Tratamiento Peptídico	Tratamiento Peptídico (ver Tabla 9)	Grupo D: 2 mL/kg, s.c.
Semana 29	Muestras de sangre y orina recolectadas a las 24h, y órganos vitales recolectados		

De acuerdo con el protocolo experimental que se acaba de describir, se demostraron los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos en las condiciones de tratamiento asociadas con la diabetes en un modelo en rata SD. La administración de SS-20 y SS-31 resultó en la prevención o inversión de la formación de cataratas en las lentes de ratas diabéticas (FIGs. 6 y 7, Tablas 11 y 12).

5

TABLA 11. Modelo en Rata HFD/STZ

Grupo	Grado de turbidez					Porcentaje de opacidad (%)	Porcentaje de opacidad intensa (%)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	4	0	0	0	0	0	0
HFD/STZ	1	0	2	3	0	83.3	0
SS20 3mg	1	1	1	0	1	75.0	25.0
SS20 10mg	1	2	1	0	0	75.0	0
SS31 1mg	1	1	1	0	0	67.7	0
SS31 3mg	3	1	0	0	1	20.0	20.0
SS31 10mg	6	1	0	0	0	14.3	0

-: transparente;

+: suavemente opacas;

++: opacas;

+++ : moderadamente opacas;

++++: intensamente opacas

TABLA 12. Modelo en Rata STZ

Grupo	Grado de opacidad					Porcentaje de opacidad (%)	Porcentaje de opacidad intensa (%)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	6	0	0	0	0	0	0
STZ	1	0	0	1	3	80.0	60.0
SS20 10mg	2	0	2	0	1	60.0	20.0
SS31 10mg	2	2	0	0	1	60.0	20.0

10 Se investigó el efecto de los péptidos catiónicos aromáticos sobre el epitelio del cristalino en el modelo de rata SD. La administración de SS-31 redujo los cambios celulares epiteliales en ambos el modelo en rata STZ (FIG. 8) y el modelo en rata HFD/STZ (FIG. 9).

Se investigó el efecto de los péptidos catiónicos aromáticos sobre la función de la barrera retina-sangre interna en el modelo en rata SD. La administración de SS-20 y SS-31 dio lugar a la mejora de la función de la barrera-sangre interna en comparación con las ratas en un HFD no administrado SS-20 o SS-31 (FIG. 10).

15 Se investigó el efecto de los péptidos catiónicos aromáticos sobre los microvasos de la retina en el modelo en rata SD (FIGs. 11-12). La administración de SS-31 redujo los cambios microvasculares de la retina observados en ratas STZ o HFD/ STZ.

Se investigó el efecto de los péptidos catiónicos aromáticos sobre la distribución de proteína de unión hermética claudina-5 en los microvasos de la retina en el modelo en rata SD. La distribución de la proteína de unión hermética claudina-5 se detectó con un microscopio confocal (FIG. 13). Las claudina-5 se distribuyó a lo largo de los vasos de la retina suavemente, de forma lineal, y de manera uniforme en ratas normales (A), pero la forma lineal se rompió en la rata STZ (B, flecha). La distribución de claudina-5 sobre los vasos de la retina en ratas STZ tratadas con SS-20 (10 mg/kg) o SS-31 (10 mg/kg) fue similar a la de la rata normal (Páneos C y D, respectivamente).

En resumen, estos hallazgos establecen colectivamente que los péptidos catiónicos aromáticos, ya sea previenen o compensan los efectos negativos de la diabetes en el ojo, por ejemplo, cataratas y microvasculaturas. Como tal, la administración de los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención es útil en los métodos de prevención o tratamiento de condiciones oftalmológicas asociadas con la diabetes en sujetos humanos.

Ejemplo Referencia 3 - SS-31 previene el estrés oxidativo en glaucomatosas células de la red trabecular.

Los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención o tratamiento del glaucoma se investigaron mediante el estudio de los efectos de los péptidos en glaucomatosas células de la red trabecular. El glaucoma es la segunda causa de ceguera irreversible en todo el mundo. El glaucoma de ángulo abierto primario (POAG) es el principal subtipo de glaucoma. En POAG, no existe anomalía visible de la red trabecular. Sin embargo, se cree que la capacidad de las células en la red trabecular para llevar a cabo su función se deteriora.

En este ejemplo, los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención se compararon entre células de la red trabecular de pacientes con POAG (GTM) y células de la red trabecular de individuos no enfermos (HTM). Los métodos útiles en los estudios de la presente invención se han descrito. Véase *generalmente*, He Y, Ge J, Tombran-Tink J., Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells. Invest Oph-thalmol Vis Sci. 2008, 49(11):4912-22; He Y, Leung KW, Zhang YH, Duan S, Zhong XF, Jiang RZ, Peng Z, Tombran-Tink J, Ge J. Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008, 49(4):1447-58. Las células GTM muestran un significativo deterioro del potencial de la membrana mitocondrial en comparación con las células HTM (FIG. 18).

Las células se dividieron en tres grupos: "Grupo A" las células fueron expuestas a peróxido de hidrógeno antes de la administración de SS-31. "Grupo B" las células fueron expuestas a SS-31 antes de la administración del peróxido de hidrógeno. "Grupo C" las células se les administró SS-31 y peróxido de hidrógeno simultáneamente.

Para evaluar si SS-31 tiene efectos citotóxicos de las células GTM o HTM, se administraron varias concentraciones de SS-31 a las células y la citotoxicidad se midió utilizando un ensayo LDH. Un ensayo de citotoxicidad de LDH es un método colorimétrico de evaluación de citotoxicidad celular. El ensayo mide cuantitativamente la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) estable, citosólica, que se libera de las células dañadas. La LDH liberada se mide con una reacción enzimática acoplada que resulta en la conversión de una sal de tetrazolio (yodonitrotetrazolio (INT)) en un color rojo formazán por diaforasa. Los métodos para detectar LDH de las células útiles en los estudios de la presente invención son conocidos. Véase *generalmente*, Haslam, G. et al. (2005) Anal. Biochem. 336: 187; Tarnawski, A. (2005) Biochem. Biophys. Res. Comm. 333: 207; Round, J. L et al. (2005) J. Exp. Med. 201: 419; Bose, C. et al. (2005) Am. J. Physiol. Gastr. L. 289: G926; Chen, A. y Xu, J. (2005) Am. J. Physiol. Gastr. L. 288: G447. La actividad de LDH se determina como oxidación de NADH o reducción de INT sobre un periodo de tiempo definido. Los resultados se muestran en la FIG. 14 e indican que SS-31 no afecta la viabilidad de las células HTM y GTM.

Los métodos para medir el potencial de la membrana mitocondrial utilizando TMRM, útiles en los estudios de la presente invención se han descrito por Andrea Rasola and Massimo Geuna, A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters, Cytometry 45:151-157, 2001; Mitoprobe™ JC-1 Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes, Invitrogen, USA. La FIG. 16 muestra los resultados en células GTM. Colectivamente, estos resultados establecen que el tratamiento con SS-31 mejora el potencial de la membrana mitocondrial de células que fueron expuestas a peróxido de hidrógeno antes de la administración de SS-31.

Grupo A. El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de las células HTM y GTM se investigó cuando las células fueron expuestas a peróxido de hidrógeno antes de la administración de SS-31. En primer lugar, el potencial de la membrana mitocondrial se midió utilizando microscopía confocal de células marcadas con tetrametilrodamina metil éster (TMRM, 500 nM x 30 min) (FIG. 15). El potencial de la membrana mitocondrial también se midió utilizando citometría de flujo (FIGS. 16-17) marcando las células con la sonda selectiva a la mitocondrias tetrametilrodamina metil éster (TMRM, 500 nM x 30 min).

Grupo B. La morfología de las células GTM se investigó cuando las células fueron expuestas a SS-31 antes de la administración de peróxido de hidrógeno. La FIG. 18 muestra los resultados de microscopía de contraste de fase invertida de células administradas a varias concentraciones de SS-31. Los resultados indican que SS-31 protege las células de cambios morfológicos mediados por peróxido de hidrógeno de una manera dependiente de la

concentración y dependiente del tiempo. Es decir, el peróxido de hidrógeno media la pérdida de células y el redondeo fue disminuido en células expuestas a un péptido SS-31. El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de las células HTM y GTM también se investigó cuando las células fueron expuestas a SS-31 antes de la administración de peróxido de hidrógeno. El potencial de la membrana mitocondrial se midió utilizando microscopía confocal de células marcadas con tetrametilrodamina metil éster (TMRM, 500 nM x 30 min) (FIG. 19-21). Estos resultados muestran que el pre-tratamiento con SS-31 dependiente de la dosis mejora el potencial de la membrana mitocondrial de células que fueron expuestas a peróxido de hidrógeno. Como tal, SS-31 provee un efecto protector contra el estrés oxidativo en células GTM.

Se investigaron los efectos de SS-31 en la mitigación de la lesión oxidativa aguda en células GTM y HTM. La FIG. 36 muestra la intensidad de la fluorescencia de TMRM de células GTM y HTM utilizando un análisis FACS. El porcentaje de intensidad de la fluorescencia en comparación con GTM control en H_2O_2 , SS-31 $10^{-6}M$, SS-31 $10^{-7}M$, SS-31 $10^{-8}M$ fueron $35.2 \pm 2.12\%$, $56.2 \pm 4.04\%$, $50.3 \pm 4.46\%$, $47.5 \pm 2.82\%$ respectivamente, $n=4$; los grupos de HTM fueron $37.4 \pm 0.725\%$, $57.7 \pm 1.80\%$, $50.6 \pm 3.06\%$, $49.4 \pm 2.27\%$ respectivamente, $n=4$. ** significa $P<0.01$ en comparación con el grupo GTM H_2O_2 ; * significa $P<0.05$ en comparación con grupo GTM H_2O_2 ; $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle$ significa $P<0.001$ en comparación con grupo HTM H_2O_2 .

La FIG. 37 muestra la intensidad de la fluorescencia de ROS de las células GTM y HTM en grupos tratados con SS-31 y control utilizando el análisis FACS. El porcentaje de producción de ROS intracelular en comparación con GTM control en los grupos GTM H_2O_2 , SS-31 $10^{-6}M$, SS-31 $10^{-7}M$, SS-31 $10^{-8}M$ fueron $146.0 \pm 2.27\%$, $84.5 \pm 8.75\%$, $102.0 \pm 5.69\%$, $133.0 \pm 5.17\%$ respectivamente ($n=3$); los grupos HTM fueron $153.0 \pm 3.46\%$, $79 \pm 2.39\%$, $91.8 \pm 3.49\%$, $129.0 \pm 8.24\%$ respectivamente ($n=4$). $P<0.001$ GTM y Grupo HTM H_2O_2 en comparación con el control; *** significa $P<0.001$ en comparación con el grupo GTM H_2O_2 ; $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle$ Significa $P<0.001$ en comparación con el grupo HTM H_2O_2 ; $\blacktriangle \blacktriangle$ significa $P<0.01$ en comparación con el grupo HTM H_2O_2 . La FIG. 38 muestra que SS-31 redujo la cantidad de apoptosis celular inducida por H_2O_2 .

Se examinaron los efectos de SS-31 sobre la lesión oxidativa sostenida de las células GTM y HTM. Las células se pre-trataron con 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M de SS-31 por 1 h, y luego se incubaron con H_2O_2 200 mM, durante 24 h para investigar el efecto protector de SS-31 en estrés oxidativo sostenido. La FIG. 39 y la Tabla 13 muestran los efectos de SS-31 en la producción de ROS de lesión oxidativa sostenida de las células GTM y HTM. La FIG. 40 y la Tabla 14 muestran el cambio de MMP en células GTM y HTM en cada grupo de tratamiento.

Tabla 13. Producción de ROS en células GTM3 e iHTM tratadas con H_2O_2 .

	H_2O_2 -Ctrl (%)	SS-31		
		1 μM (%)	0.1 μM (%)	0.01 μM (%)
GTM3	376.80 ± 17.47	$47.40 \pm 1.81^{***}$	$68.91 \pm 8.62^{***}$	$133.70 \pm 3.24^{***}$
iHTM	388.50 ± 5.54	$36.91 \pm 1.47^{***}$	$82.89 \pm 3.70^{***}$	$114.30 \pm 3.89^{***}$

Tabla 14. Descenso de MMP en células GTM3 e iHTM tratadas con H_2O_2 .

	H_2O_2 -Ctrl (%)	SS-31		
		1 μM (%)	0.1 μM (%)	0.01 μM (%)
GTM3	-39.67 ± 2.33	$-24.3364.18^*$	$-29.3362.19^*$	$-31.3361.20^*$
iHTM	$-69.5362.01$	$-44.9962.19^{***}$	$-53.2462.52^{**}$	$-58.2462.62^*$

Colectivamente, estos resultados demuestran que SS-31 no tiene citotoxicidad a 10^{-4} M para ambas células GTM y HTM y que el estrés oxidativo agudo y sostenido inducido por el peróxido de hidrógeno se puede impedir por SS-31 ($> 10^{-9}$ M). Como tal, los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención son útiles en métodos de prevención o tratamiento del glaucoma en sujetos humanos.

Ejemplo Referencia 4 - SS-31 previene el estrés oxidativo en células epiteliales de pigmento retinal primarias.

Las células epiteliales de pigmento retinal primario (RPE) se cultivaron para probar los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención o reducción del daño oxidativo en estas células. Se han descrito los métodos útiles para el estudio de células epiteliales de pigmento retinal primario. Véase, Dunn et al., ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties, *Experimental Eye Research*, 1996, 62(2): 155-170. En primer lugar, se demostró que SS-31 no afectó negativamente estas células. Las células RPE humanas cultivadas primarias fueron incubadas con diferentes concentraciones de SS-31 solo por un periodo de 24 h, y la viabilidad celular se determinó por medio de un ensayo MTT (FIG. 22).

A continuación, la viabilidad de células RPE primarias se probó en la presencia de tBHP y varias concentraciones de SS-31. Las células se sembraron en placas a 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se cultivaron, durante 24 h, a continuación, se dejaron carentes de nutrientes durante 24 h. Después de esto, las células fueron expuestas a aumentos de las concentraciones de tBHP (FIG. 23A), o se preincubaron por 4 h con diferentes concentraciones de SS-31, luego se estimularon con tBHP por 6 h (FIG. 23B). Estos resultados indican que SS-31 mejoró la viabilidad celular en respuesta a la administración de tBHP. La producción de ROS intracelular en tres grupos de células RPE también se examinó utilizando un análisis FACS. La FIG. 31A muestra la producción de ROS en células RPE control; La FIG. 31B muestra la producción de ROS en células RPE tratadas con tBHP 500 μ M, durante 3 h; y La FIG. 31C muestra la producción de ROS en células RPE tratadas con tBHP 500 μ M, durante 3 h y SS-31 1 μ M. La FIG. 32 muestra MMP marcado por JC-1 en un análisis FACS. Se analizaron tres diferentes concentraciones de grupos SS-31. La proporción de rojo a verde en tBHP 500 μ M, para el grupo de 3 h es 1.08, la proporción de rojo a verde en SS-31 10 nM por 4 h + tBHP 500 μ M, para el grupo de 3 h es 1.25; la proporción de rojo a verde en 100 nM SS-31 por 4hr + TbhP 500 μ M para el grupo de 3 h es 1.4; y la proporción de rojo a verde en SS-31 1 μ M, durante 4 h + tBHP 500 μ M, para el grupo de 3 h es 2.28. La FIG. 33 muestra el efecto de SS-31 1 μ M en la disminución de MMP inducida por tBHP. La FIG. 33A: Grupo control, R/G es 3.63 ± 0.24 ; La FIG. 33B: tBHP 500 μ M, para el grupo de 3 h, R/G es 1.08 ± 0.11 ; La FIG. 33C: SS-31 1 μ M, durante 4 h + tBHP 500 μ M, para el grupo de 3 h, R/G es 2.38 ± 0.18 . La FIG. 33D es un gráfico de comparación de la proporción de fluorescencia para los diferentes grupos. * $P < 0.01$, C vs. B.

La FIG. 34 muestra el efecto de SS-31 sobre la apoptosis celular inducida por tBHP 250 μ M, durante 24 h. La FIG. 34A: grupo control; (Q2+Q4)% = $1.27 \pm 0.3\%$; La FIG. 34B: tBHP 250 mM, durante 24 h grupo; (Q2+Q4)% = $15.760.6\%$; FIG. 34C: SS-31 1 mM, durante 4 h + tBHP 250 μ M, para el grupo de 24 h; (Q2+Q4)% = $8.4 \pm 0.8\%$. La FIG. 34D es un gráfico de comparación de la proporción de fluorescencia para los diferentes grupos. * $P < 0.05$ C vs. B. FIG. 35 es un gráfico que muestra el nivel de MDA inducida por tBHP en 3 grupos de células RPE. (* $P < 0.05$).

Colectivamente, estos resultados demuestran que SS-31 previene el estrés oxidativo en células epiteliales de pigmento retinal primario. Como tal, los péptidos catiónicos aromáticos de la presente invención son útiles en métodos de prevención o tratamiento del daño a las células de la retina en sujetos humanos.

Ejemplo 5 - Prevención y tratamiento de neovascularización coroidea por los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en un modelo en ratón de cnv

Para demostrar aún más la prevención de neovascularización coroidea (CNV), por una parte, y el tratamiento de CNV por otra parte, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención se probaron en un modelo en ratón de CNV (FIG. 24). CNV fue inducida en el ojo con quemaduras de láser. Los métodos útiles en los actuales estudios se han descrito por Reich, *Mol Vis* 2003; 9:210-216.

En resumen, ratones machos C57BL/6 de cinco a seis-semanas se anestesiaron con hidrato de cloral y las pupilas se dilataron con tropicamida. Con un cobreobjeto utilizado como una lente de contacto, cuatro puntos de láser (532 nm, 260 mw, 0.01s, 50 μ m; Novus Spectra, Lumenis, USA) se aplicaron al fondo en un círculo al rededor del disco óptico en el ojo derecho. Las inyecciones intraperitoneales diarias de 1 mg/kg, 9 mg/kg de SS-31 o vehículo se iniciaron el día antes de la fotocoagulación con láser.

Después de una semana, los ratones se anestesiaron profundamente y fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 1 ml (50 mg/ml) de solución reguladora-PBS fluoresceína- dextrán. Los ojos fueron enucleados y se fijaron en 4% de paraformaldehído, durante 2 h. Los ojos se seccionaron en el ecuador, y se retiraron la mitad anterior y la retina. El segmento posterior del ojo que contiene la esclerótica y las coroides se disecaron en cuartos por cuatro a cinco cortes radiales y se montaron en un portaobjetos. Todos los montajes planos se examinaron mediante un microscopio de fluorescencia (AxioCam MRC; Carl Zeiss). Se utilizó el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) para medir el área de cada lesión de CNV.

Había 48 lugares de neovascularización en cada grupo. El área de neovascularización se calculó utilizando el software IMAGE-PROPLUS 6.0. El área de neovascularización en el modelo de CNV, 1 mg/kg de SS-31 y grupos de 9 mg/kg de SS-31 fueron 0.0130 ± 0.0034 , 0.0068 ± 0.0025 , 0.0067 ± 0 , respectivamente. Estos resultados indican que las dos concentraciones de SS-31 redujeron significativamente el área de neovascularización coroidea ($P < 0.05$) (FIG. 24).

Ejemplo 6 - Prevención y tratamiento de retinopatía inducida por el oxígeno (oir) por medio de péptidos catiónicos aromáticos de la invención en un modelo en ratón de oir

Para demostrar aún más la prevención de la retinopatía inducida por el oxígeno (OIR), los péptidos catiónicos aromáticos de la invención se probaron en un modelo en ratón de OIR (FIG. 25). En este modelo, crías de ratón de 7 días con vasculatura retinal parcialmente desarrollada se sometieron a hiperoxia (75% de oxígeno) durante 5 días, lo que detiene el crecimiento de vasos de la retina y causa una obliteración del vaso significativo. En el día postnatal 12, las crías se devolvieron al aire ambiente, y por el día postnatal 17, se produjo una neovascularización retinal compensatoria florida. Este modelo de neovascularización patológica se ha utilizado ampliamente como un sustituto para la retinopatía diabética proliferativa (DR).

Para examinar los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención de OIR, OIR fue inducida en crías de ratón y a los ratones se les administró de forma simultánea un péptido catiónico aromático (por ejemplo, SS-20 o SS-31) por aproximadamente 6 semanas. Los resultados se muestran en la FIG. 26 e indican que el tratamiento con SS-31 impidió la neovascularización de la retina compensatoria. Como tal, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención son útiles en métodos de prevención retinopatía diabética proliferativa en sujetos mamíferos.

Ejemplo 7 - Antioxidantes reducen la muerte de células fotorreceptoras en un modelo de retinitis pigmentosa.

Una línea específica de células de cono 661 W se derivó de un tumor retinal en ratón. Los métodos útiles en los actuales estudios de células 661 W se han descrito previamente. Véase *generalmente*, Gearóid Tuohy, Sophia Millington-Ward, Paul F. Kenna, Peter Humphries and G. Jane Farrar, Sensitivity of Photoreceptor-Derived Cell Line (661 W) to Baculoviral p35, ZVAD, FMK, and Fas-Associated Death Domain, Investigative Ophthalmology and Visual Science. 2002;43:3583-3589. Estas células se cultivaron para probar los efectos de los péptidos catiónicos aromáticos de la invención en la prevención o la reducción del daño oxidativo en las células de cono (FIG. 27). En primer lugar, se demostró que tBHP afectó la supervivencia de las células 661 W (FIG. 27A). Se administraron diferentes dosis de tBHP a las células, durante 3 h. A continuación, se demostró que diferentes dosis de SS-31 redujeron la muerte de las células 661 W inducida por tBHP (FIG. 27B).

El potencial de SS-31 para proteger contra la pérdida de viabilidad mitocondrial inducida por tBHP, SS-31 100 nmol/L se administró a los cultivos de células 661w. Los resultados se muestran en la FIG. 30 e indican que SS-31 mejoró significativamente la viabilidad mitocondrial en comparación con las células no administradas SS-31, como se muestra por un ensayo JC-1.

Ejemplo Referencia 8 - Efectos de ss-31 en un modelo en ratón de degeneración de la retina.

Para demostrar aún más la prevención de degeneración de la retina, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención se probaron en un modelo en ratón de degeneración de la retina. CNV se induce en el ojo con quemaduras de láser. (ver Ejemplo 5). Los modelos en ratón de degeneración de la retina se han investigado por muchos años con la esperanza de comprender las causas de muerte de células fotorreceptoras. Los mutantes de ratón de origen natural que manifiestan la degeneración de fotorreceptores en la retina con preservación de todos los otros tipos de células retinales se han encontrado: degeneración de la retina (anteriormente *rd*, idéntica a la retina sin vástago, *r*, ahora *Pde6b rd1*); degeneración de la célula Purkinje (*pcd*); nervios (*nr*); degeneración de la retina lenta (*rds*, ahora *Prph Rd2*); degeneración de la retina 3 (*rd3*); degeneración motoneurona (*mnd*); degeneración de la retina 4 (*Rd4*); degeneración de la retina 5 (*rd5*); vitiligo (*vit*, ahora *Mitf mi-vit*); degeneración de la retina 6 (*rd6*); degeneración de la retina 7 (*rd7*); lipofuscinosis ceroides neuronal (*nclf*); degeneración de la retina 8 (*rd8*); degeneración de la retina 9 (*Rd9*); degeneración de la retina 10 (*rd10*); y pérdida de la función fotorreceptora del cono (*cpfl1*).

FIG. 28 es una serie de micrográficos que muestra el espesor de la capa nuclear exterior retinal (ONL) en un modelo en ratón de degeneración de la retina en ratones tratados con SS-31 y control. Los resultados indican que los ratones tratados con SS-31 retuvieron un mayor número de filas de células en la ONL en comparación con ratones sin tratar. Montajes planos de la retina de aglutinina de cacahuete (PNA), que tiñe selectivamente los segmentos interiores y exteriores del núcleo también muestran que densidad de la célula de cono es mayor en ratones tratados con SS-31 (FIG. 29). Estos resultados indican que el tratamiento con SS-31 impidió el daño compensatorio a la capa nuclear exterior retinal en un modelo en ratón de degeneración de la retina. Como tal, los péptidos catiónicos aromáticos de la invención son útiles en métodos de prevención degeneración de la retina en sujetos mamíferos.

Equivalentes

La presente invención no debe ser limitante en términos de las modalidades particulares descritas en esta solicitud, que pretenden ser solo ilustraciones de aspectos individuales de la invención. Muchas modificaciones y variaciones de esta invención se pueden hacer sin apartarse de su alcance, como será aparente para los expertos en la

técnica. Los métodos y equipos equivalentes funcionalmente además de los enumerados en este documento, serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de las descripciones. La presente invención se debe limitar solamente por los términos de las reivindicaciones anexas, se debe entender que esta invención no se limita a métodos particulares, reactivos, compuestos composiciones o sistemas biológicos, que puede, por supuesto, variar.

5 También se debe entender que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no tiene la intención de ser limitante.

Además, donde las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación de ese modo también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

10 Como se entenderá por un experto en la técnica, para cualquiera y todos los propósitos, particularmente en términos de proveer una descripción escrita, todos los rangos revelados en este documento también abarcan cualquiera y todos los posibles subrangos y combinaciones de subrangos de los mismos. Cualquier rango enumerado se puede reconocer fácilmente que describe suficientemente y que permite que el mismo rango se descomponga en al menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como un ejemplo no limitante, cada rango discutido en este documento puede ser fácilmente descompuesto en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, *etc.*

15 Como también se comprenderá por un experto en la técnica todo el lenguaje tal como "hasta", "al menos," "superior a," "menos de," y similares, incluyen el número relatado y se refiere a rangos que posteriormente se pueden descomponer en subrangos como se discute anteriormente. Por último, como se entenderá por un experto en la técnica, un rango incluye cada miembro individual. De esta manera, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, o 3 células. Del mismo modo, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4, o 5 células, y así sucesivamente.

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido representado por la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o Phe-D-Arg- Phe-Lys-NH₂ para utilizar en el tratamiento o prevención de una condición oftalmológica en donde la condición oftalmológica se selecciona del grupo que consiste de: retinitis pigmentosa, neovascularización coroidea, y retinopatía inducida por el oxígeno.
- 5 2. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido es D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.
3. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido es Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂.
4. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para utilizar con un humano.
- 10 5. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para ser administrado por vía intraocular, iontoforética, oral, tópica, sistémica, por vía intravenosa, subcutánea, o intramuscular.
6. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para la administración por separado, de forma secuencial, o simultáneamente con un segundo agente activo.
- 15 7. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo agente activo se selecciona del grupo que consiste de: un antioxidante, un complejante de metal, un fármaco antiinflamatorio, un antibiótico, y un antihistamínico.
8. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el antioxidante es la vitamina A, vitamina C, vitamina E, licopeno, selenio, ácido α -lipoico, coenzima Q, glutatión, o un carotenoide.
- 20 9. El péptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo agente activo se selecciona del grupo que consiste de: aceclidina, acetazolamida, anecortave, apraclonidina, atropina, azapentaceno, azelastina, bacitracin, befunolol, betametasona, betaxolol, bimatoprost, brimonidina, brinzolamida, carbacol, carteolol, celecoxib, cloramfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, cromoglicato, cromolina, ciclopentolato, ciclosporina, dapiprazol, demecario, dexametasona, diclofenaco, diclorfenamida, dipivefrina, dorzolamida, ecotiofato, emedastina, epinastina, epinefrina, eritromicina, etoxzolamida, eucatropina, fludrocortisona, fluorometolona, flurbiprofeno, fomivirsén, framicitina, ganciclovir, gatifloxacina, gentamicina, homatropina, hidrocortisona, idoxuridina, indometacina, isoflurofato, ketorolac, ketotifen, latanoprost, levobetaxolol, levobunolol, levocabastina, levofloxacina, lodoxamida, loteprednol, medrisona, metazolamida, metipranolol, moxifloxacina, nafazolina, natamicina, nedocromil, neomicina, norfloxacina, ofloxacina, olopatadina, oximetazolina, pemirolast, pegaptanib, fenilefrina, fisostigmina, pilocarpina, pindolol, pirenoxina, polimixina B, prednisolona, proparacaína, ranibizumab, rimexolona, escopolamina, sezolamida, esculamina, sulfacetamida, suprofen, tetracaina, tetraciclina, tetrahidrozolina, tetrizolina, timolol, tobramicina, travoprost, triamcinolona, trifluorometazolamida, trifluridina, trimetoprima, tropicamida, unoprostona, vidarbina, xilometazolina, sales de estas farmacéuticamente aceptables, y las combinaciones de los mismos.
- 30

FIG. 1

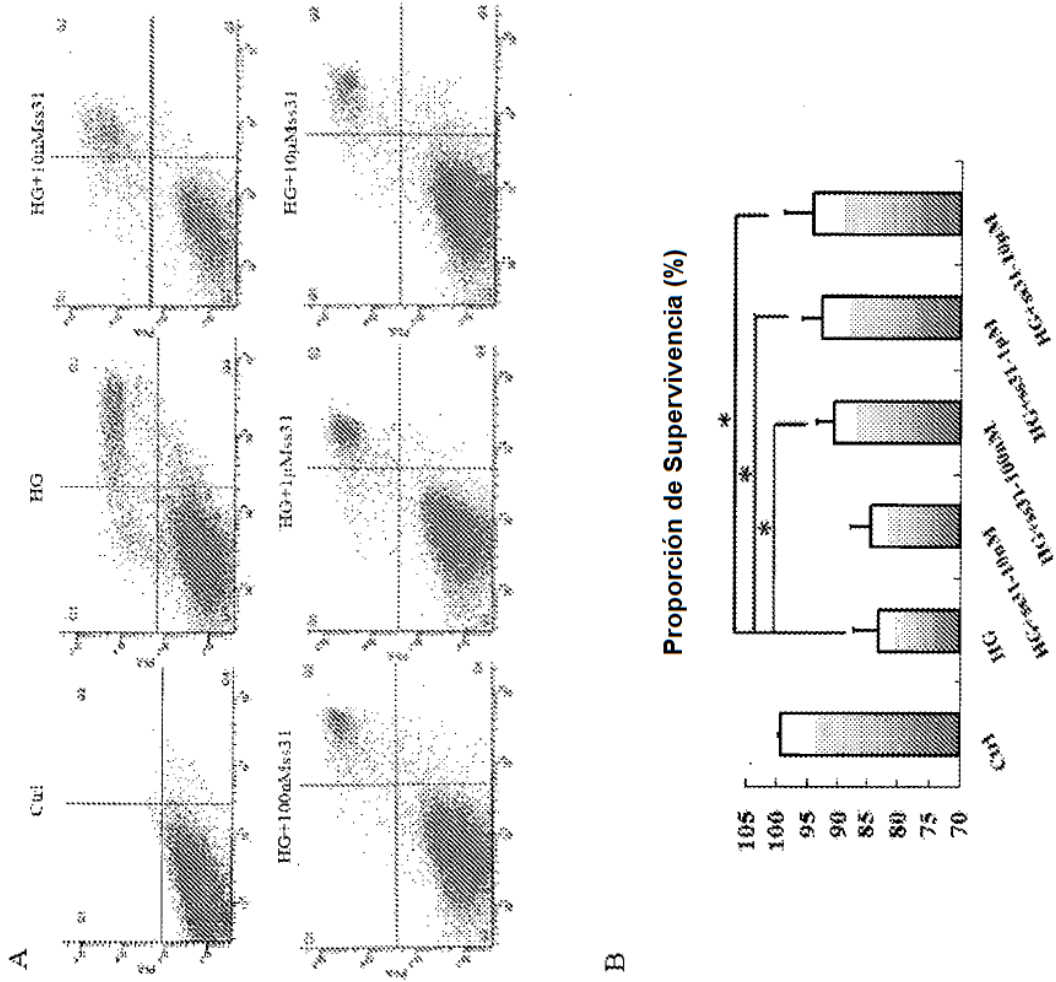


FIG. 2

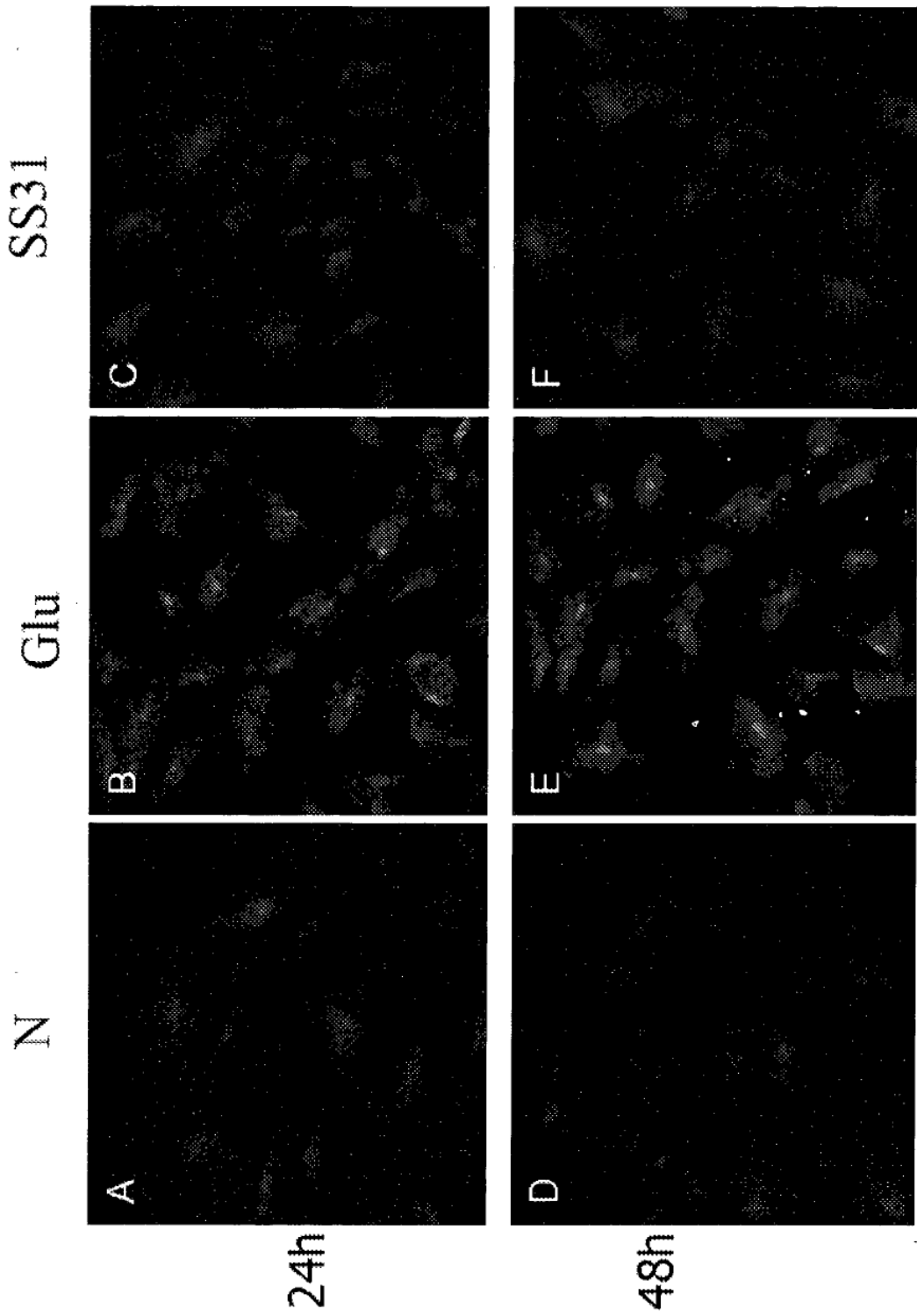


FIG. 3

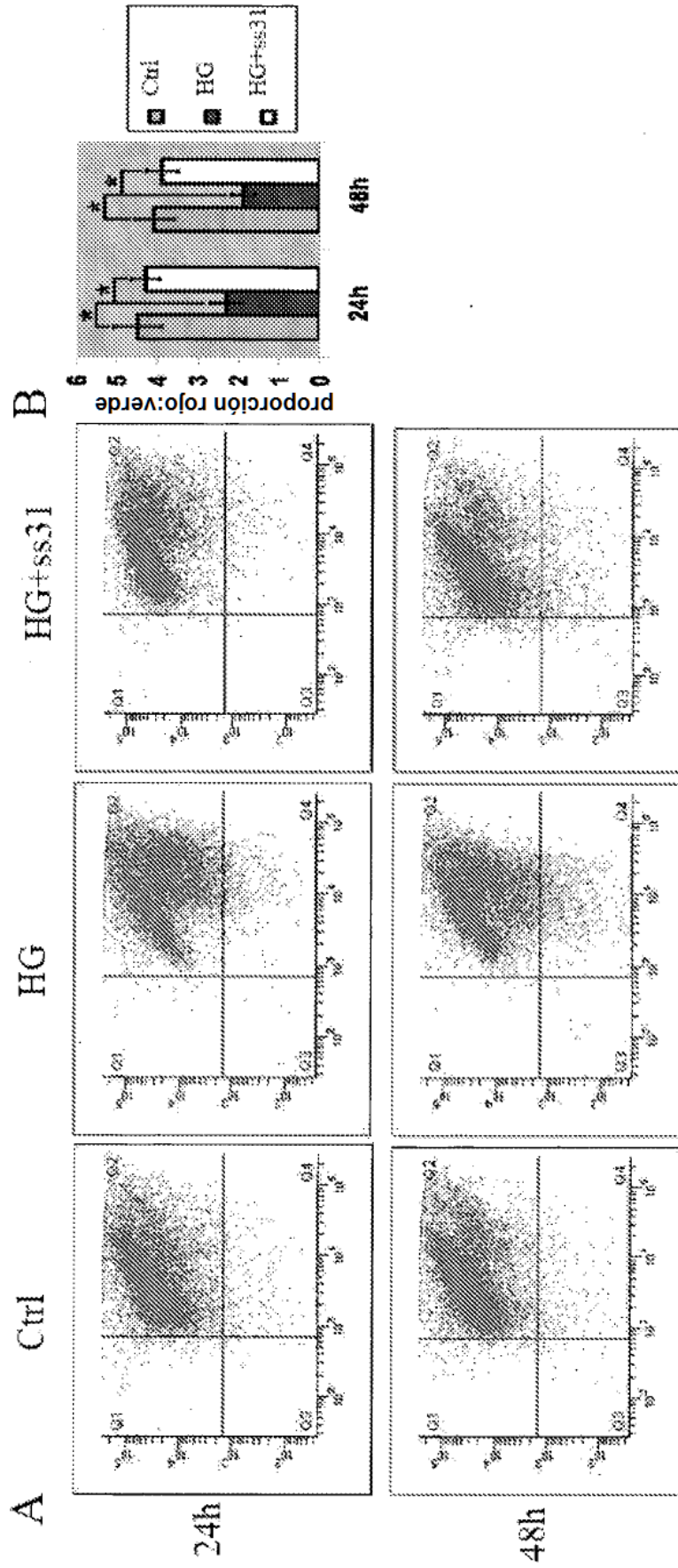


FIG. 4

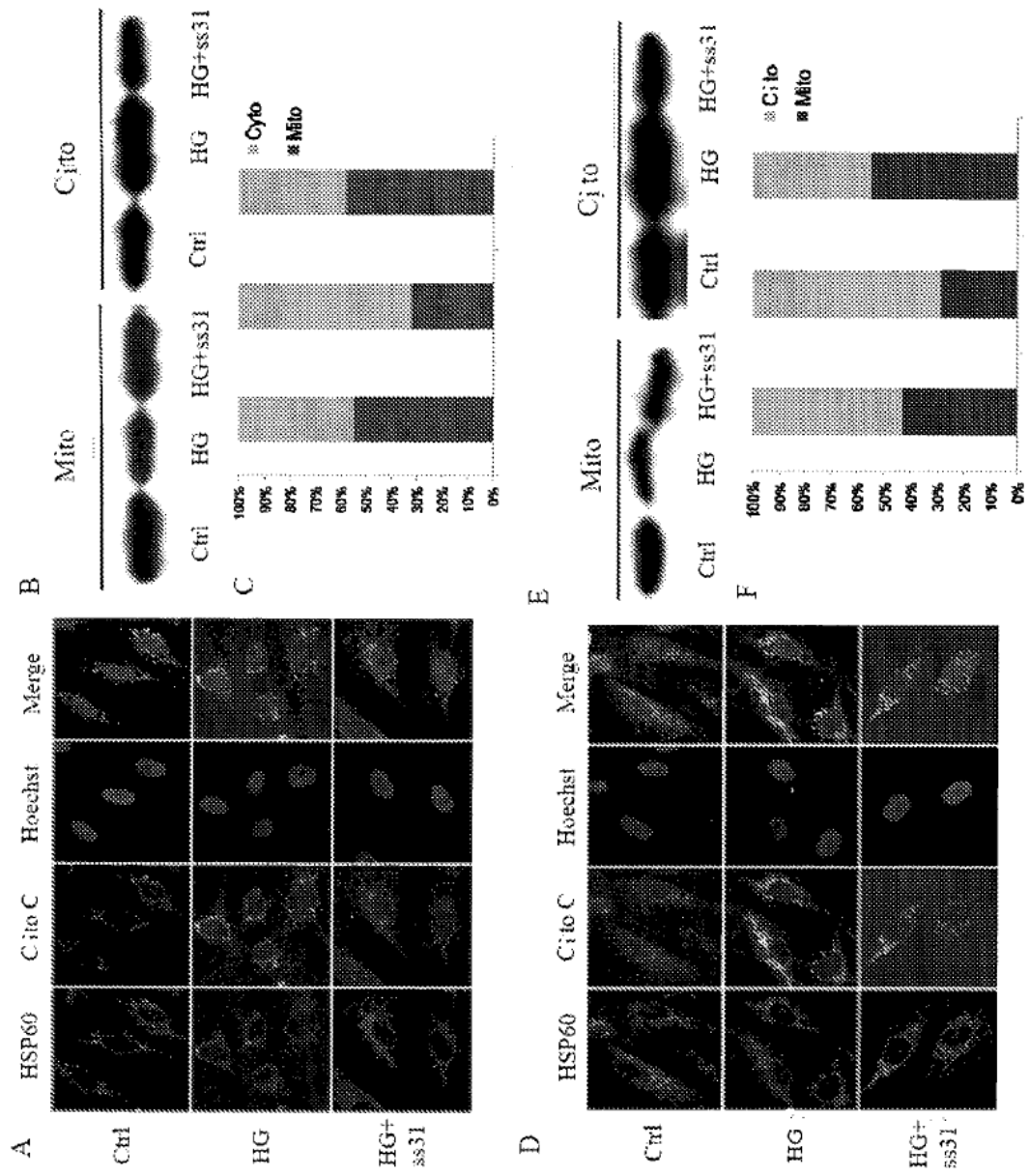


FIG. 5

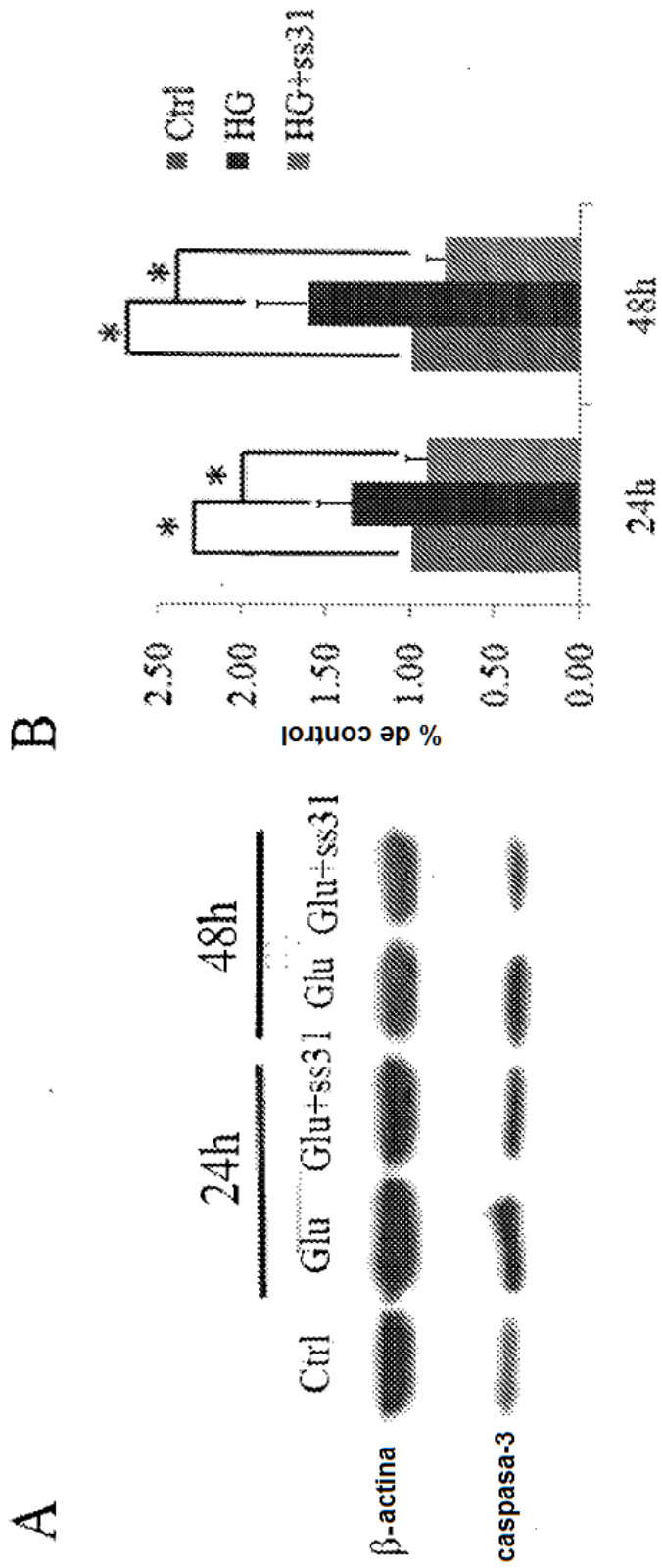


FIG. 5 (CONT.)

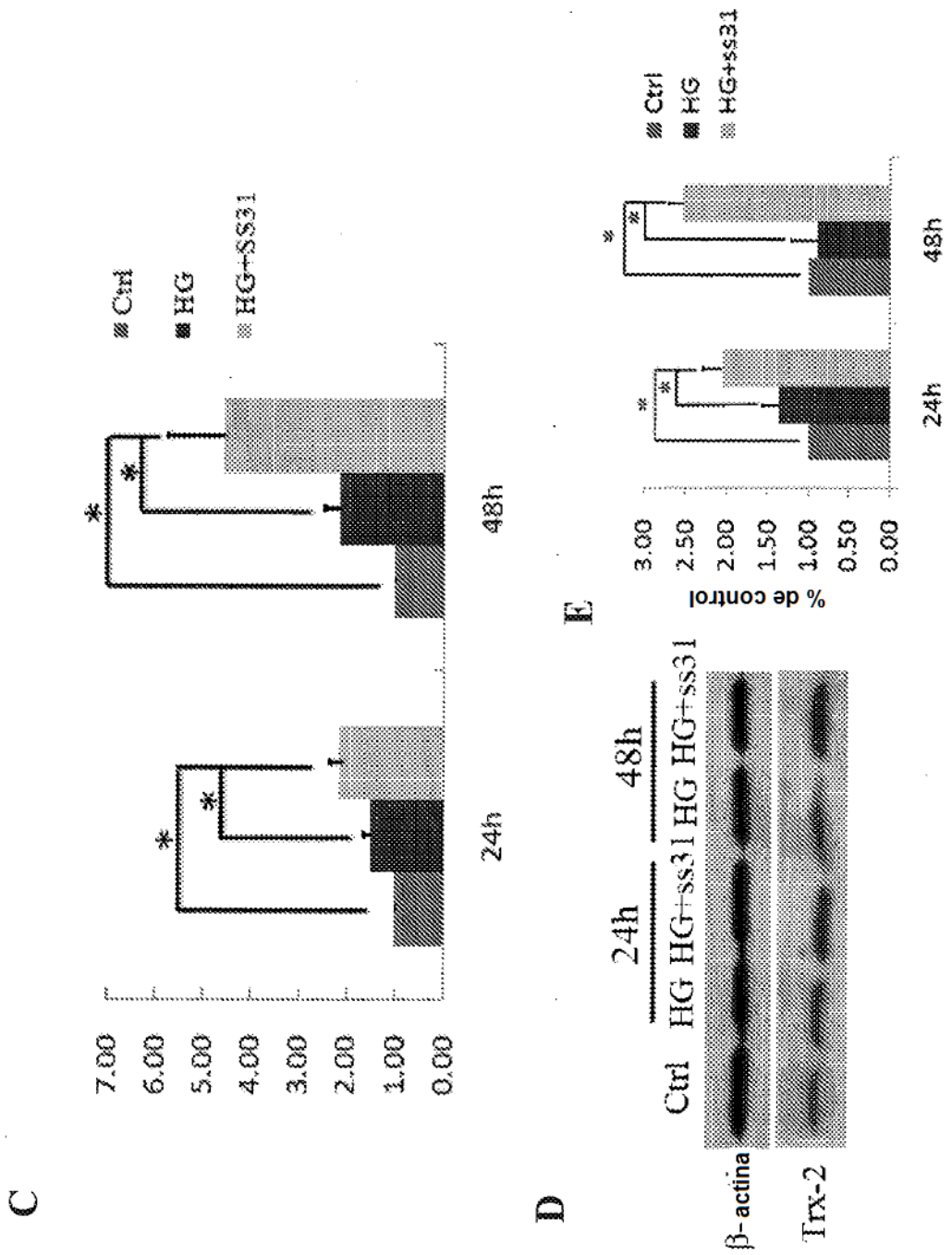


FIG. 6

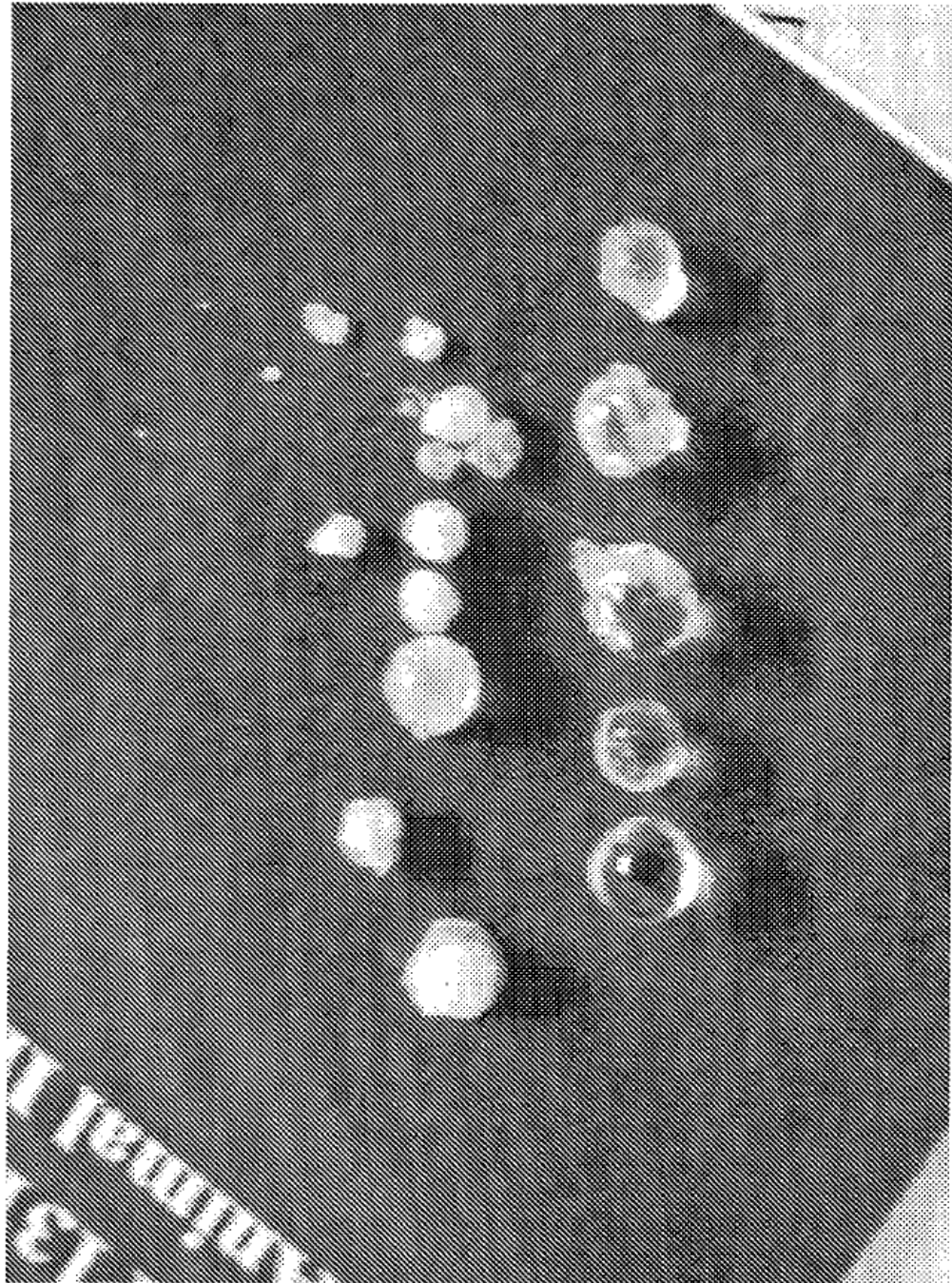


FIG. 7

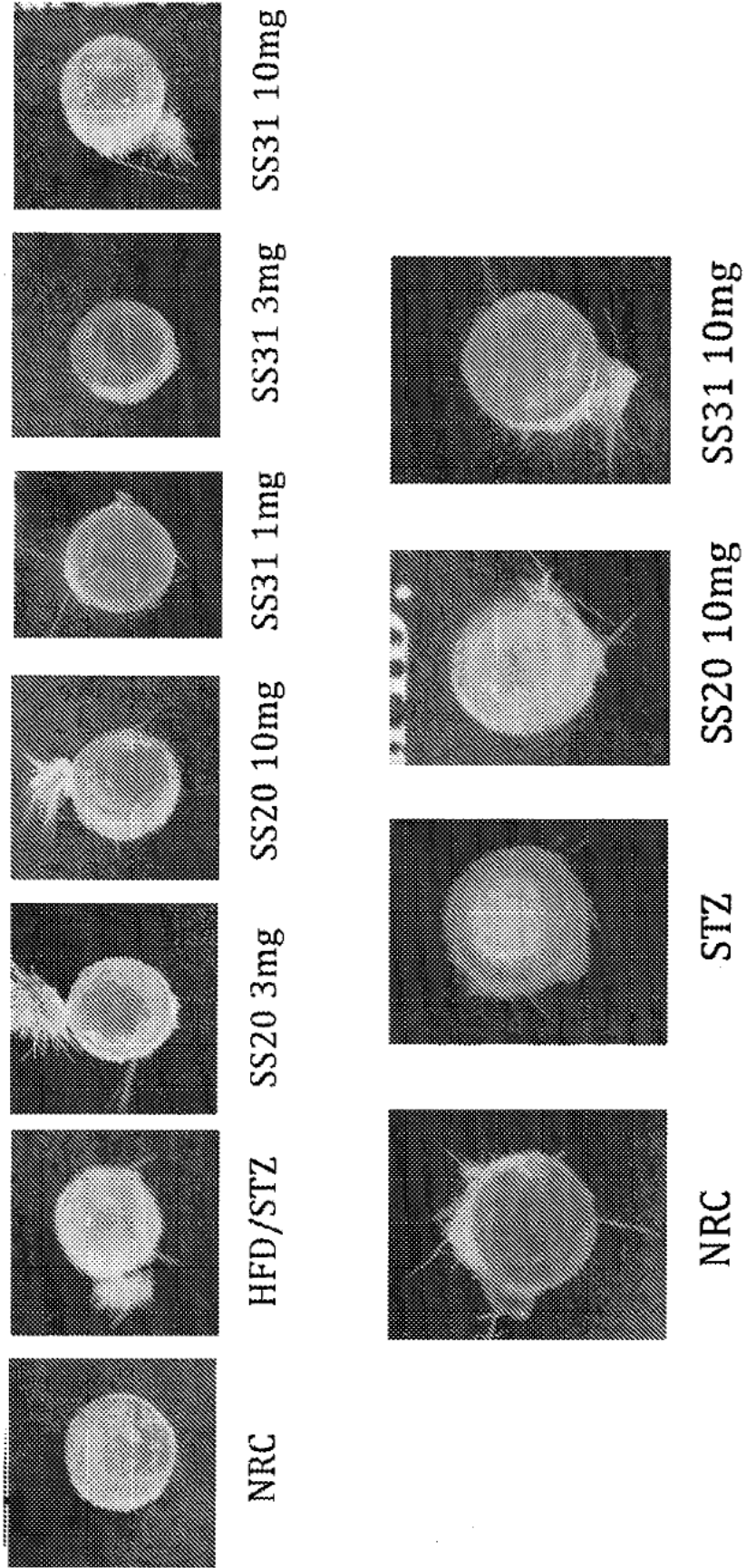


FIG. 8

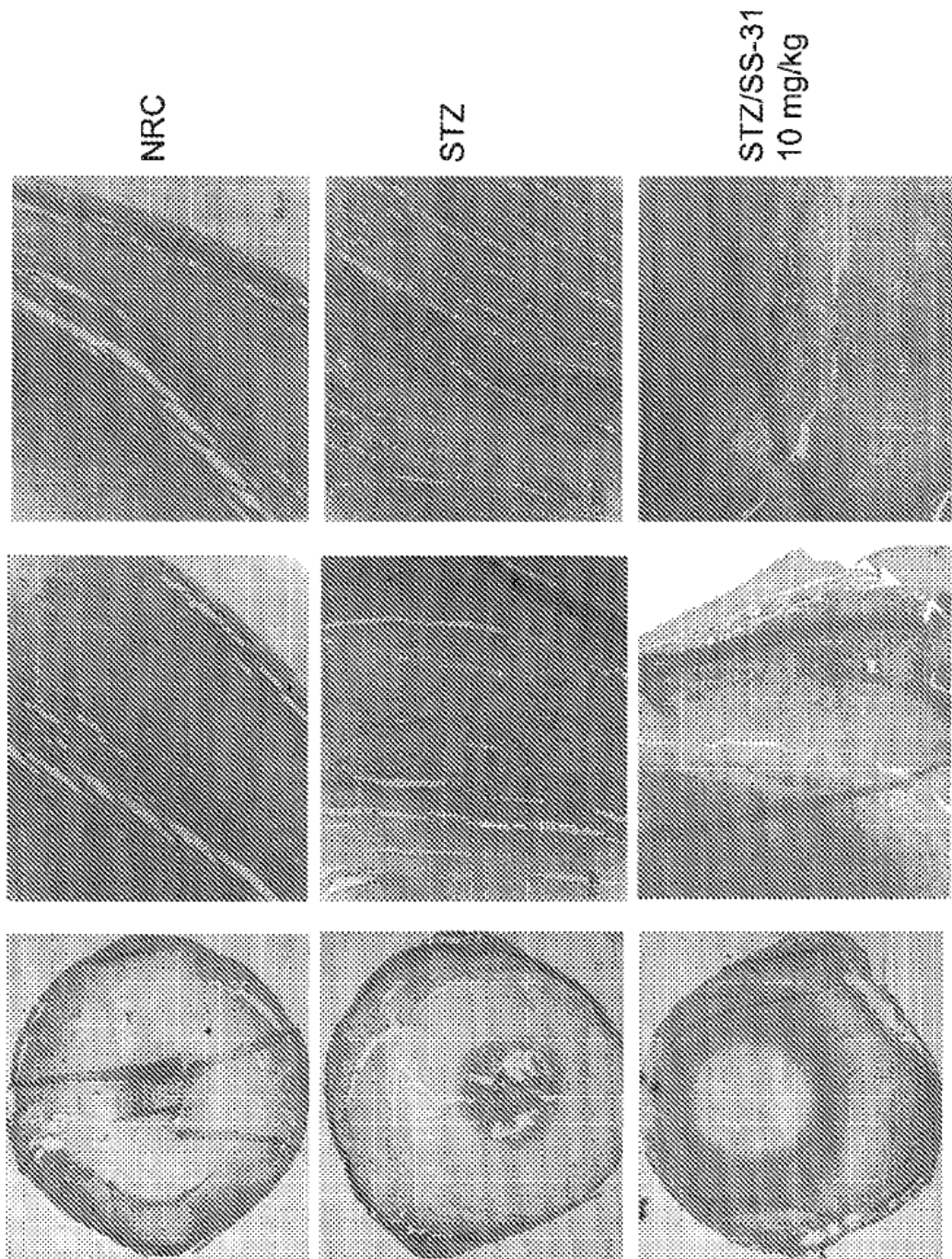


FIG. 9

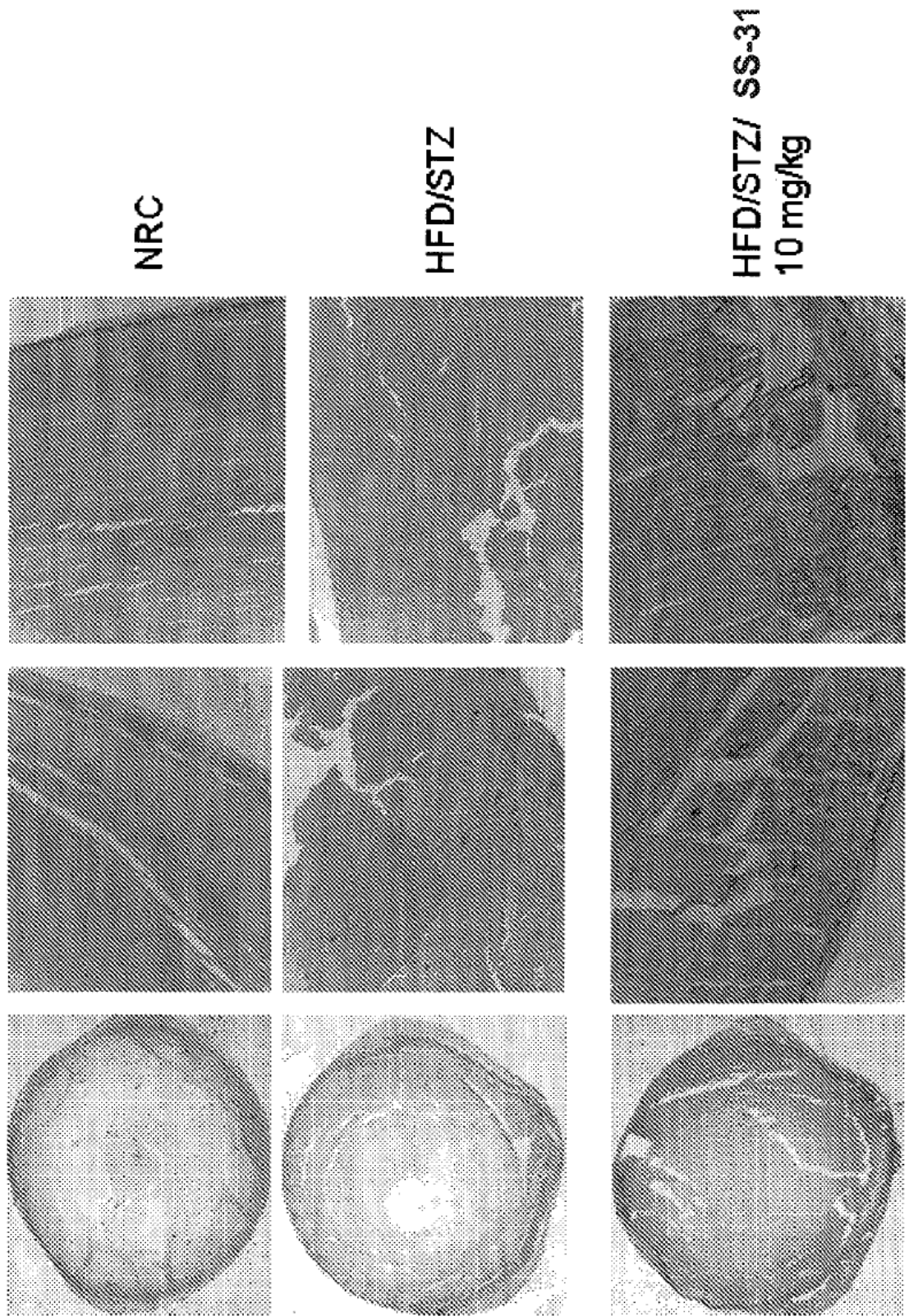
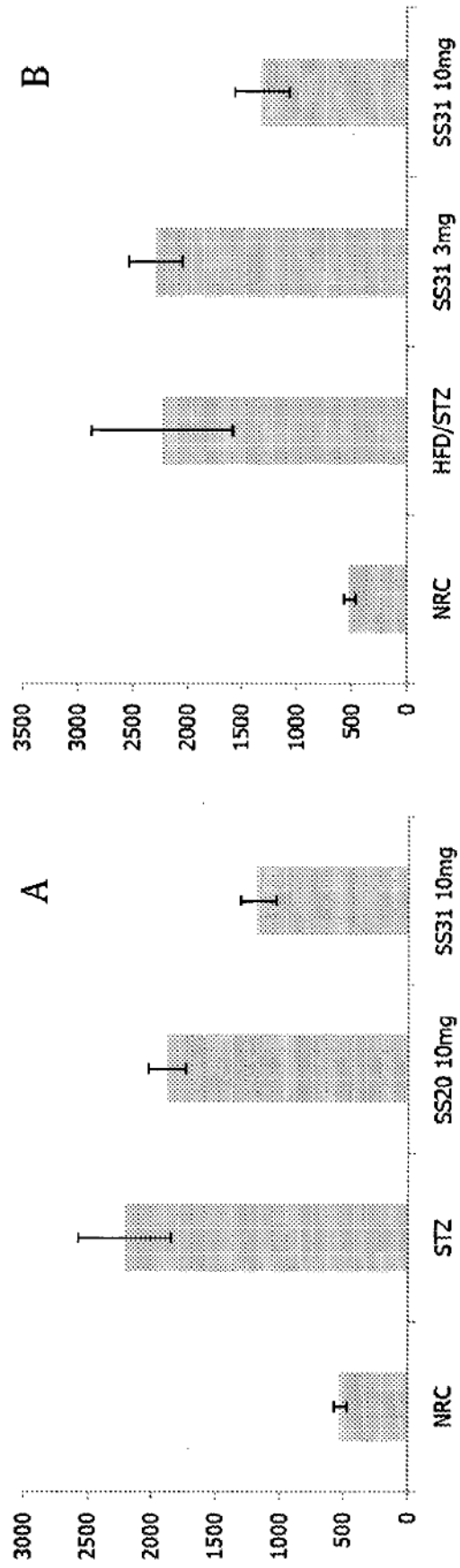


FIG. 10



A: modelo de rata STZ

B: modelo de rata STZ/HFD

FIG. 11

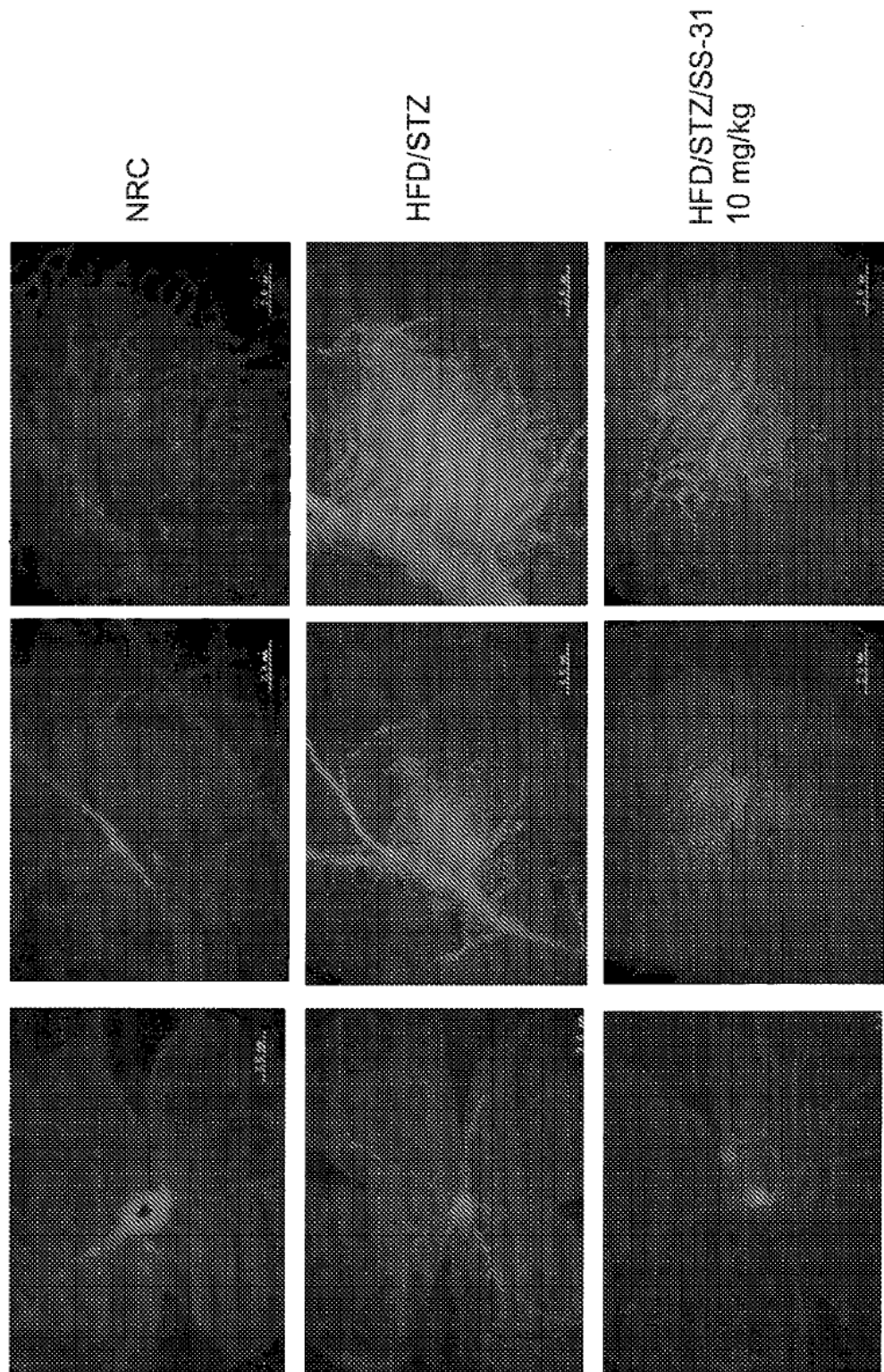


FIG. 12

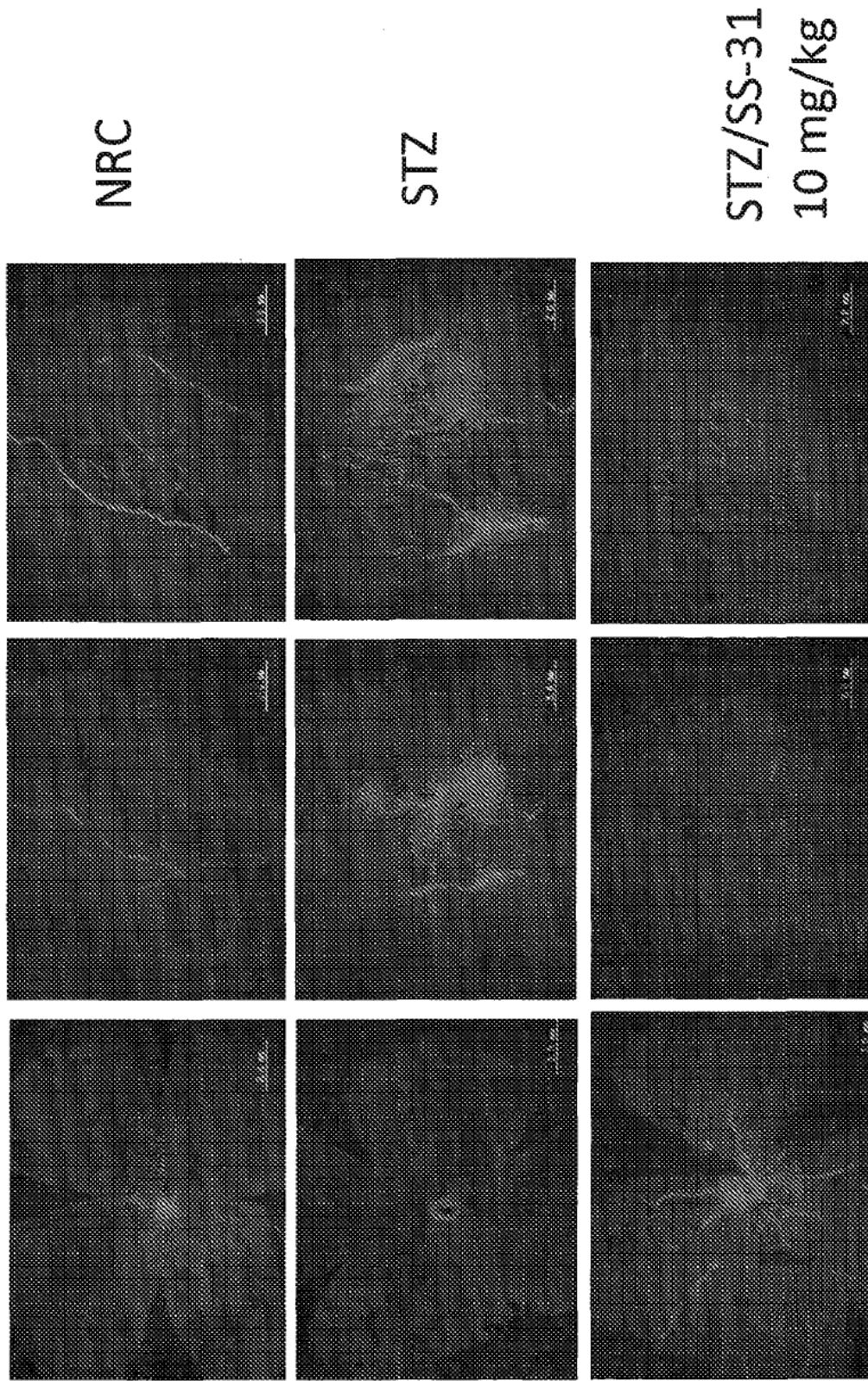


FIG. 13

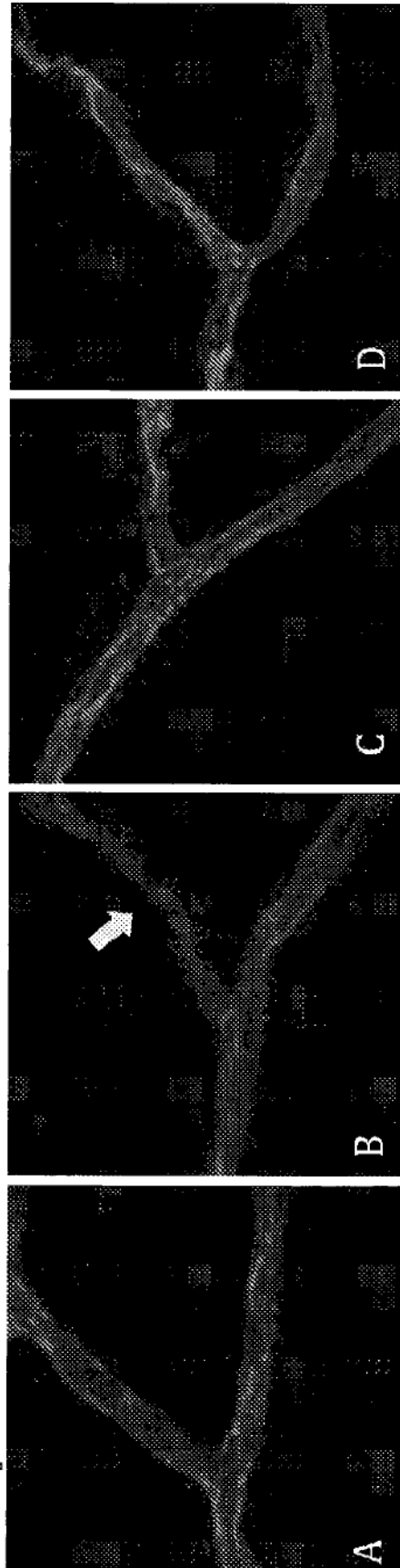


FIG. 14

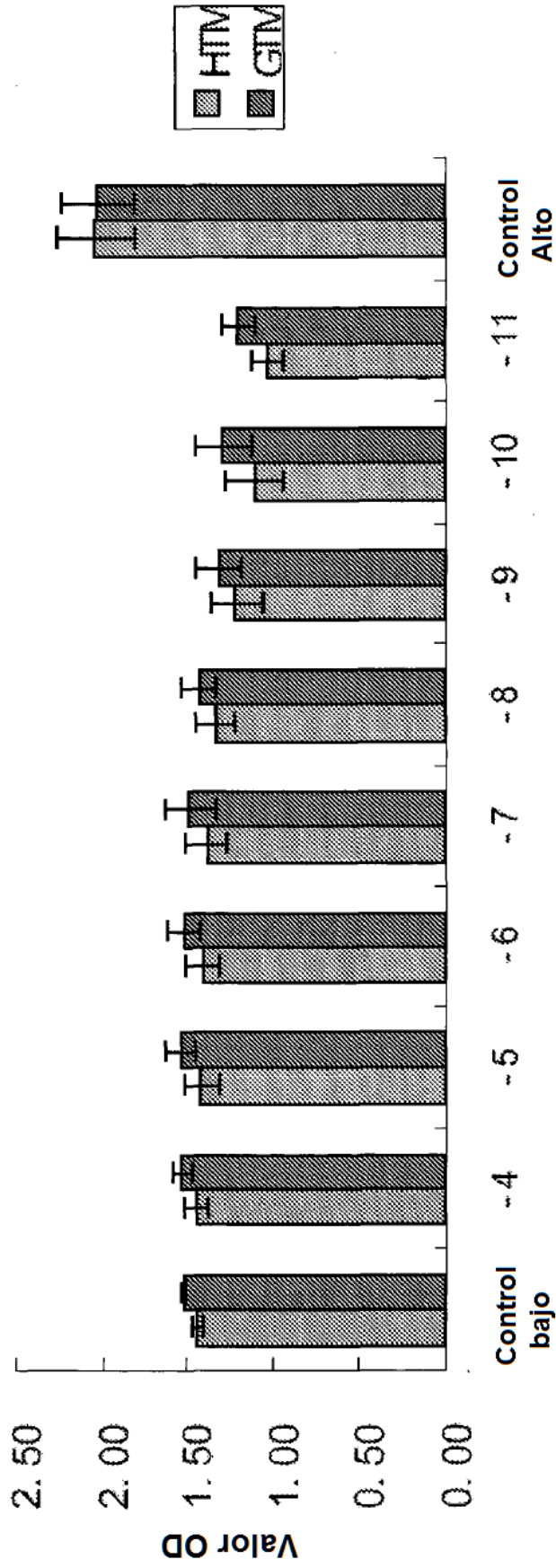


FIG. 15

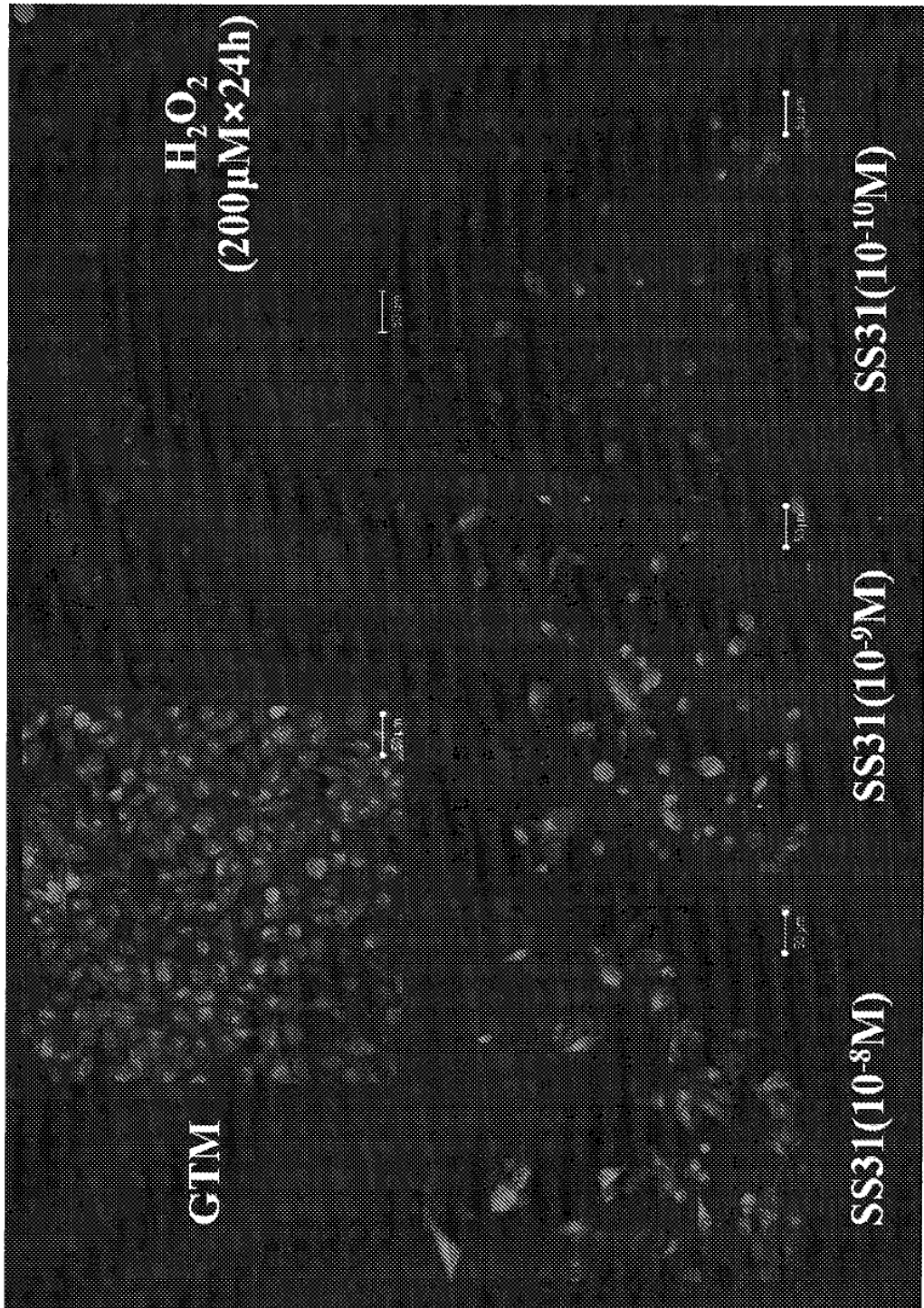


FIG. 16

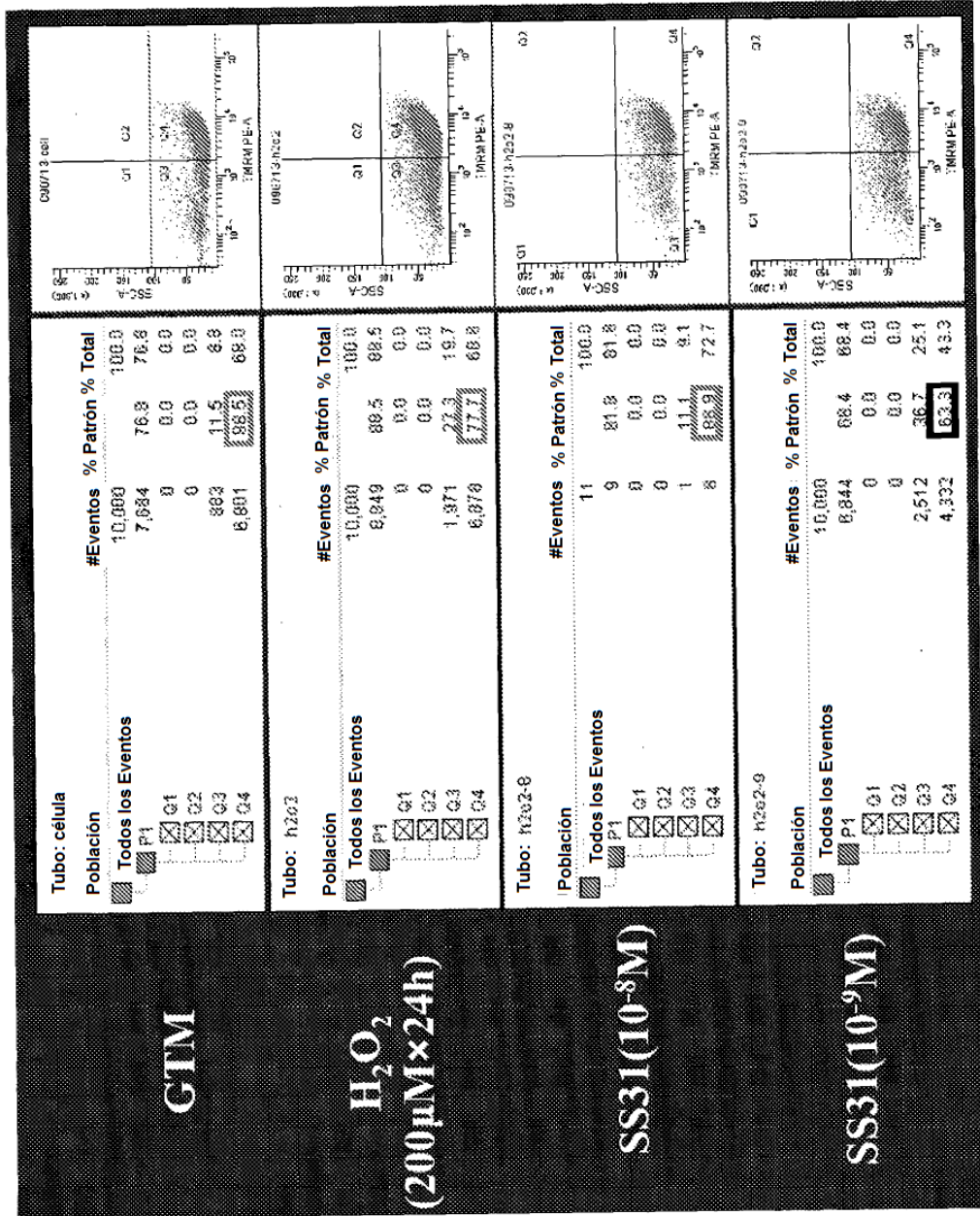


FIG. 17

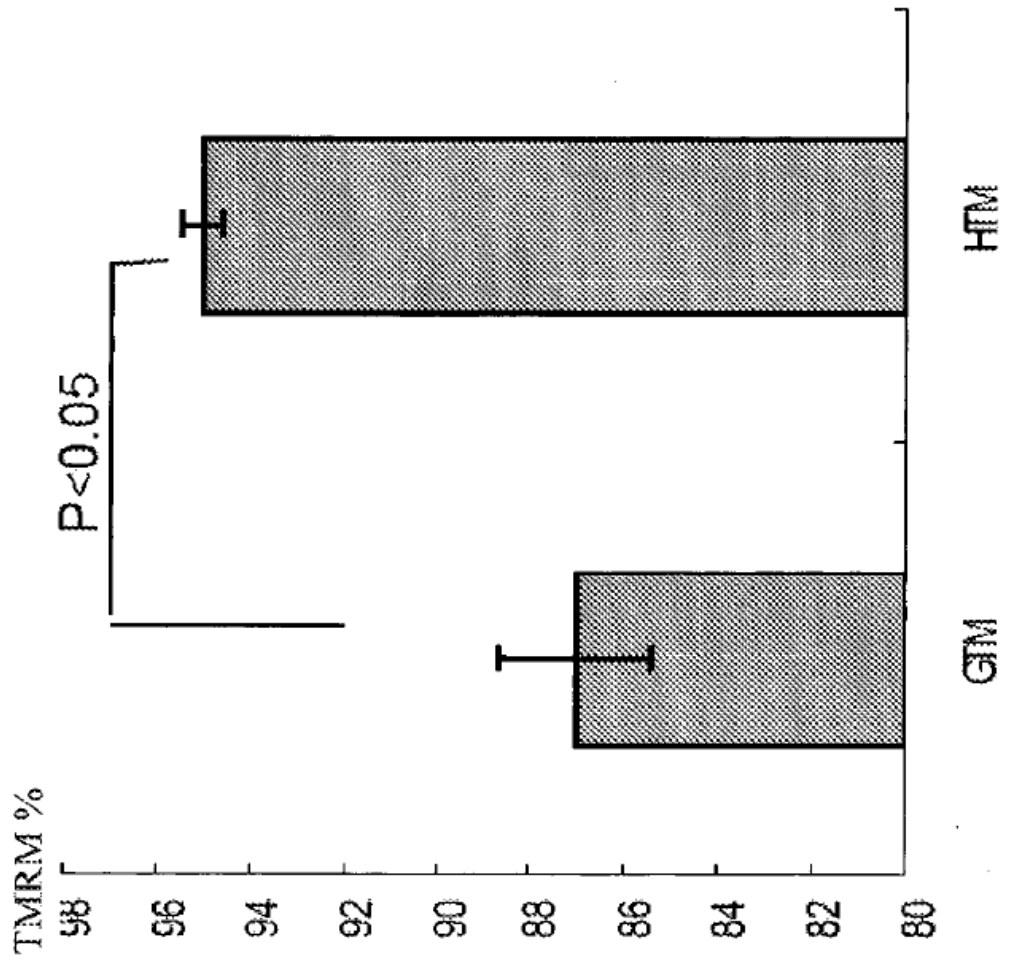


FIG. 18

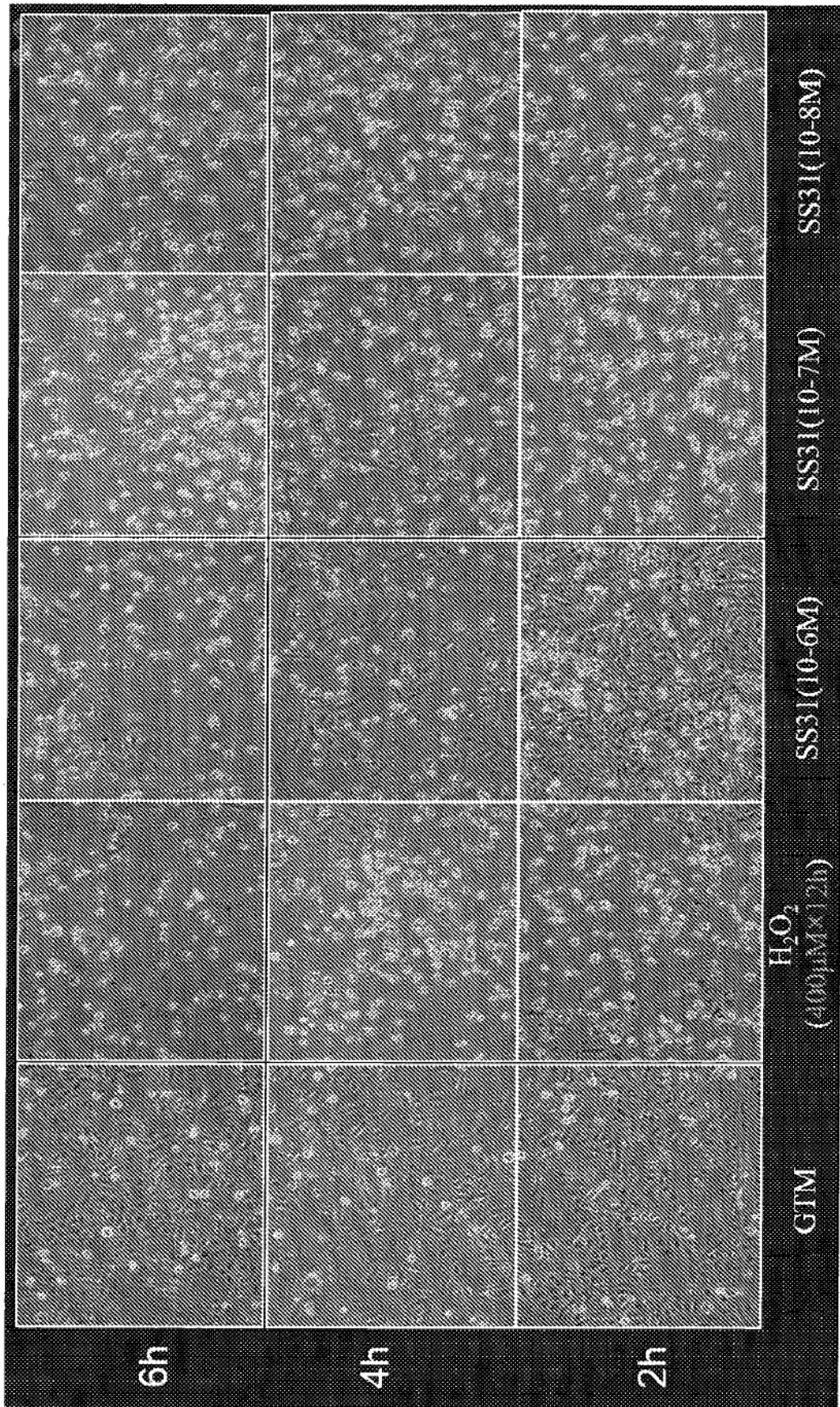


FIG. 19

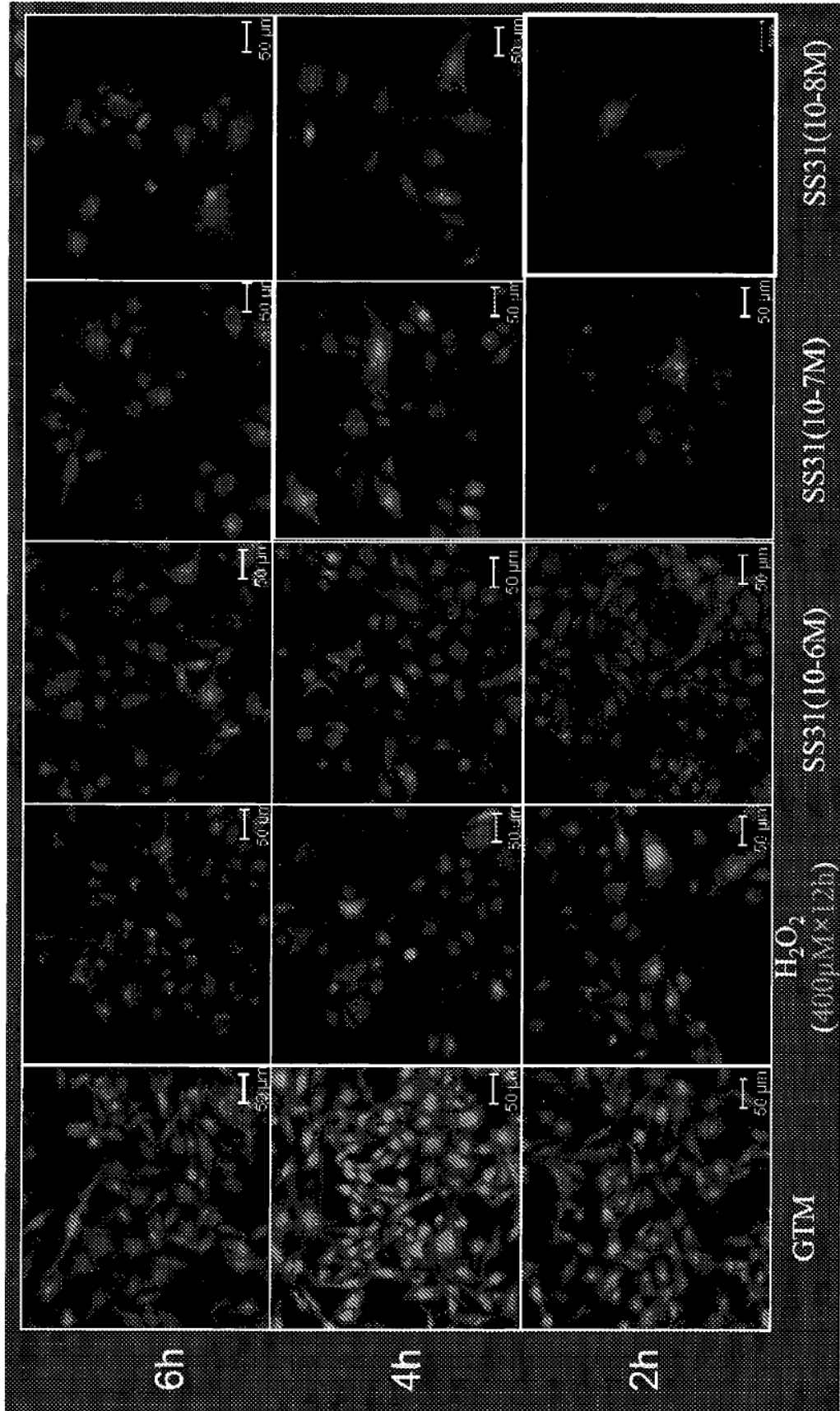


FIG. 20

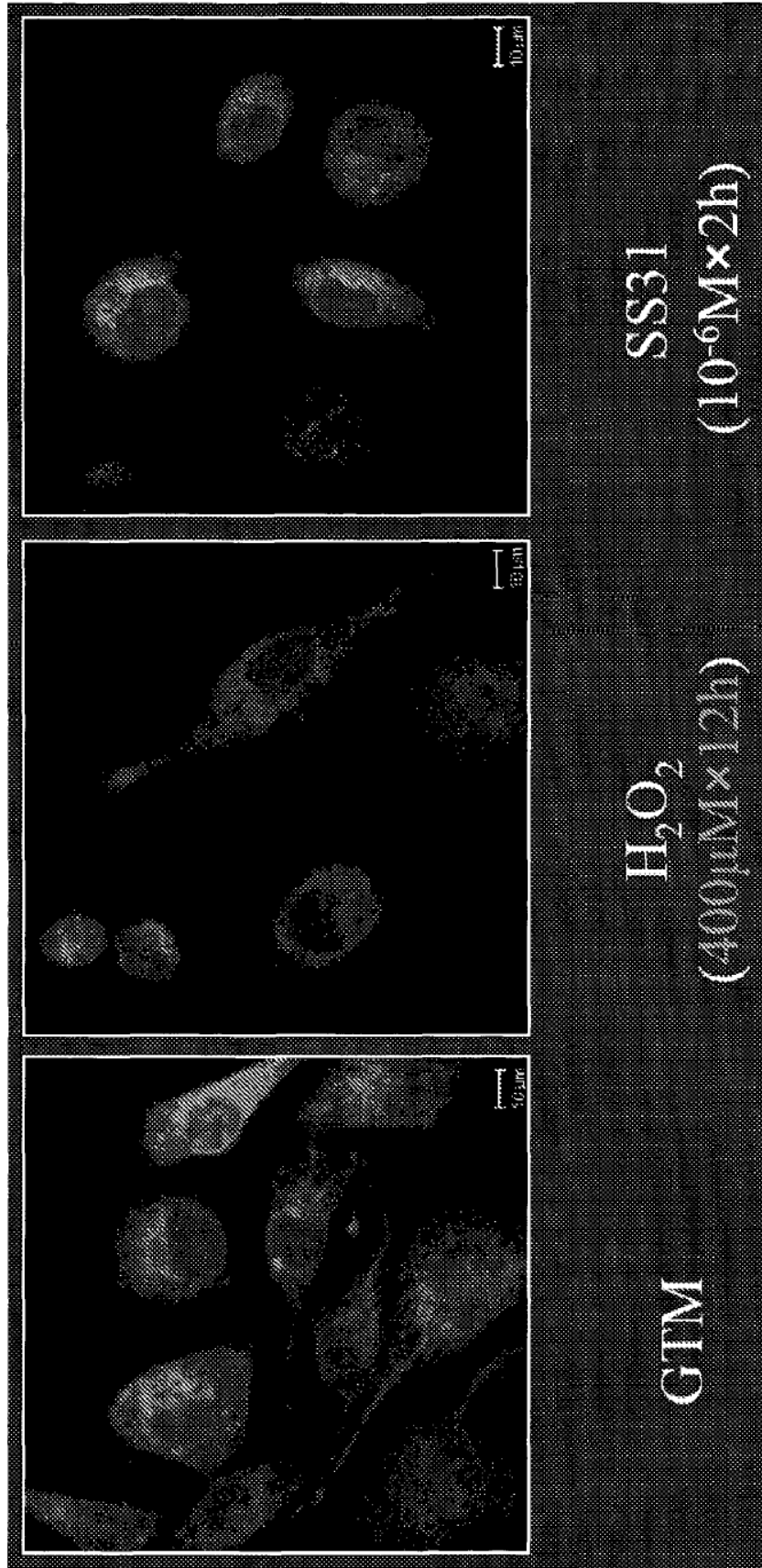


FIG. 21

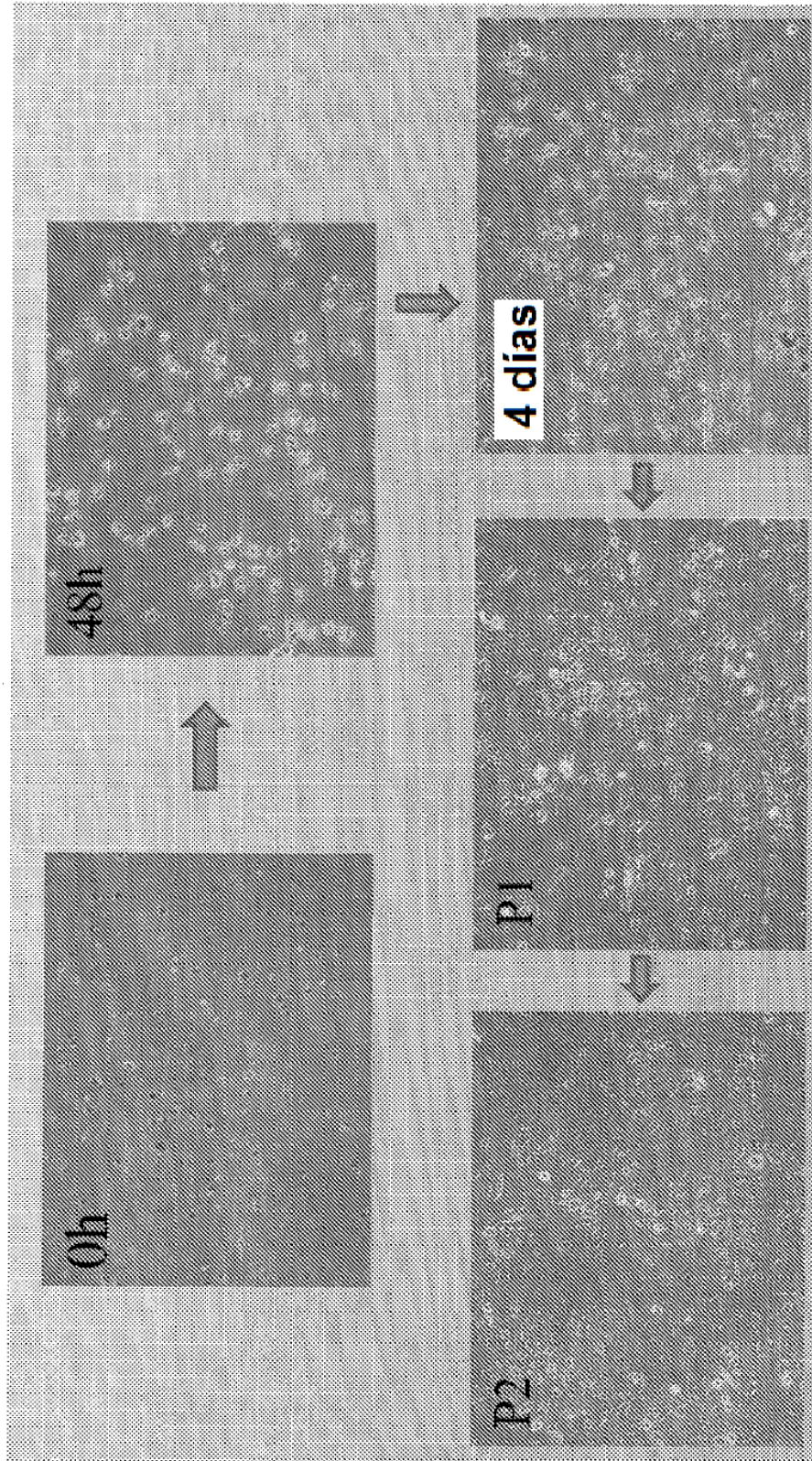


FIG. 22

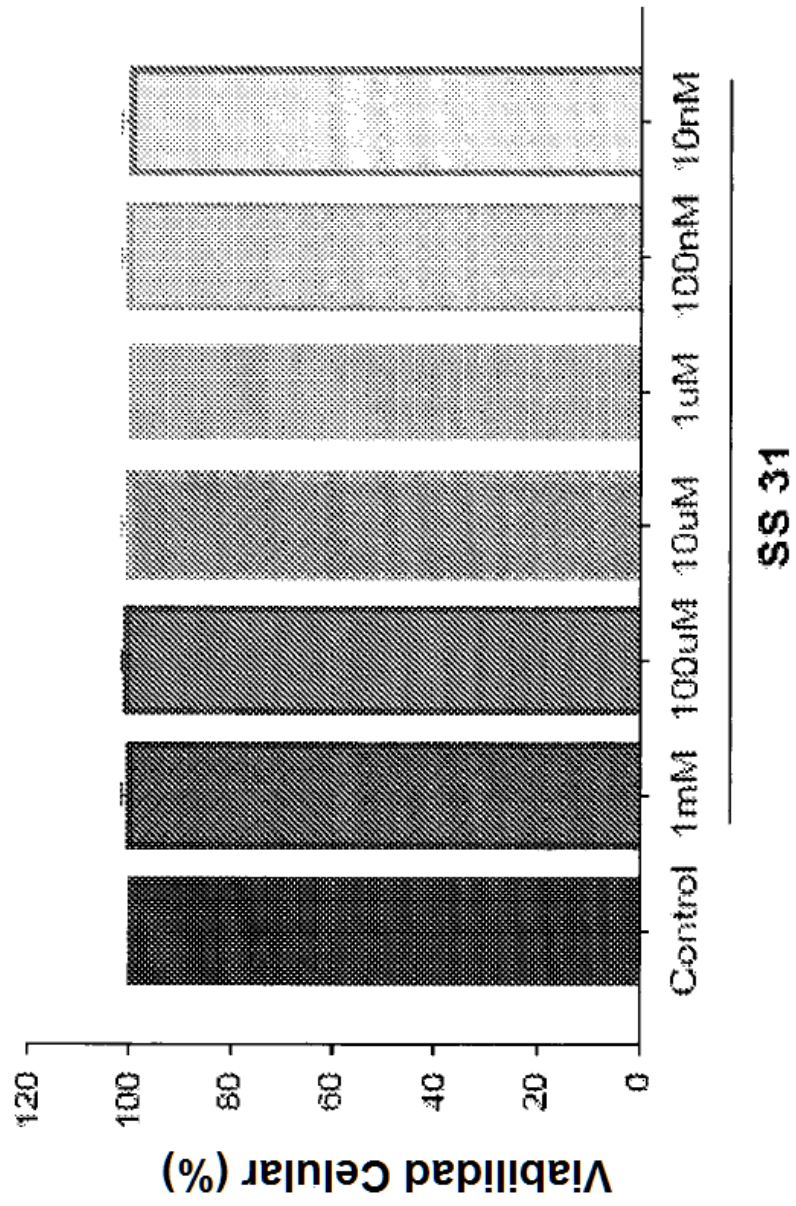


FIG. 23

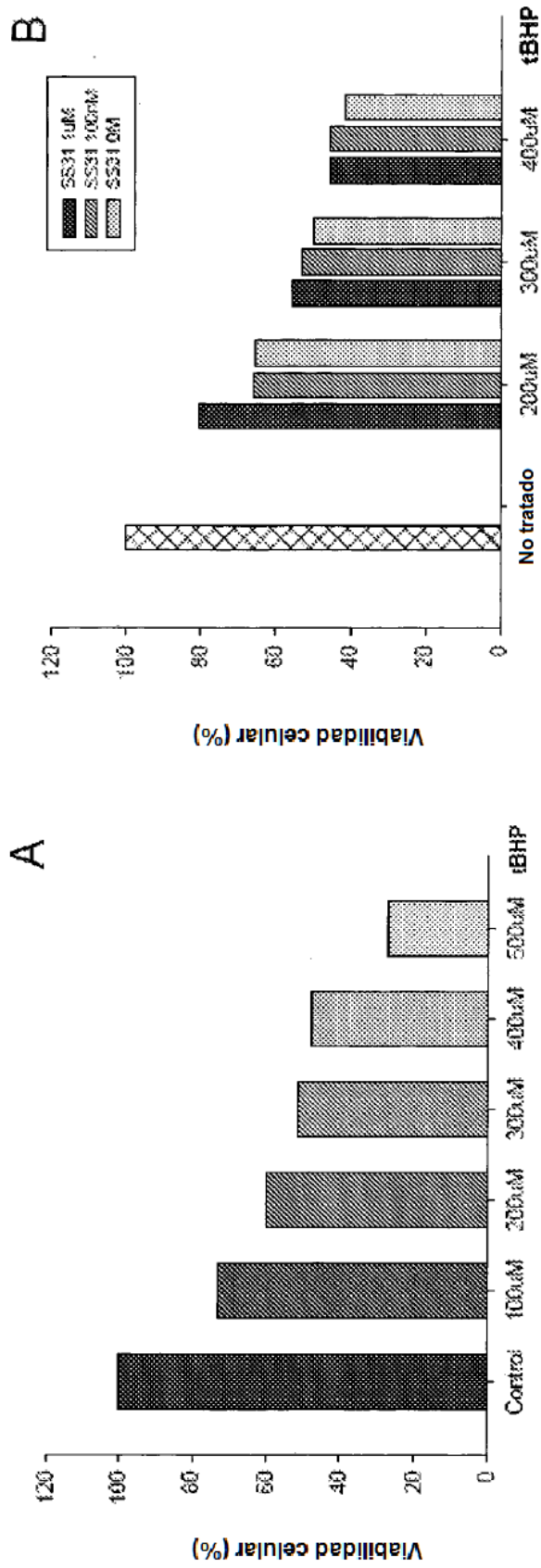


FIG. 24

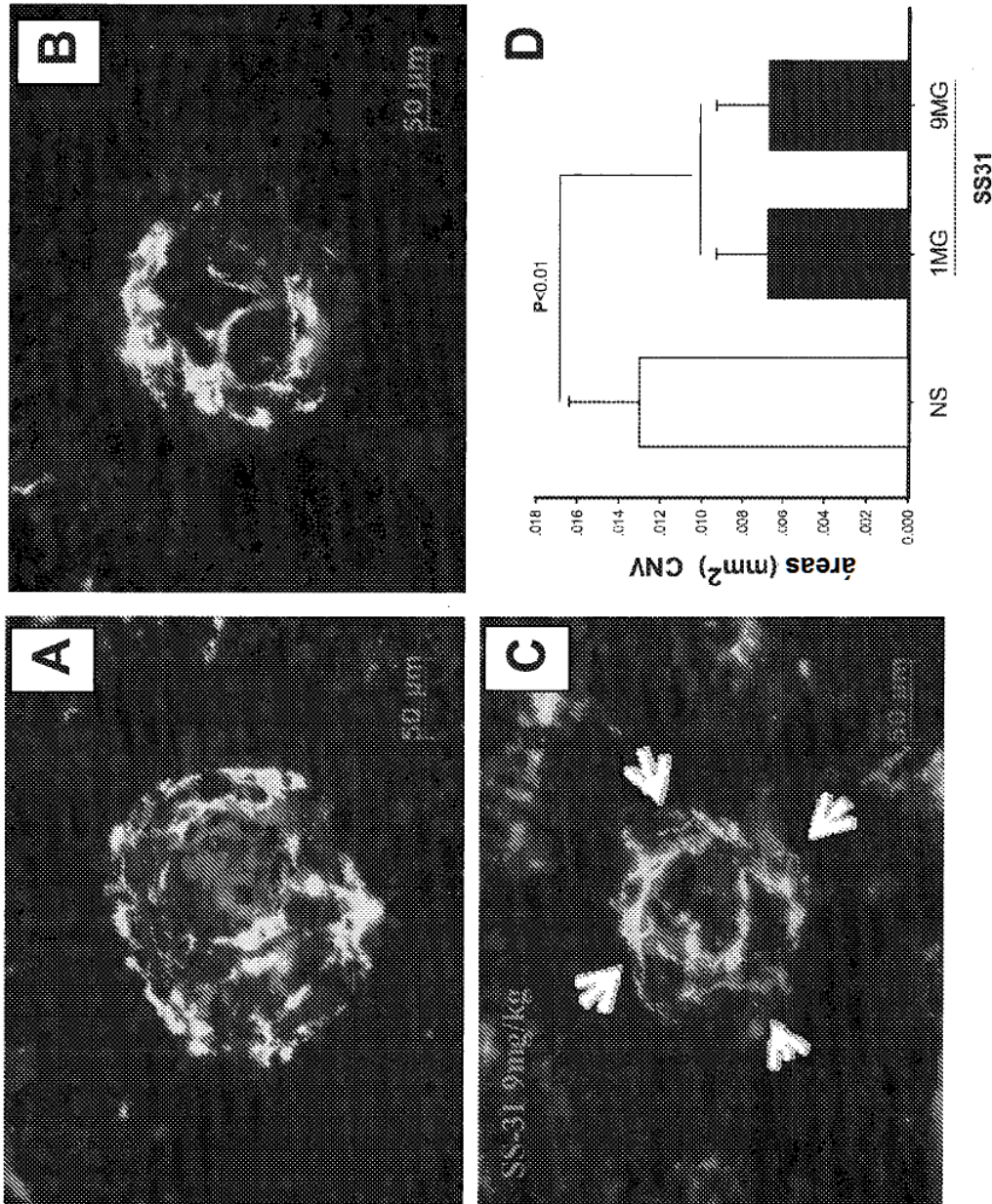


FIG. 25

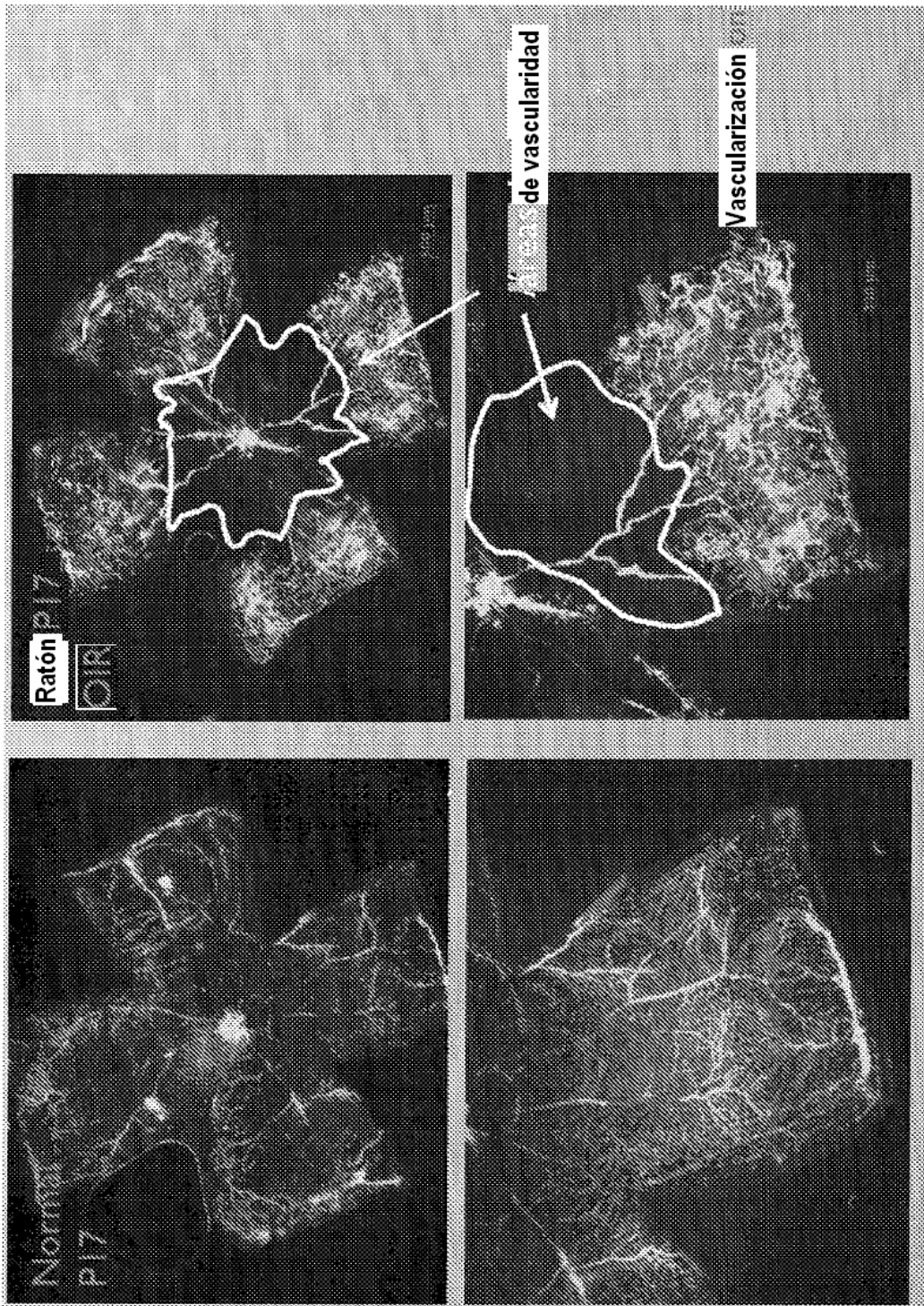


FIG. 26

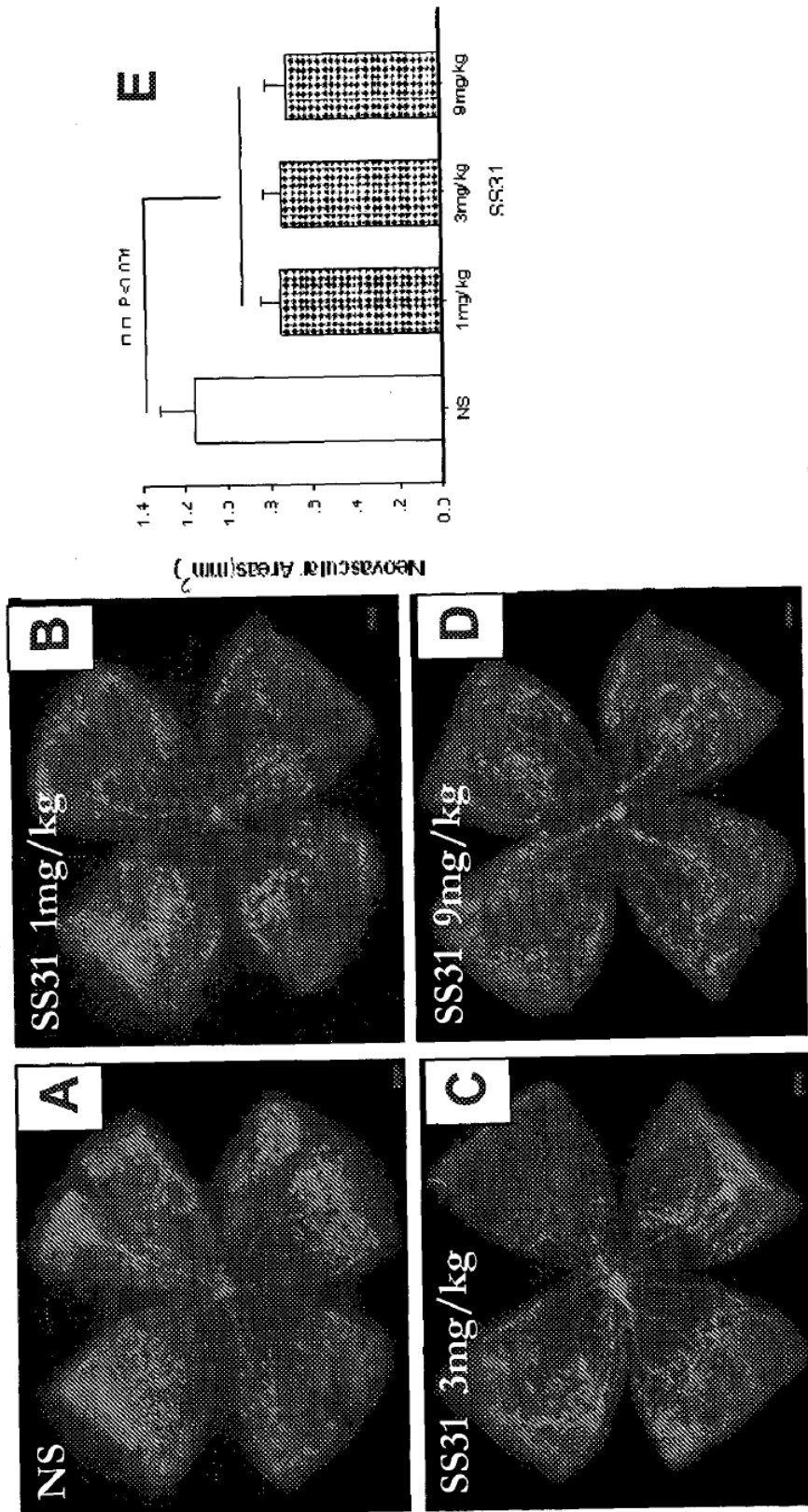


FIG. 27A

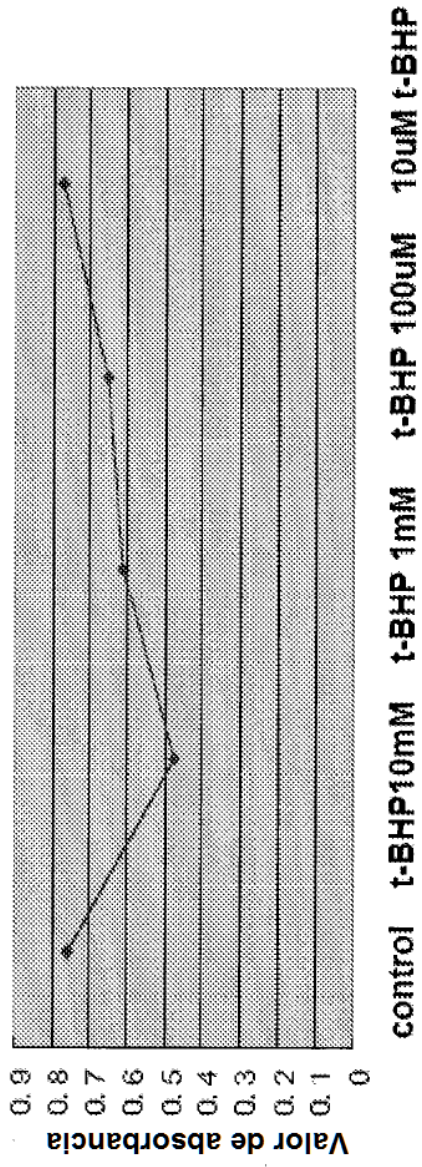


FIG. 27B

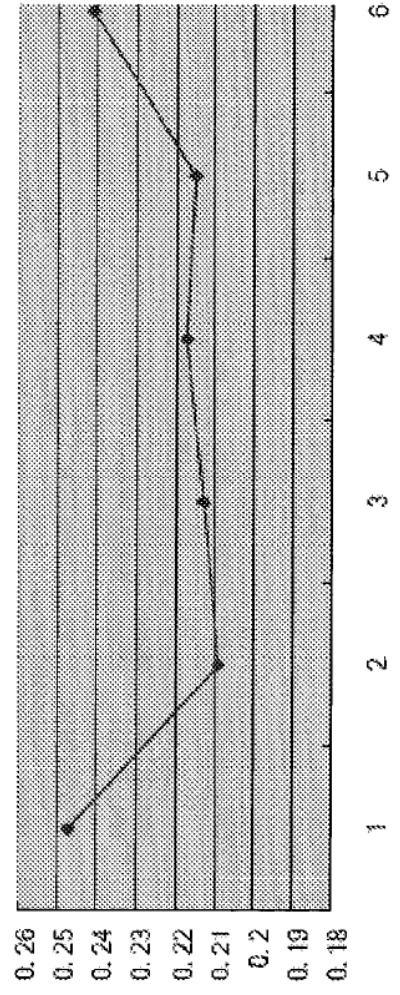


FIG. 28

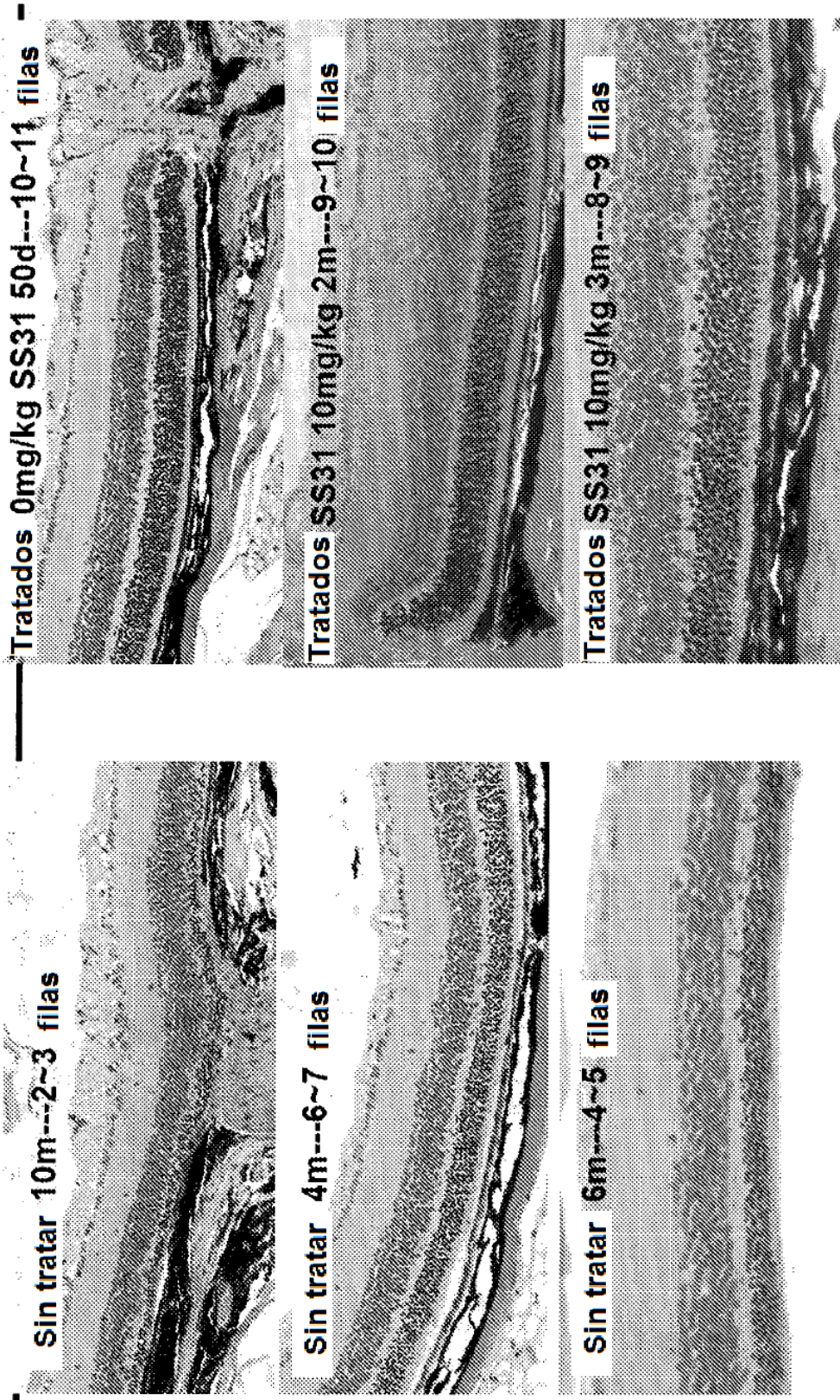


FIG. 29

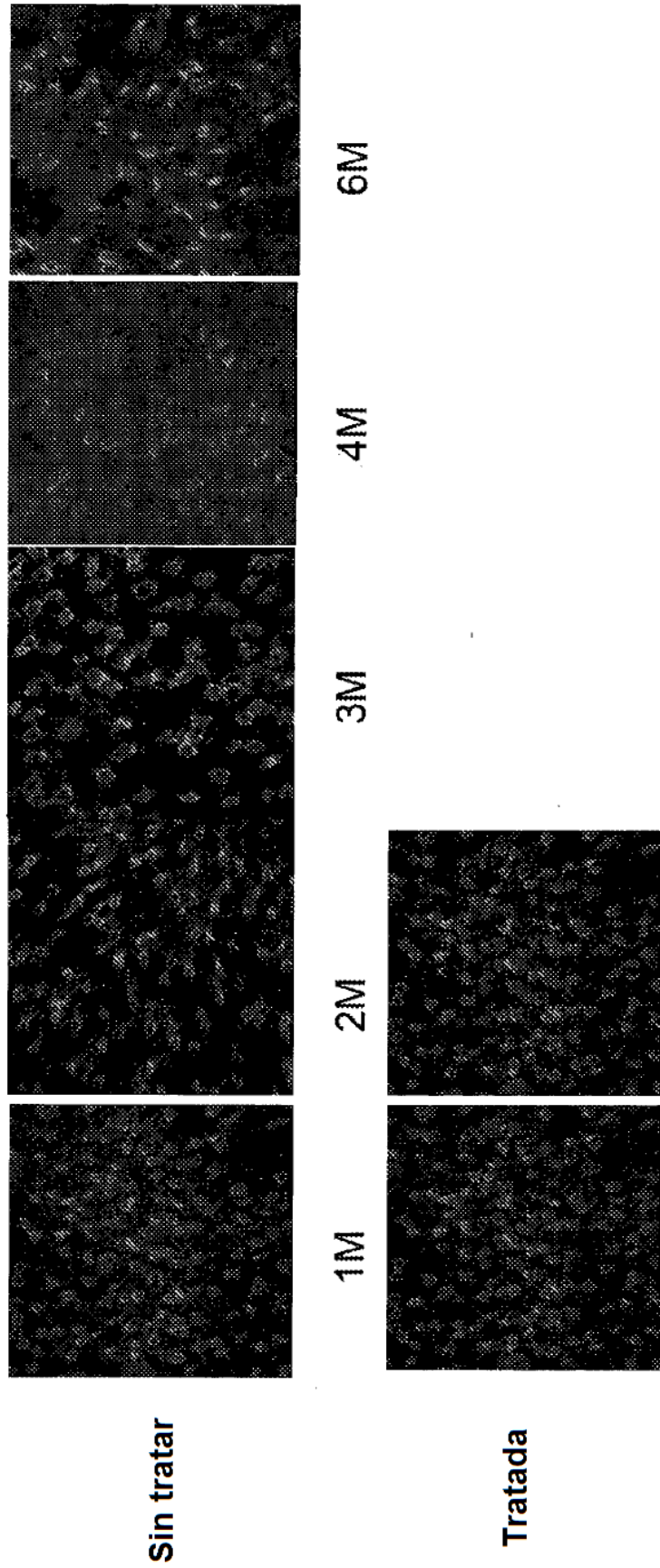


FIG. 30

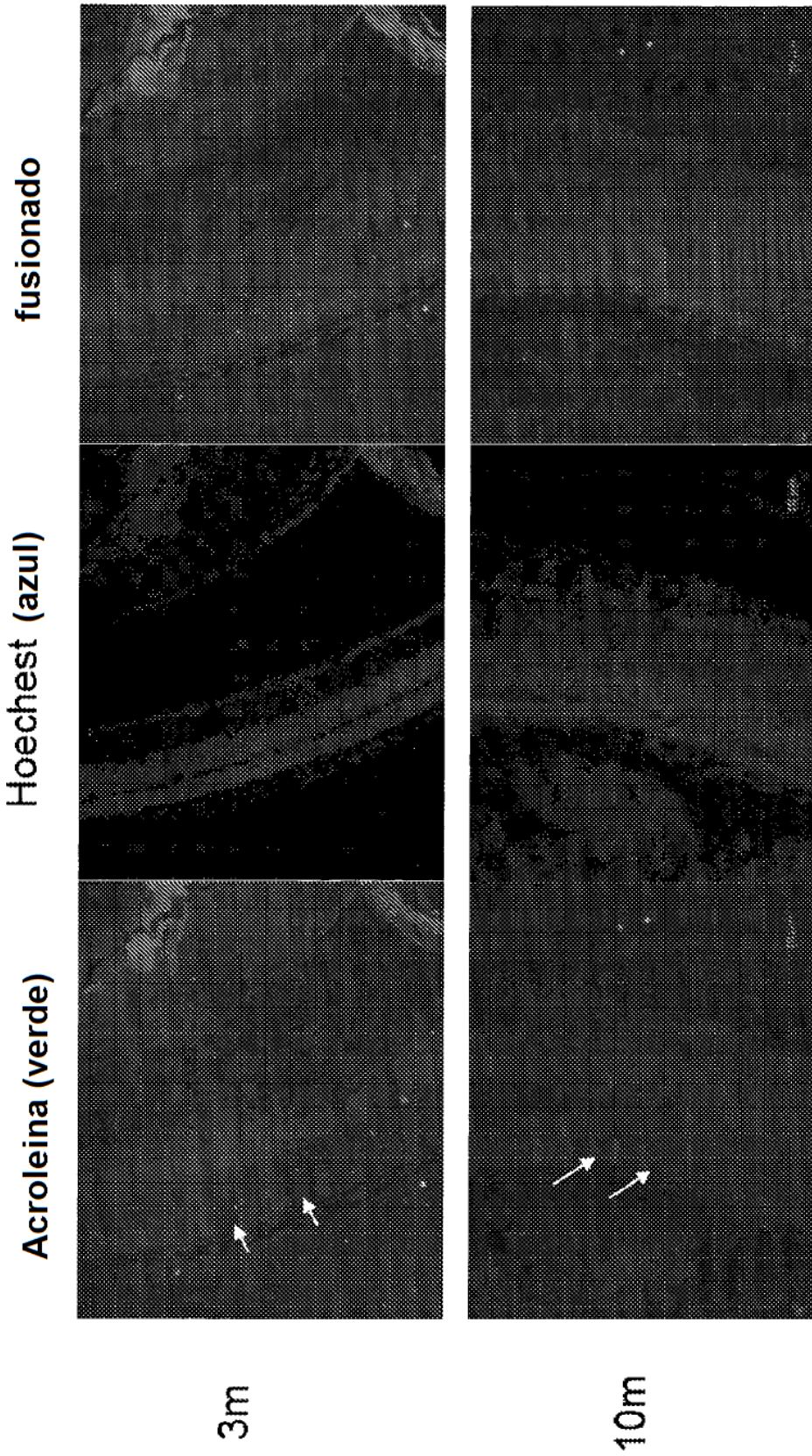


FIG. 31

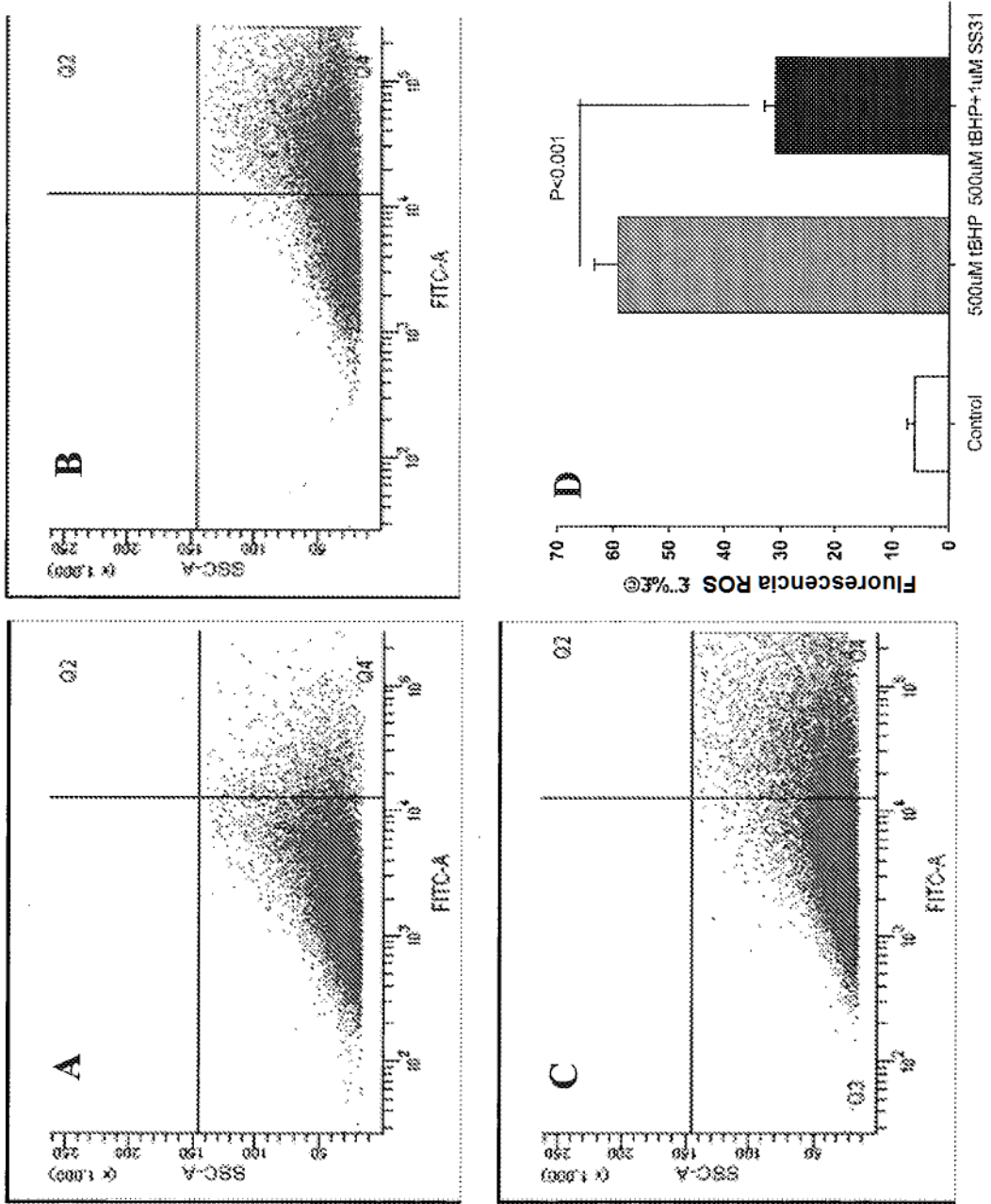


FIG. 32

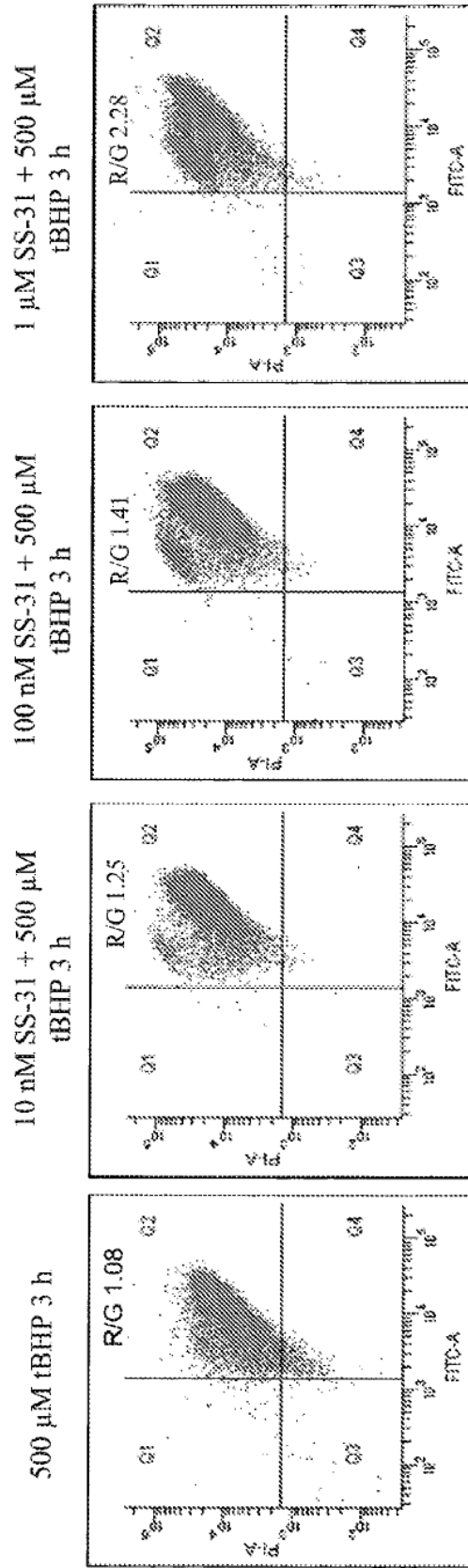


FIG. 33

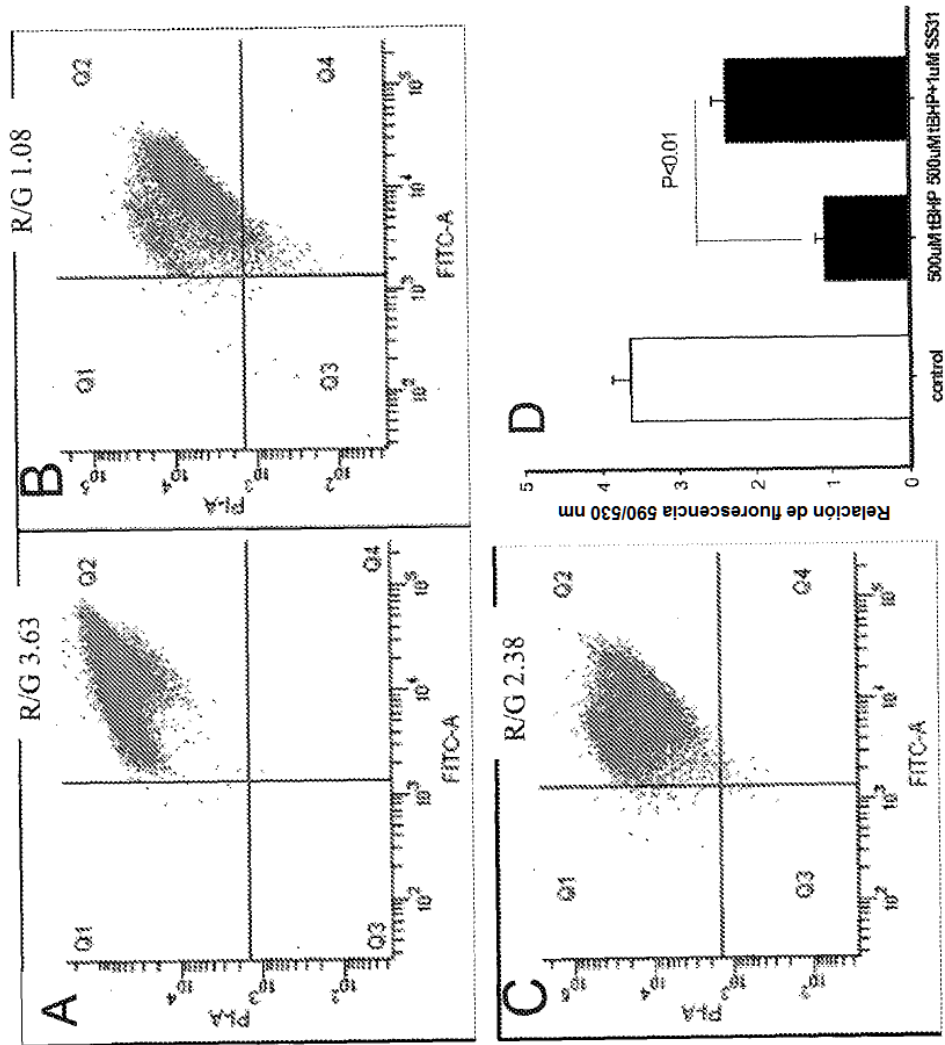


FIG. 34

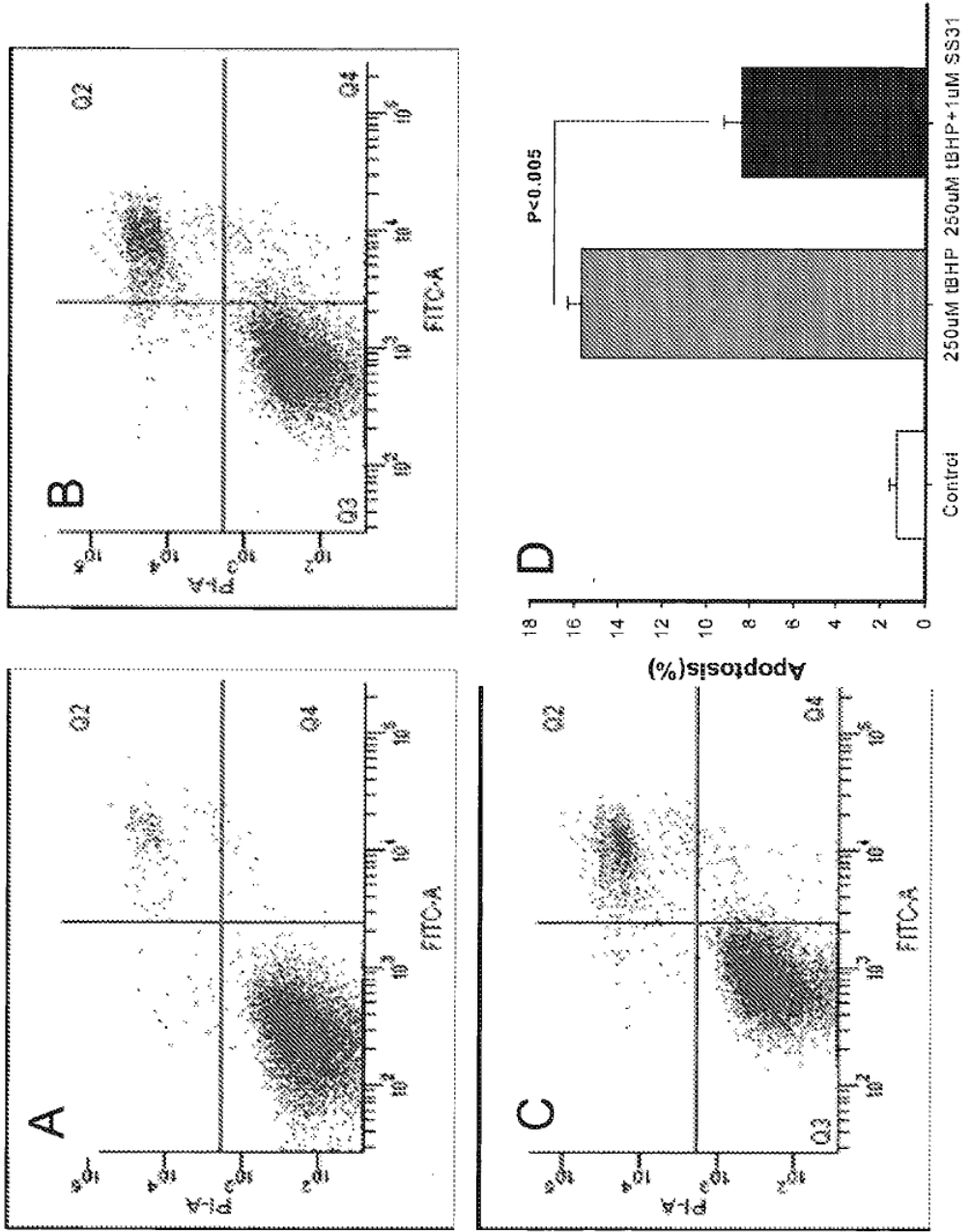


FIG. 35

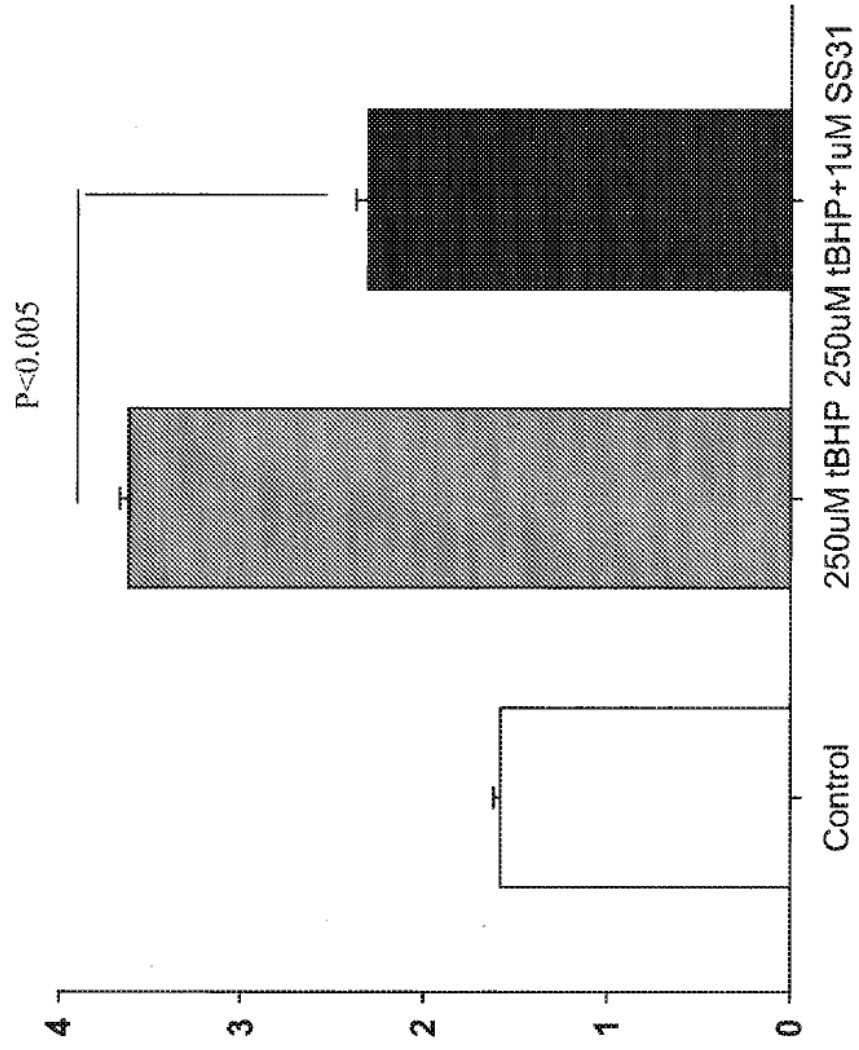


FIG. 36

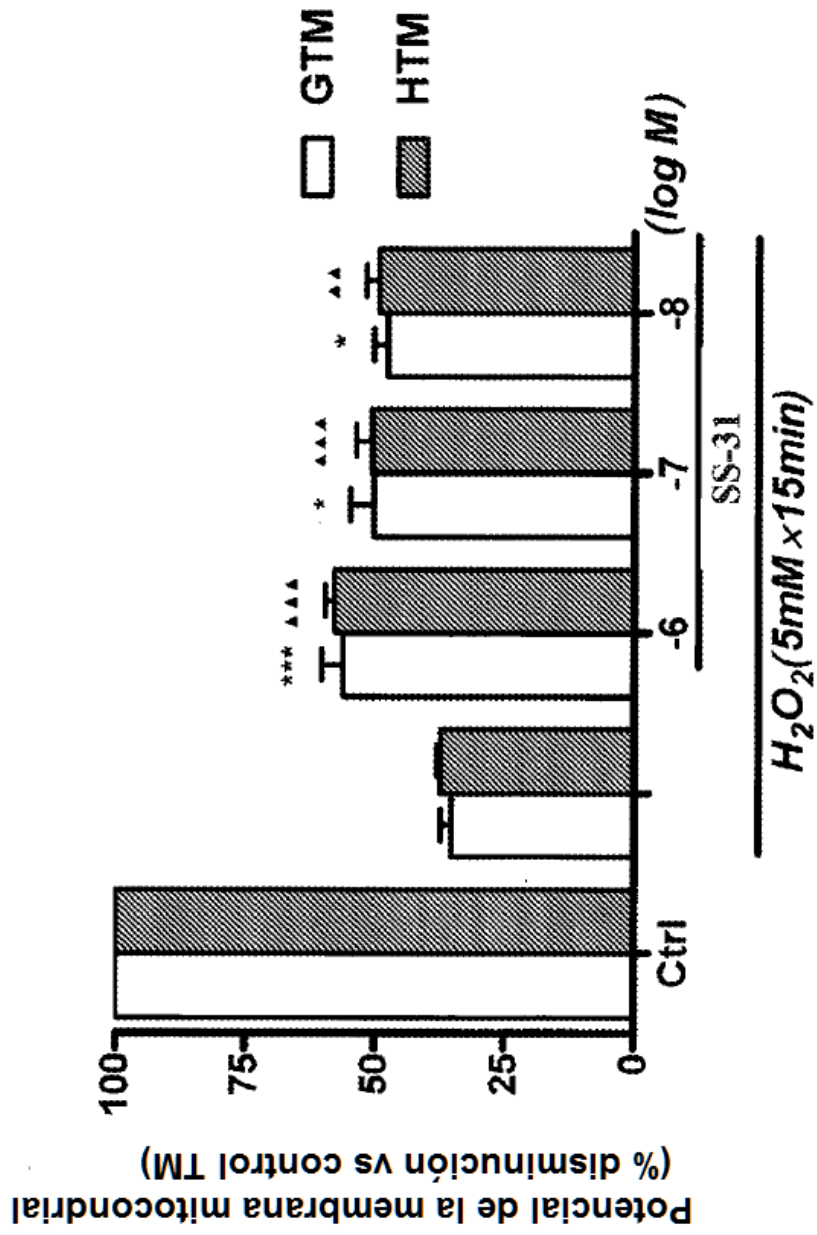


FIG. 37

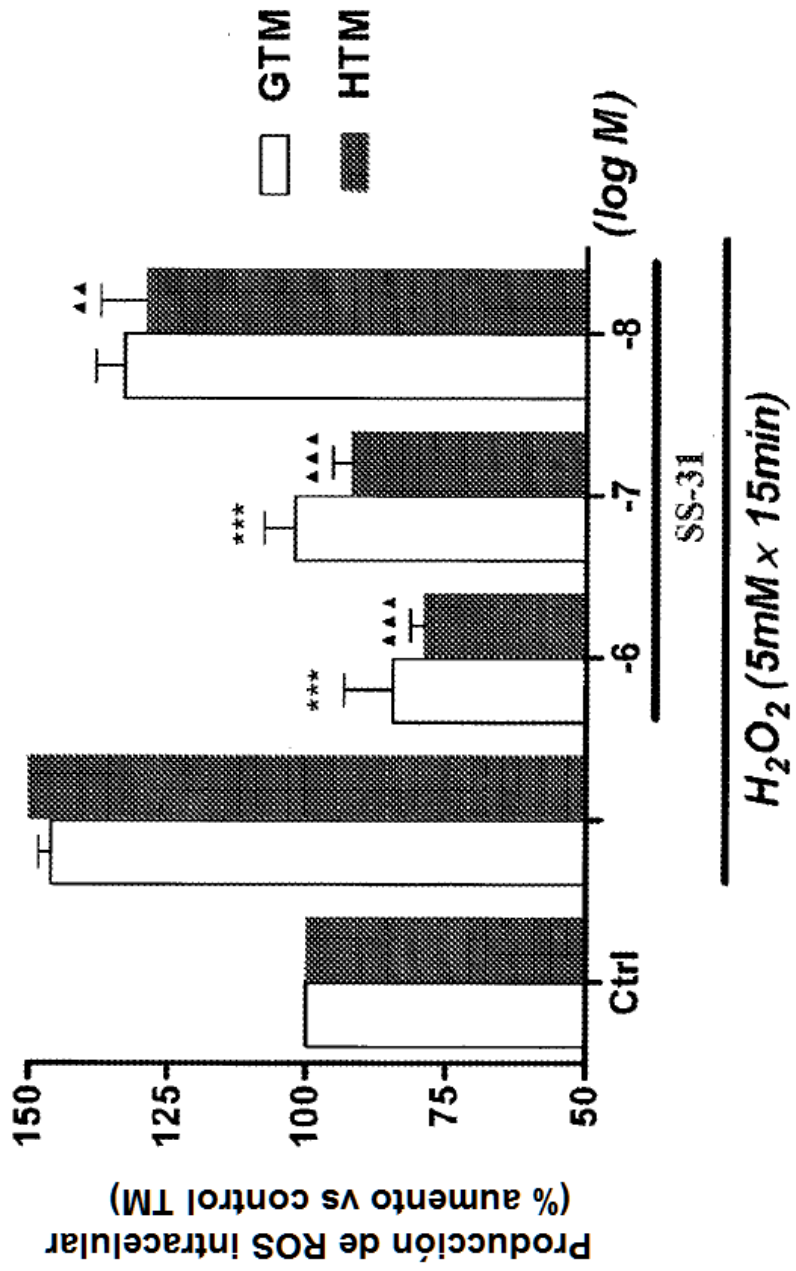


FIG. 38

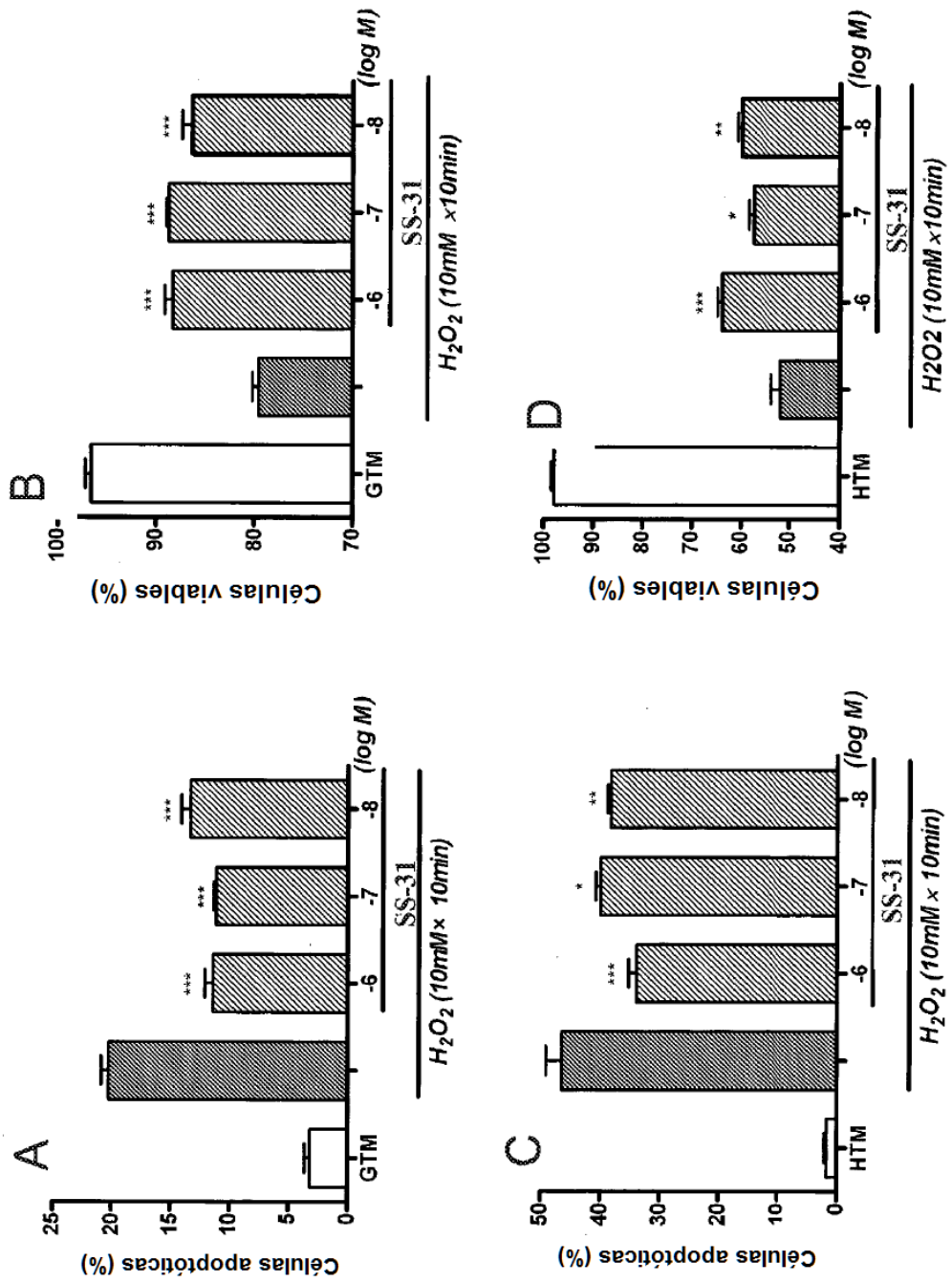


FIG. 39

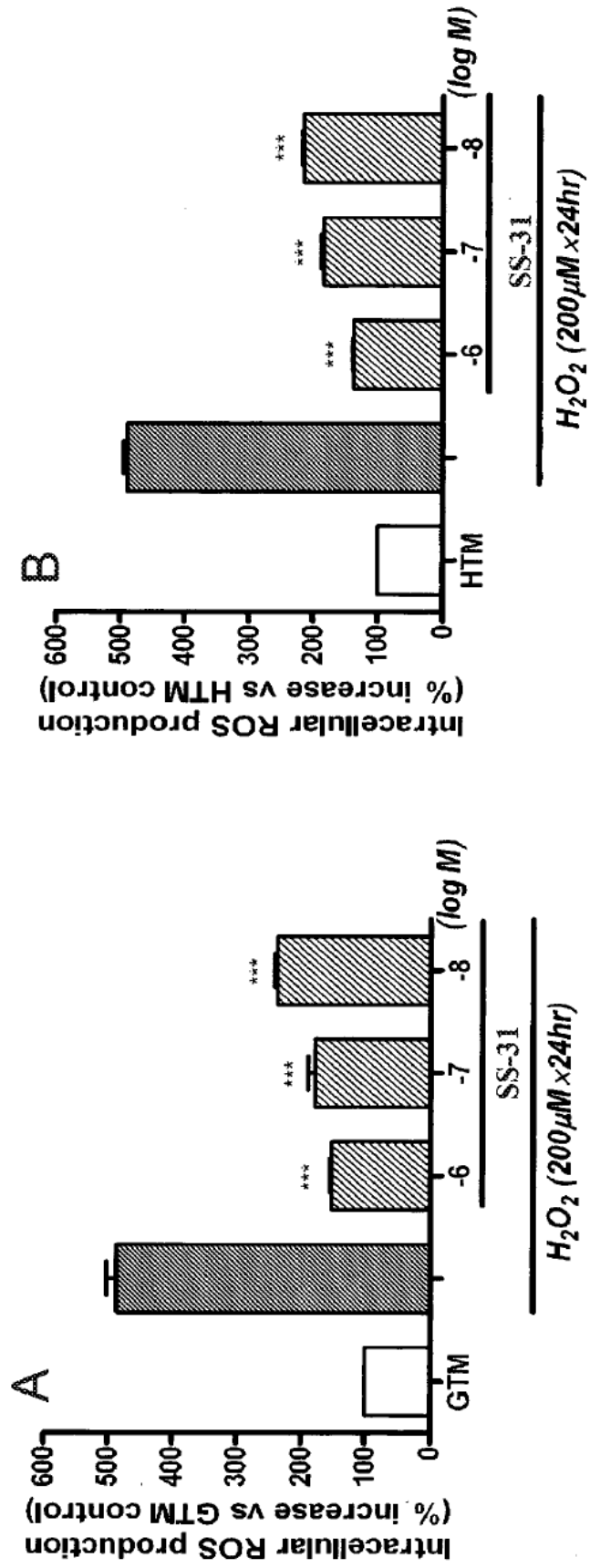


FIG. 40

