

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 504**

51 Int. Cl.:

A61K 38/03	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)
C07K 5/00	(2006.01)
C07K 5/10	(2006.01)
C07K 5/11	(2006.01)
C07K 5/103	(2006.01)
C07K 5/117	(2006.01)
C07K 5/107	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2004** **E 14186875 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2865385**

54 Título: **Usos de un péptido aromático catiónico**

30 Prioridad:

04.02.2003 US 444777 P
08.01.2004 US 535690 P

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

14.03.2017

73 Titular/es:

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(50.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US y
CLINICAL RESEARCH INSTITUTE OF MONTREAL
(50.0%)

72 Inventor/es:

SZETO, HAZEL H;
ZHAO, KESHENG y
SCHILLER, PETER W

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 605 504 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

Usos de un péptido aromático catiónico

5 **Antecedente de la invención**

Las mitocondrias existen en prácticamente todas las células eucariotas, y son esenciales para la supervivencia celular produciendo trifosfato de adenosina (ATP) mediante la fosforilación oxidativa. La interrupción de esta función vital puede conducir a la muerte celular.

10 Las mitocondrias juegan también un papel principal en la regulación del calcio intracelular acumulando calcio (Ca^{2+}). La acumulación de calcio se produce en la matriz mitocondrial a través de un monoportador impulsor del potencial de membrana.

15 La captación del calcio activa las deshidrogenasas mitocondriales, y puede ser importante para el sostenimiento de la producción de energía y la fosforilación oxidativa. Además, la mitocondria sirve como un sumidero del Ca^{2+} citosólico en exceso, protegiendo de esta manera la célula de la sobrecarga de Ca^{2+} y de la muerte necrótica.

20 La isquemia o la hipoglicemia pueden conducir a la disfunción mitocondrial, incluyendo la hidrólisis del ATP y la sobrecarga de Ca^{2+} . La disfunción produce transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). MPT se caracteriza por un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, aumento de la permeabilidad de la membrana interna e hinchazón.

25 Además, el espacio intermembrana de las mitocondrias es un depósito de proteínas apoptogénicas. Por tanto, la pérdida del potencial mitocondrial y de la MPT puede conducir a la liberación de proteínas apoptogénicas en el citoplasma. No resulta sorprendente que exista una acumulación de evidencias de que MPT está implicada en la muerte celular necrótica y apoptótica (Crompton, *Biochem J.* 341: 233-249, 1999). Formas más leves de daños celulares pueden conducir a la apoptosis en lugar de a la neurosis.

30 La ciclosporina puede inhibir MPT. El bloqueo de MPT por la ciclosporina A puede inhibir la apoptosis en algunos tipos de células, incluyendo las células que experimentan isquemia, hipoxia, sobrecarga de Ca^{2+} y estrés oxidativo (Kroemer y col., *Annu Rev Physiol.* 60:619-642, 1998).

35 Ciclosporina A, es menos que óptimo como fármaco de tratamiento frente a la muerte celular y apoptótica. Por ejemplo, ciclosporina A no se dirige de forma específica en la mitocondria. Además, se libera mal en el cerebro. Además, la utilidad de ciclosporina A está reducida por su actividad inmunosupresora.

40 El tetrapéptido [Dmt1] DALDA (2',6'-dimetilrosina-D-Arg-Phe-Lys-NH₂; SS-02) tiene un peso molecular de 640 y transporta tres cargas positivas netas a pH fisiológico. [Dmt1] DALDA penetra fácilmente la membrana plasmática de algunos tipos de células de mamíferos de una manera dependiente de la energía (Zhao y col., *J Pharmacol Exp Ther.* 304: 425-432, 2003) y atraviesa la barrera hematoencefálica (Zhao y col., *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 188-196, 2002). Aunque se ha demostrado que [Dmt1] DALDA es un potente agonista del receptor mu-opioide, su utilidad no se ha ampliado para incluir la inhibición de MPT.

45 De esta manera, existe la necesidad de inhibir MPT en condiciones tales como reperusión por isquemia, hipoxia, hipoglucemia, y otras enfermedades y dolencias que dan como resultado cambios patológicos como resultado de la transición de la permeabilidad de las membranas mitocondriales. Dichas enfermedades y dolencias incluyen muchas de las enfermedades neurodegenerativas comunes.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona el uso de un péptido catiónico aromático para potenciar la conservación de un órgano extraído de un mamífero donde el péptido catiónico aromático tiene la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂;

55 **Breve descripción de las figuras**

60 Figura 1: Internalización celular y acumulación de [Dmt1] DALDA (SS-02) en mitocondrias. (A) La captación mitocondrial de SS-19 se determinó utilizando espectrofotometría de fluorescencia (ex/em = 320/420 nm). La adición de mitocondrias de hígado de ratón aisladas (0,35 mg/ml) dio como resultado una detención inmediata de la intensidad de la fluorescencia de SS-19 (*línea gris*). El pretratamiento de mitocondrias con FCCP (1,5 μM) redujo la detención inmediata en < 20 % (*línea negra*). (B) Se incubaron mitocondrias aisladas con [³H] SS-02 a 37° C durante 2 min. Se detuvo la captación mediante centrifugación (16000 x g) durante 5 min a 4° C, y se determinó la radiactividad en el aglomerado. El pretratamiento de las mitocondrias con FCCP inhibió la captación de [³H] SS-02 en ~20 %. Se muestran los datos como promedio \pm s.e.; n = 3.*, P < 0,05 mediante el test de la t de Student. La captación de TMRM por las mitocondrias aisladas se pierde tras la hinchazón mitocondrial inducida por alameticina, mientras que la captación de SS-19 queda retenida en gran medida. *Línea negra*,

65

TMRM, *línea roja*, SS-19. (D) La adición de SS-0 (200 μM) a mitocondrias aisladas no altera el potencial mitocondrial, tal como se midió por fluorescencia de TMRM. La adición de FCCP (1,5 μM) produjo la inmediata despolarización mientras que Ca^{2+} (150 μM) dio como resultado la despolarización y el comienzo progresivo de MPT.

5
10
15
Figura 2. [Dmt1] DALDA (SS-02) protege contra la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) inducida por sobrecarga de Ca^{2+} y ácido 3-nitropropiónico (3NP). (A) El pretratamiento de mitocondrias aisladas con 10 μM de SS-02 (adición indicada por la flecha que apunta hacia abajo) evitó el inicio de MPT producido por sobrecarga de Ca^{2+} (flecha apuntando hacia arriba). *Línea negra*, tampón; *línea roja*, SS-02. (B) El pretratamiento de mitocondrias aisladas con SS-02 aumentó la tolerancia mitocondrial de múltiples adiciones de Ca^{2+} antes del inicio de MPT. La flecha indica la adición del tampón de SS-02. *Línea 1*, tampón, *línea 2*, 50 μM de SS-02; *línea 3*, 100 μM de SS-02. (C) SS-02 retrasó de forma dependiente de la dosis el inicio de MPT producido por 1 mM de 3NP. La flecha indica la adición de tampón o de SS-02. *Línea 1*, tampón, *línea 2*, 0,5 μM de SS-02; *línea 3*, 5 μM de SS-02, *línea 4*, 50 μM de SS-02.

20
25
Figura 3. [Dmt1] DALDA (SS-02) inhibe la hinchazón mitocondrial y la liberación del citocromo c. (A) El pretratamiento de mitocondrias aisladas con SS-02 de forma dependiente de la dosis inhibió la hinchazón mitocondrial inducida por 200 μM de Ca^{2+} de una manera dependiente de la dosis. La hinchazón se midió por la absorbancia a 540 nm. (B) SS-02 inhibió la liberación inducida por Ca^{2+} del citocromo c a partir de mitocondrias aisladas. La cantidad de citocromo c liberado se expresó como porcentaje del citocromo c en mitocondrias. Los datos se presentan como promedio \pm s.e., $n = 3$. (C) SS-02 inhibió también la hinchazón mitocondrial inducida por MPP^+ (300 μM).

30
35
Figura 4. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) inhibe la hinchazón mitocondrial y la liberación del citocromo c. (A) El pretratamiento de mitocondrias aisladas con SS-31 (10 μM) evita el inicio de MPT inducida por Ca^{2+} . *Línea gris*, tampón; *línea roja*, SS-31. (B) El pretratamiento de mitocondrias con SS-31 (50 μM) inhibió la hinchazón mitocondrial inducida por 200 mM de Ca^{2+} . Se midió la hinchazón mediante la dispersión de luz medida a 570 nm. (C). Comparación de SS-02 y SS-31 con ciclosporina (CsA) en la inhibición de la hinchazón mitocondrial y la liberación del citocromo C inducida por Ca^{2+} . La cantidad de citocromo C liberado se expresó como porcentaje del total del citocromo c en mitocondrias. Los datos se presentan como promedio \pm s.e., $n = 3$.

40
45
Figura 5. [Dmt1] DALDA (SS-02) y D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) protegen la fuerza contráctil del miocardio durante la reperfusión por isquemia en el corazón de cobaya perfundido aislado. Los corazones se perfundieron con tampón o tampón que contenía SS-02 (100 nM) o SS-31 (1 nM) durante 30 min y se sometieron a continuación a 30 min de isquemia global. La reperfusión se llevó a cabo utilizando la misma disolución de perfusión. Se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento (ANOVA bilateral, $P < 0,001$).

50
55
Figura 6. La adición de [Dmt1] DALDA a una solución cardioplégica mejoró significativamente la función contráctil después de una isquemia prolongada en el corazón de cobaya perfundido aislado. Después de 30 min de estabilización, los corazones se sometieron a perfusión con la solución cardioplégica de St. Thomas (CPS) o CPS que contenía [Dmt1] DALDA a 100 nM durante 3 min. A continuación se indujo la isquemia global mediante la interrupción completa de la perfusión coronaria durante 90 min: Se llevó a cabo posteriormente la reperfusión durante 60 min., con solución de Krebs-Henseleit oxigenada. La fuerza contráctil posterior a la isquemia fue significativamente mejorada en el grupo que recibía [Dmt1] DALDA ($P < 0,001$).

Descripción detallada de la invención

50
55
La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los inventores de que determinados péptidos catiónicos aromáticos reducen significativamente el número de mitocondrias que experimentan, o incluso evitan completamente, la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Reducir el número de mitocondrias que experimentan, y evitan, MPT es importante, debido a que MPT está asociada con algunas enfermedades y dolencias comunes en mamíferos. Además, un órgano extraído de un mamífero es susceptible a MPT. Estas enfermedades y dolencias son de particular importancia clínica ya que afectan a una proporción grande de la población humana en alguna etapa durante su lapso de vida.

Péptidos

60
El péptido catiónico aromáticos usado en la presente invención es soluble en agua y muy polar. A pesar de estas propiedades, el péptido puede penetrar fácilmente las membranas celulares.

Algunos péptidos útiles actividad agonista del receptor mu-opioide (es decir, activan el receptor mu-opioide). La activación del receptor mu-opioide estimula normalmente un efecto analgésico.

65
En algunos casos, puede ser de utilidad un péptido catiónico aromático que tenga actividad para el receptor mu-opioide. Por ejemplo, durante el tratamiento a corto plazo, tal como en una enfermedad o dolencia aguda, puede ser

beneficioso usar un péptido catiónico aromático que active el receptor mu-opioide. Dichas enfermedades y dolencias agudas están asociadas a menudo con un dolor moderado o severo. En estos ejemplos, el efecto analgésico del péptido catiónico aromático puede ser beneficioso en la pauta terapéutica del paciente u otro mamífero, aunque puede utilizarse también un péptido catiónico aromático no active el receptor mu-opioide con o sin un analgésico de acuerdo con los requerimientos clínicos.

Alternativamente, en otros casos, puede ser de utilidad un péptido catiónico aromático que no tenga actividad para el receptor mu-opioide. Por ejemplo, para el tratamiento a largo plazo, tal como en una patología o enfermedad crónica, el uso de un péptido catiónico aromático que activa el receptor mu-opioide puede estar contraindicado. En estos casos, los efectos potencialmente adversos o adictivos del péptido catiónico aromático pueden impedir el uso de un péptido catiónico aromático que active el receptor mu-opioide en el régimen de tratamiento de un paciente humano u otro mamífero.

Los efectos potenciales adversos pueden incluir sedación, estreñimiento y depresión respiratoria. En dichos casos, puede ser un tratamiento adecuado un péptido catiónico aromático que no active el receptor mu-opioide.

Los ejemplos de dolencias agudas incluyen ataque al corazón, ictus y lesión traumática. La lesión traumática puede incluir lesión cerebral y de la médula espinal traumática.

Los ejemplos de enfermedades o dolencias crónicas incluyen enfermedad de la arteria coronaria y cualquier trastorno degenerativo tal como los descritos a continuación.

Un ejemplo de un péptido que tiene actividad del receptor mu-opioide es uno que tiene la fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (es decir, Dmt¹-DALDA, que se denomina en el presente documento SS-02)

El péptido catiónico aromático que no tiene actividad del receptor mu-opioide que se utiliza de acuerdo con la presente invención no tiene actividad para el receptor mu-opioide y tiene la fórmula D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂ (denominada en esta memoria descriptiva SS-31).

Métodos de tratamiento

El péptido descrito anteriormente puede ser de utilidad es útil en el tratamiento de cualquier enfermedad o dolencia que se asocia con MPT. Dichas enfermedades y dolencias incluyen, pero no se limitan a, isquemia y/o reperfusión de un tejido u órgano, hipoxia y cualquiera de numerosas enfermedades degenerativas. Los mamíferos que necesitan de tratamiento o prevención de MPT son aquellos mamíferos que padecen de estas enfermedades o dolencias. En la presente invención, en su totalidad, el péptido se utiliza para la preservación de un órgano extraído de un mamífero, donde el péptido catiónico aromático tiene la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.

Isquemia en un tejido u órgano de un mamífero es una dolencia patológica multifacetada que está producida por privación del oxígeno (hipoxia) y/o privación de glucosa (por ejemplo, sustrato). La privación del oxígeno y/o la glucosa en las células de un tejido u órgano conduce a una reducción o la pérdida total de capacidad de generación de energía y la consiguiente pérdida de función del transporte de iones activos a través de las membranas celulares. La privación de oxígeno y/o glucosa conduce también a cambios patológicos en otras membranas celulares, que incluyen la transición de la permeabilidad en las membranas mitocondriales. Además, otras moléculas, tales como las proteínas apoptóticas normalmente compartimentadas en el interior de la mitocondria, pueden perderse en el citoplasma y producir muerte celular apoptótica. La isquemia profunda puede conducir a muerte celular necrótica.

La isquemia o hipoxia en un tejido u órgano concreto puede ser producida por una pérdida o reducción severa en el suministro de sangre al tejido o al órgano. La pérdida o la reducción severa en el suministro de sangre puede, por ejemplo, deberse a ictus tromboembólico, aterosclerosis coronaria, o enfermedad vascular periférica. El tejido afectado por isquemia o hipoxia es normalmente el músculo, tal como el cardíaco, esquelético, o músculo liso.

El órgano afectado por isquemia o hipoxia puede ser cualquier órgano que está sujeto a isquemia o hipoxia. Los ejemplos de órganos afectados por isquemia o hipoxia incluyen cerebro, corazón, riñón, y próstata. Por ejemplo, la isquemia o hipoxia del músculo cardíaco está producida comúnmente por bloqueos ateroscleróticos o trombóticos que conducen a la reducción o a la disminución del aporte de oxígeno a los tejidos cardíacos desde el suministro de sangre procedente de las arterias cardíacas y de los capilares. Dicha isquemia o hipoxia cardíaca puede producir dolor y necrosis del músculo cardíaco afectado, y en último extremo puede conducir a la insuficiencia cardíaca.

La isquemia o la hipoxia en el músculo esquelético o el músculo liso puede surgir de causas similares. Por ejemplo, la isquemia o la hipoxia en el músculo liso intestinal o el músculo esquelético de las extremidades pueden estar producidos también por bloqueos ateroscleróticos o trombóticos.

La reperfusión es la restauración del flujo sanguíneo a cualquier órgano o tejido donde el flujo de sangre está disminuido o bloqueado. Por ejemplo, el flujo de sangre puede restaurarse en cualquier órgano o tejido afectado por isquemia o hipoxia. La restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) puede producirse mediante cualquier

procedimiento conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la reperfusión de los tejidos cardiacos isquémicos puede deberse a angioplastia, injerto con derivación de la arteria coronaria, o el uso de fármacos trombolíticos.

5 El péptido se puede usar también en el tratamiento o la profilaxis de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la MPT. Las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la MPT incluyen, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA, conocida también como enfermedad de Lou Gherig) Se puede usar el péptido para retrasar el inicio o
10 ralentizar la progresión de estas y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con la MPT. El péptido es particularmente útil en el tratamiento de los seres humanos que padecen de las etapas iniciales de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la MPT y en los seres humanos predispuestos a estas enfermedades.

15 De acuerdo con la presente invención el péptido puede utilizarse también para preservar un órgano de un mamífero antes del trasplante. Por ejemplo, un órgano extraído puede ser susceptible a la MPT debido a la carencia de flujo sanguíneo. Por tanto, el péptido puede utilizarse para evitar la MPT en el órgano extraído

20 El órgano extraído se puede colocar en una solución tampón normalizada, tal como aquella comúnmente utilizada en la técnica. Por ejemplo, un corazón extraído se puede colocar en una solución cardioplégica que contiene el péptido descrito anteriormente. El técnico experto puede determinar fácilmente la concentración del péptido en la solución tamponada normalizada. Dichas concentraciones pueden ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente y aproximadamente 10 μ M, preferentemente aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 10 μ M.

25 El péptido puede también administrarse a un mamífero que toma un fármaco para tratar una dolencia o enfermedad. Si un efecto secundario del fármaco incluye la MPT, los mamíferos que toman dichos fármacos tendrían grandes beneficios procedentes del péptido de la invención.

Un ejemplo de un fármaco que induce toxicidad celular afectando la MPT es el fármaco de terapia Adriamicina.

30 **Síntesis del péptido**

35 El péptido de utilidad en la presente invención puede sintetizarse químicamente mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Dichos métodos para sintetizar la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart y Young en "Solid Phase Peptide Synthesis," Segunda Edición, Pierce Chemical Company (1984), y en "Solid Phase Peptide Synthesis," Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, Nueva York (1997).

Modos de administración

40 El péptido de utilidad en la presente invención puede administrar a un mamífero en una cantidad eficaz para reducir el número de mitocondrias que experimentan, o que evitan, la MPT. La cantidad eficaz se determina durante los ensayos preclínicos y los ensayos clínicos mediante métodos con los que están familiarizados los médicos y otros profesionales sanitarios.

45 Una cantidad eficaz de un péptido de utilidad en la presente invención, preferentemente en una composición farmacéutica, puede administrarse a un mamífero que necesita la misma mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos para administrar los compuestos farmacéuticos.

50 El péptido puede administrarse sistémica o localmente. En una realización, el péptido se administra de forma intravenosa. Por ejemplo, el péptido catiónico aromático puede administrarse mediante inyección rápida de bolo intravenoso. Preferentemente, sin embargo, el péptido se administra a una velocidad constante de infusión intravenosa.

55 El péptido se puede inyectar directamente en la arteria coronaria durante, por ejemplo, angioplastia o cirugía de derivación coronaria, o aplicarse en las prótesis endovasculares coronarias.

El péptido puede administrarse también por vía oral, tópica, intranasal, intramuscular, subcutánea, o transdérmica. En una realización preferida, la administración transdérmica del péptido catiónico aromático es mediante iontoforesis, donde el péptido cargado se libera a través de la piel mediante una corriente eléctrica.

60 Otras vías de administración incluyen la intracerebroventricular o la intratecal. Intracerebroventricularmente se refiere a la administración en el sistema ventricular del cerebro. Intratecal se refiere a la administración en el espacio bajo la membrana aracnoide de la médula espinal. De esta manera, la administración intracerebroventricular o intratecal puede preferirse para aquellas enfermedades y dolencias que afectan los órganos o tejidos del sistema nervioso central. En una realización preferida, se usa la administración intratecal para la lesión traumática de la médula
65 espinal.

El péptido de utilidad en la presente invención puede también administrarse a mamíferos mediante liberación continua, como se conoce en la técnica. La administración mediante liberación continua es un método de administración del fármaco para conseguir un determinado nivel del fármaco durante un periodo de tiempo concreto. El nivel se mide normalmente mediante la concentración en suero o plasma.

5 Cualquier formulación conocida en la técnica de farmacia es adecuada para la administración del péptido de utilidad en la presente invención. Para la administración oral, se pueden utilizar formulaciones líquidas o sólidas. Algunos ejemplos de formulaciones incluyen comprimidos, cápsulas de gelatina, píldoras, comprimidos gruesos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, chicles y similares. El péptido se puede mezclar con un vehículo farmacéutico
10 adecuado (portador) o excipiente tal como entienden los expertos en la materia. Los ejemplos de vehículos y excipientes incluyen almidón, leche, azúcar, determinados tipos de arcillas, gelatina, ácido láctico, ácido esteárico o sus sales, que incluyen estearato de magnesio o de calcio, talco, grasas o aceites vegetales, gomas y glicoles.

15 Para la administración sistémica, intracerebroventricular, intratecal, tópica, intranasal, subcutánea, o transdérmica, las formulaciones del péptido de utilidad en la presente invención pueden utilizar diluyentes, portadores o excipientes convencionales, etc., tales como se conocen en la técnica que se pueden emplear para administrar los péptidos. Por ejemplo, las formulaciones pueden comprender uno o más de las siguientes: un estabilizante, un tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico, y opcionalmente una sal y/o un agente tamponante. El péptido puede administrarse en la forma de una disolución acuosa, o en una forma liofilizada.

20 El estabilizante puede ser, por ejemplo, un aminoácido, tal como por ejemplo, glicina; o un oligosacárido, tal como por ejemplo, sacarosa, trehalosa, lactosa o dextrano. De forma alternativa, el estabilizante puede ser un alcohol azucarado, tal como por ejemplo, manitol, o una de sus combinaciones. Preferentemente el estabilizante o la combinación de estabilizantes constituye entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % en peso para el
25 peso del péptido.

El tensioactivo es preferentemente un tensioactivo no iónico, tal como un polisorbato. Algunos ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen Tween20, Tween80; un polietilenglicol o un polioxietilen polioxipropilenglicol, tal como Pluronic F-68 a entre aproximadamente 0,001 % (p/v) a aproximadamente 10 % (p/v).

30 La sal o agente tamponante puede ser cualquier sal o agente tamponante, tal como por ejemplo, cloruro de sodio, o fosfato de sodio/potasio, respectivamente. Preferentemente, el agente tamponante mantiene el pH de la composición farmacéutica en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5. La sal y/o el agente tamponante es también útil para mantener la osmolalidad a un nivel adecuado para la administración a un ser humano o un animal. Preferentemente la sal o el agente tamponante está presente en una concentración
35 aproximadamente isotónica de aproximadamente 150 mOsm a aproximadamente 300 mM.

Las formulaciones del péptido de utilidad en la presente invención pueden contener adicionalmente uno o más aditivos convencionales. Algunos ejemplos de dichos aditivos incluyen un solubilizante tal como, por ejemplo, glicerol; un antioxidante tal como por ejemplo, cloruro de benzalconio (una mezcla de compuestos de amonio cuaternario, conocidos como "quats"), alcohol bencílico, cloretona o clorobutanol; agente anestésico tal como por ejemplo un derivado de morfina, o un agente isotónico, etc., tal como se ha descrito anteriormente. Como una precaución adicional frente a la oxidación u otro deterioro, las composiciones farmacéuticas pueden almacenarse con nitrógeno gas en viales cerrados herméticamente con retenedores impermeables.

45 El mamífero puede ser cualquier mamífero, incluyendo, por ejemplo, animales de granja, tales como ovejas, cerdos, y caballos, mascotas, tales como perros y gatos, animales de laboratorio, tales como ratas, ratones y conejos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

50 Ejemplos

Los Ejemplos 1 a 7 que utilizan el compuesto [Dmt¹]DALDA (SS-02) son solo para referencia y no forman parte de la presente invención.

55 Ejemplo 1: [Dmt¹] DALDA penetra la membrana celular.

Se estudió la captación celular de [³H][Dmt¹] DALDA utilizando una línea de células epiteliales intestinales humanas (Caco-2), y se confirmó con SH-ST5Y (célula de neuroblastoma humano), HEK293 (células de riñón embrionario humano) y células CRFK (células epiteliales de riñón). Se hicieron crecer monocapas de células en placas de 12 pocillos (5x10⁵ células/pocillo) revestidas con colágeno durante 3 días. En el día 4, las células se lavaron dos veces con HBSS precalentado, y a continuación se incubaron con 0,2 ml de HBSS que contienen cualquiera de 250 nM [³H][Dmt¹] DALDA a 37°C o 4°C durante varias veces hasta 1 h.

65 [³H][Dmt¹] DALDA se observó en el lisado celular tan pronto como en 5 min, y se consiguieron niveles a estado estacionario en 30 min. La cantidad total de [³H][Dmt¹] DALDA recuperado en el lisado celular tras 1 h de incubación representó aproximadamente un 1 % del fármaco total. La captación de [³H][Dmt¹] DALDA fue más lenta a 4°C en

comparación con 37° C, pero alcanzó un 76,5 % en 45 min y un 86,3 % en 1 h. La internalización [³H][Dmt¹] DALDA no se limitó a células Caco-2, sino que se observó también en células SH-SY5Y, HEK293 y CRFK. Se estimó que la concentración intracelular de [Dmt¹] DALDA era aproximadamente 50 veces más que la concentración extracelular.

- 5 En un experimento separado, se incubaron las células con una gama de concentraciones de [Dmt¹] DALDA (1 μM – 3 mM) durante 1 h a 37° C. Al término del periodo de incubación, se lavaron las células 4 veces con HBSS, y se añadieron 0,2 ml de NaOH 0,1 N con SDS al 1 % a cada pocillo. A continuación, los contenidos celulares se transfirieron a viales de centelleo y se contó la radiación. Para distinguir entre la radioactividad internalizada procedente de la radioactividad asociada a la superficie, se incluyó una etapa de lavado ácido. Antes de la lisis celular, se incubaron las células con 0,2 ml de ácido acético 0,2 M / NaCl 0,05 M durante 5 min en hielo.

15 Se confirmó la captación [Dmt¹] DALDA en células Caco-2 mediante microscopio de barrido de laser confocal (CSLM) utilizando un análogo fluorescente de [Dmt¹] DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-dnsDap-NH₂; donde dnsDap = ácido β-dansil-1-α,β-diaminopropiónico). Se hicieron crecer las células tal como se ha descrito anteriormente y se sembraron en placas de fondo de vidrio (35 mm) (MatTek Corp., Ashland, MA) durante 2 días. A continuación se retiró el medio y se incubaron las células con 1 ml de HBSS que contenía de 0,1 μM a 1,0 μM del análogo de péptido fluorescente a 37° C durante 1 h: A continuación, las células se lavaron tres veces con HBSS enfriado en hielo y se cubrieron con 200 μl de PBS, y se llevó a cabo la microscopía en un lapso de tiempo de 10 min a temperatura ambiente utilizando un microscopio Nikon de barrido de laser confocal con objetivo C-Apochromat 63x/1,2W corregido. Se llevó a cabo la excitación a 340 nm por medio de un láser de UV, y se midió la emisión a 520 nm: Para el seccionamiento óptico en la dirección z, se prepararon 5-10 marcos con 2,0 μm.

25 El CLSM confirmó la captación de Dmt-D-Arg-Phe-dnsDap-NH₂ fluorescente en células Caco-2 tras la incubación con 0,1 μM de [Dmt¹,DnsDap⁴] DALDA durante 1 h a 37° C. la captación del péptido fluorescente fue similar a 37° C y 4° C. La fluorescencia apareció difusa a lo largo del citoplasma, pero se excluyó completamente del núcleo.

Ejemplo 2: Direccinamiento de [Dmt¹] DALDA hacia la mitocondria

30 Para examinar la distribución subcelular de [Dmt¹]DALDA, se preparó el análogo fluorescente, [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-atnDap-NH₂; donde atn = ácido β-antraniloil-1-α,β-diamino-propiónico. El análogo contenía ácido β-antraniloil-1-α,β-diaminopropiónico en lugar del resto de lisina en la posición 4. Las células se hicieron crecer tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se plaquearon en placas de fondo de vidrio (35 mm) (MatTek Corp., Ashland, MA) durante 2 días. A continuación se retiró el medio y se incubaron las células con 1 ml de HBSS que contenía 0,1 μM de [Dmt¹,AtnDap⁴] DALDA a 37° C durante 15 min a 1 h.

35 Se incubaron también células con éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM, 25 nM), un colorante para teñir mitocondrias, durante 15 min a 37° C. A continuación las células se lavaron tres veces con HBSS enfriado con hielo y se cubrieron con 200 μl de PBS, y se llevó a cabo la microscopía en un lapso de tiempo de 10 min a temperatura ambiente utilizando un microscopio Nikon de barrido de láser confocal con un objetivo C-Apochromat 63x/1,2W corregido.

40 Para [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA, se llevó a cabo la excitación a 350 nm por medio de un láser de UV, y se midió la emisión a 520 nm. Para el TMRM, se llevó a cabo la excitación a 536 nm y se midió la emisión a 560 nm.

45 El CLSM mostró la captación de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA fluorescente en células Caco-2 tras la incubación durante tan poco como 15 min a 37° C. Se excluyó completamente la captación del colorante del núcleo, pero el colorante azul mostró una distribución listada en el citoplasma. Las mitocondrias se marcaron en rojo con TMRM. La distribución de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA en las mitocondrias se demostró por el solapamiento de la distribución de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA y la distribución de TMRM.

50 Ejemplo 3: Captación de [Dmt¹] DALDA en las mitocondrias.

Para aislar las mitocondrias a partir del hígado de ratón, se sacrificaron los ratones mediante decapitación. Se extrajo el hígado y se colocó rápidamente en medio de homogeneización de hígado enfriado. El hígado se dividió finamente utilizando tijeras y a continuación se homogeneizó manualmente utilizando un homogeneizador de vidrio.

55 El homogenado se centrifugó durante 10 min a 1000xg a 4° C. El sobrenadante se aspiró y se transfirió a tubos de policarbonato y se centrifugó de nuevo durante a 3000xg, 4° C. El sobrenadante resultante se retiró, y los lípidos grasos sobre la pared lateral se limpiaron cuidadosamente.

60 El aglomerado se volvió a suspender em medio de homogenado de hígado y la homogeneización se repitió dos veces. El aglomerado mitocondrial purificado final se volvió a suspender en el medio. La concentración de proteínas en la preparación mitocondrial se determinó mediante el procedimiento Bradford.

65 Aproximadamente 1,5 mg de mitocondrias en 400 μl de tampón se incubaron con [³H][Dmt¹]DALDA durante 5-30 min a 37° C. A continuación, las mitocondrias se extrajeron mediante centrifugación y se determinó la cantidad de radioactividad en la fracción mitocondrial y la fracción de tampón. Suponiendo un volumen de matriz mitocondrial de

0,7 µl/mg de proteínas (Lim y col., J Physiol 545: 961-974, 2002), se encontró que la concentración de [³H][Dmt¹] DALDA era 200 veces mayor que en el tampón. Por tanto, [Dmt¹] DALDA se concentró en las mitocondrias.

5 Basándose en estos datos, se puede estimar la concentración de [Dmt¹] DALDA en mitocondrias cuando los corazones de cobaya aislados se perfundieron con [Dmt¹] DALDA

Concentración de [Dmt ¹] DALDA en perfusato coronario	0,1 µM
Concentración de [Dmt ¹] DALDA en miocitos	5 µM
Concentración de [Dmt ¹] DALDA en mitocondrias	1,0 mM

Ejemplo 4: Acumulación de [Dmt¹] DALDA en mitocondrias aisladas (Fig. 1)

10 Para demostrar adicionalmente que [Dmt¹] DALDA se distribuye de forma selectiva en mitocondrias, los inventores examinaron la captación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA y [³H][Dmt¹] DALDA en mitocondrias aisladas de hígado de ratón. La rápida captación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA se observó como una detención inmediata de su fluorescencia tras la adición de mitocondrias (Figura 1A). El pretratamiento de las mitocondrias con FCCP (carbonil cianuro de p-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona), un desacoplador que da como resultado una despolarización inmediata de las
15 mitocondrias, redujo solo la captación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA solamente en <20 %. Por tanto, la captación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA no es dependiente de potencial.

20 Para confirmar que el direccionamiento mitocondrial no era un artefacto del fluoróforo, los inventores examinaron también la captación mitocondrial de [³H][Dmt¹] DALDA. Las mitocondrias aisladas se incubaron con [³H][Dmt¹] DALDA y se determinó la radiactividad en el aglomerado mitocondrial y el sobrenadante. La cantidad de radioactividad en el aglomerado no cambió entre 2 min y 8 min. El tratamiento de las mitocondrias con FCCP disminuyó la cantidad de [³H][Dmt¹] DALDA asociada con el aglomerado mitocondrial solamente en ~ 20 % (Figura 1B).

25 El efecto mínimo de FCCP sobre la captación de [Dmt¹] DALDA sugirió que [Dmt¹] DALDA estuvo probablemente asociado con las membranas mitocondriales o en el espacio intermembrana más bien que en la matriz. Los inventores examinaron a continuación el efecto de la hinchazón mitocondrial sobre la acumulación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA en las mitocondrias utilizando alameticona para inducir la hinchazón y la ruptura de la membrana externa. A diferencia de TMRM, la captación de [Dmt¹, AtnDap⁴] DALDA se invirtió solo parcialmente por la
30 hinchazón mitocondrial (Fig. 1C). de esta manera, [Dmt¹] DALDA se asoció con las membranas mitocondriales.

Ejemplo 5: [Dmt¹] DALDA no altera la respiración o el potencial mitocondrial (Fig. 1D)

35 La acumulación de [Dmt¹] DALDA en mitocondrias no altera la función mitocondrial. La incubación de las mitocondrias de hígado de ratón aisladas con 100 µM de [Dmt¹] DALDA no altera el consumo de oxígeno durante el estado 3 o el estado 4, o la relación respiratoria (estado 3/estado 4) (6,2 frente a 6,0). El potencial de membrana mitocondrial se midió utilizando TMRM (Fig. 1D). La adición de mitocondrias dio como resultado la detención inmediata de la señal de TMRM, que se invirtió fácilmente mediante la adición de FCCP, indicando la despolarización mitocondrial. La adición de Ca²⁺ (150 µM) dio como resultado una inmediata despolarización
40 seguida por la pérdida progresiva de detención indicativa de MPT. La adición de [Dmt¹] DALDA solo, incluso a 200 µM, no produce la despolarización mitocondrial o la MPT.

Ejemplo 6: [Dmt¹] DALDA protege frente a la MPT inducida por Ca²⁺ y ácido 3-nitropropiónico. (Fig. 2)

45 Además de no tener efecto directo sobre el potencial mitocondrial, [Dmt¹] DALDA fue capaz de proteger frente a la MPT inducida por sobrecarga de Ca²⁺. El pretratamiento de las mitocondrias aisladas con [Dmt¹] DALDA (10 µM) durante 2 min antes de la adición de Ca²⁺ dio como resultado solo una despolarización transitoria y evitó el inicio de la MPT (Figura 2A). [Dmt¹] DALDA aumentó de manera dependiente de la dosis la tolerancia de las mitocondrias a los estímulos acumulativos de Ca²⁺. La Figura 2B muestra que [Dmt¹] DALDA aumentó el número de adiciones de Ca²⁺ que las mitocondrias aisladas podrían tolerar antes de MPT.
50

55 Ácido 3-nitropropiónico (3NP) es un inhibidor irreversible de la succinato deshidrogenasa en el complejo II de la cadena de transporte de electrones. La adición de 3NP (1 mM) a las mitocondrias aisladas produjo la disipación del potencial mitocondrial y el inicio de la MPT (Figura 2C). El pretratamiento de las mitocondrias con [Dmt¹] DALDA dependiente de la dosis retrasó el inicio de la MPT inducida por 3NP (Figura 2C).

60 Para demostrar que [Dmt¹] DALDA puede penetrar las membranas celulares y proteger frente a la despolarización mitocondrial estimulada por 3NP, se trataron células Caco-2 con 3NP (10 mM) en ausencia o presencia de [Dmt¹] DALDA (0,1 µM) durante 4 h, y a continuación se incubaron con TMRM y se examinaron con LSCM. En las células del control, las mitocondrias se visualizaron como vetas finas a lo largo del citoplasma. En las células tratadas con 3NP, la fluorescencia de TMRM fue mucho más reducida sugiriendo una despolarización generalizada. En contraste, el tratamiento concurrente con [Dmt¹] DALDA protegió frente a la despolarización mitocondrial producida por 3NP.

Ejemplo 7: [Dmt¹] DALDA protege frente a la hinchazón mitocondrial y la liberación del citocromo c

La apertura de poros debida a la MPT da como resultado la hinchazón mitocondrial. Los inventores examinaron los efectos de [Dmt¹] DALDA sobre la hinchazón mitocondrial midiendo la reducción en la absorbancia a 540 nm (A_{540}).

- 5 La suspensión mitocondrial se centrifugó a continuación y el citocromo c en el aglomerado mitocondrial y el sobrenadante se determinó mediante un kit ELISA comercialmente disponible. El pretratamiento de mitocondrias aisladas con SS-02 inhibió la hinchazón (Fig. 3A) y la liberación del citocromo c (Fig. 3B) inducida por sobrecarga de Ca^{2+} . Además de evitar la MPT inducida por sobrecarga de Ca^{2+} , SS-02 evitó también la hinchazón mitocondrial inducida por MPP⁺ (ion 1-metil-4-fenilpiridinio), un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Fig. 3C).

Ejemplo 8: D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) puede proteger frente a la MPT, la hinchazón mitocondrial y la liberación del citocromo c.

- 15 El péptido no opioide SS-31 tiene la misma capacidad de proteger frente a la MPT (Fig. 4A), la hinchazón mitocondrial (Fig. 4B), y la liberación del citocromo c (Fig. 4C), inducidos por Ca^{2+} . Los métodos para el estudio son los que se han descrito anteriormente para SS-02. En este ejemplo, se midió la hinchazón mitocondrial utilizando dispersión de luz controlada a 570 nm.

- 20 Ejemplo 9: [Dmt¹] DALDA (SS-02) y D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) protege frente al aturdimiento miocárdico inducido mediante reperfusión por isquemia.

Se aislaron rápidamente corazones de cobaya, y se canuló la aorta in situ y se perfundió de una manera retrógrada con una solución de Krebs-Henseleit oxigenada (pH 7,4) a 34° C. A continuación, el corazón se extirpó, se montó sobre un aparato de perfusión de Langendorff modificado, y se perfundió a presión constante (40 cm de H₂O, 3923 Pa). Se midió la fuerza contráctil con un aro pequeño insertado en el ápice del ventrículo izquierdo y se conectó fuertemente la sutura de seda a un transductor del desplazamiento de fuerza. Se midió el flujo coronario mediante una recogida cronometrada del efluente de la arteria pulmonar.

- 30 Los corazones se perfundieron con tampón [Dmt¹] DALDA (SS-02) (100 nM) o D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) (1 nM) durante 30 min y a continuación se sometieron a 30 min de isquemia global. Se llevó a cabo la reperfusión con la misma solución utilizada antes de la isquemia.

El análisis ANOVA bilateral desveló significativas diferencias en la fuerza contráctil ($P < 0,001$), la frecuencia cardiaca ($P = 0,003$) y el flujo coronario ($P < 0,001$) entre los tres grupos de tratamiento. En el grupo del tampón, la fuerza contráctil fue significativamente menor durante la reperfusión en comparación con antes de la isquemia (Fig. 5). Los corazones tratados con SS-02 y SS-31 toleraron la isquemia mucho mejor que los corazones tratados con tampón (Fig. 5). En particular, SS-31 proporcionó una completa inhibición del aturdimiento cardiaco. Además, el flujo coronario se mantuvo bien durante la reperfusión y no hubo disminución de la frecuencia cardiaca.

- 40 Ejemplo 10: [Dmt¹] DALDA (SS-02) potencia la preservación del órgano

Para el trasplante de corazón, el corazón del donante se preserva en una solución cardioplégica durante el transporte. La solución de preservación contiene niveles elevados de potasio que detienen eficazmente el latido del corazón y conservan la energía. Sin embargo, el tiempo de supervivencia del corazón aislado sigue siendo muy limitado.

- 50 Los inventores examinaron si [Dmt¹] DALDA prolonga la supervivencia de órganos. En este estudio, [Dmt¹] DALDA se añadió a una solución cardioplégica comúnmente utilizada (St. Thomas) para determinar si [Dmt¹] DALDA potencia la supervivencia del corazón tras isquemia prolongada (modelo de supervivencia de órganos *ex vivo*).

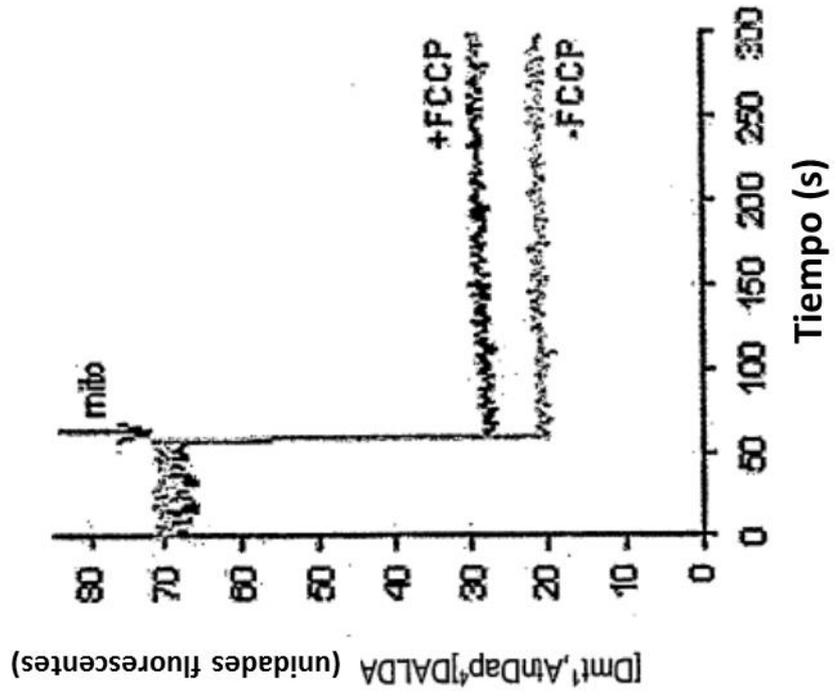
Se sometieron a perfusión corazones de cobaya aislados de una manera retrógrada con una solución de Krebs-Henseleit oxigenada a 34° C. Después de 30 min de estabilización, los corazones se sometieron a perfusión con una solución CPS cardioplégica (St. Thomas) con o sin [Dmt¹] DALDA a 100 nM durante 3 min. A continuación, se indujo la isquemia global mediante la interrupción completa de la perfusión coronaria durante 90 min. Se llevó a cabo posteriormente la reperfusión durante 60 min, con solución de Krebs-Henseleit oxigenada. Se controlaron la fuerza contráctil, la frecuencia cardiaca y el flujo coronario de forma continua a lo largo del experimento.

- 60 La adición de [Dmt¹] DALDA a la solución cardioplégica potenció de forma significativa la función contráctil (Fig. 6) tras la isquemia prolongada.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Uso de un péptido catiónico aromático para potenciar la conservación de un órgano extirpado de un mamífero, donde el péptido catiónico aromático tiene la fórmula: D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.
 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el uso comprende introducir un corazón extirpado en una solución cardioplégica que contiene el péptido.

Figura 1A



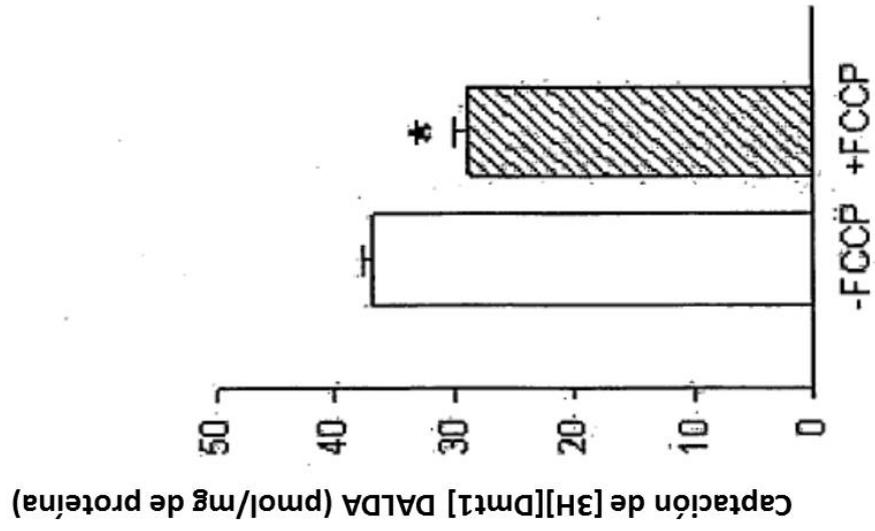
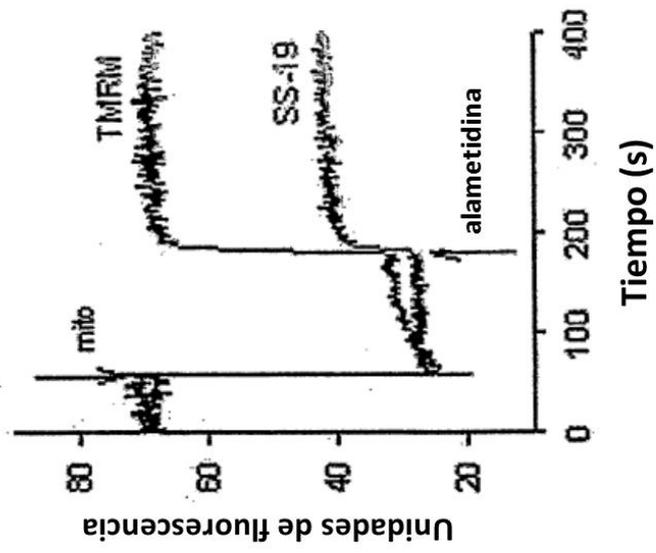


Figura 1B

Figura 1C



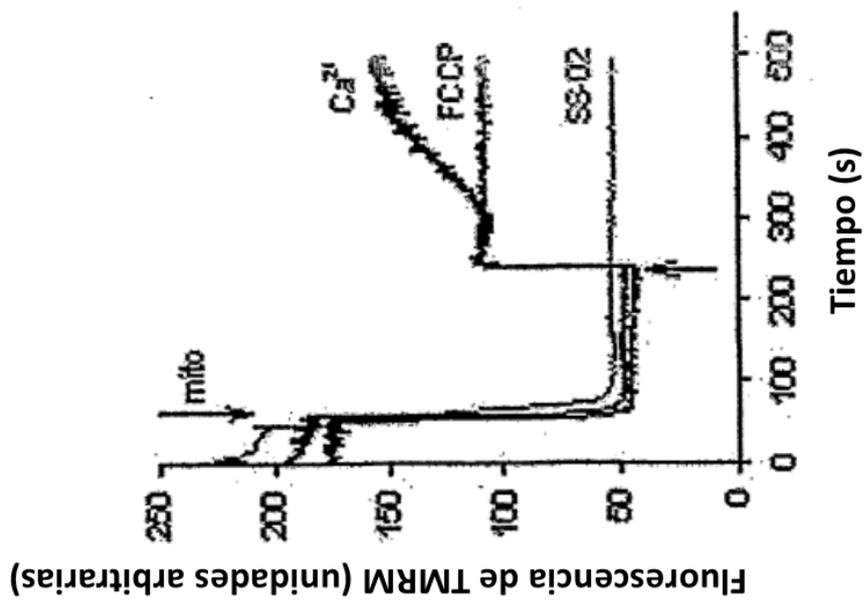


Figura 1D

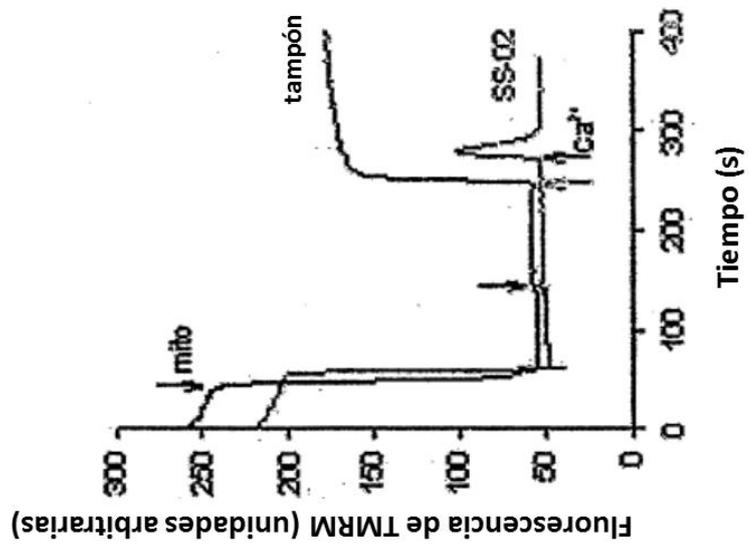


Figura 2A

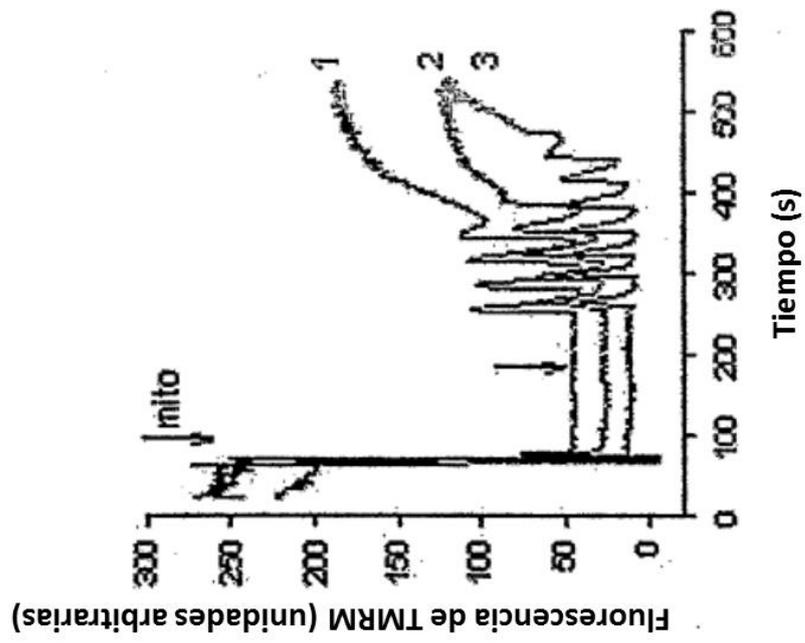


Figura 2B

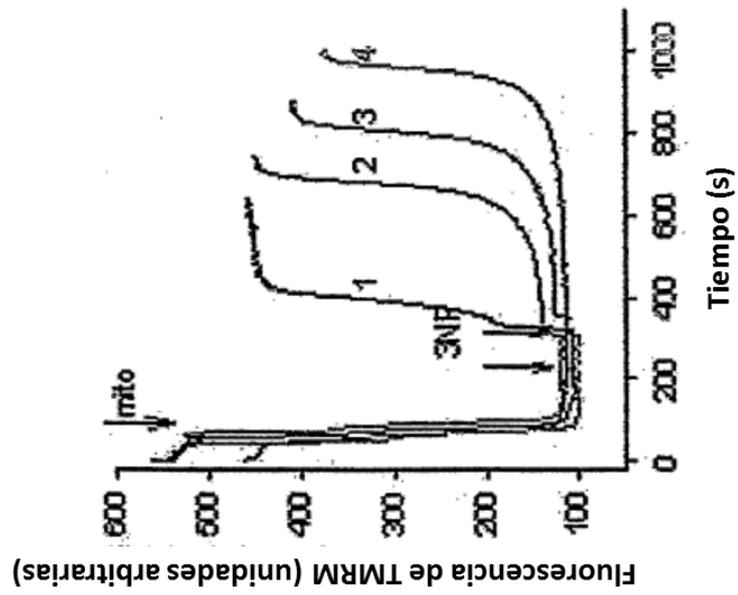


Figura 2C

Figura 3A

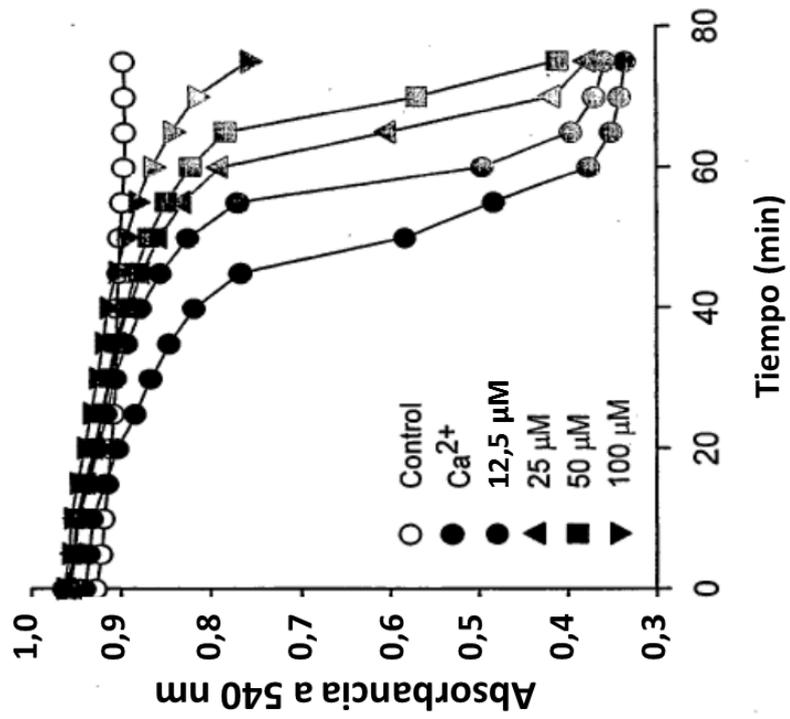
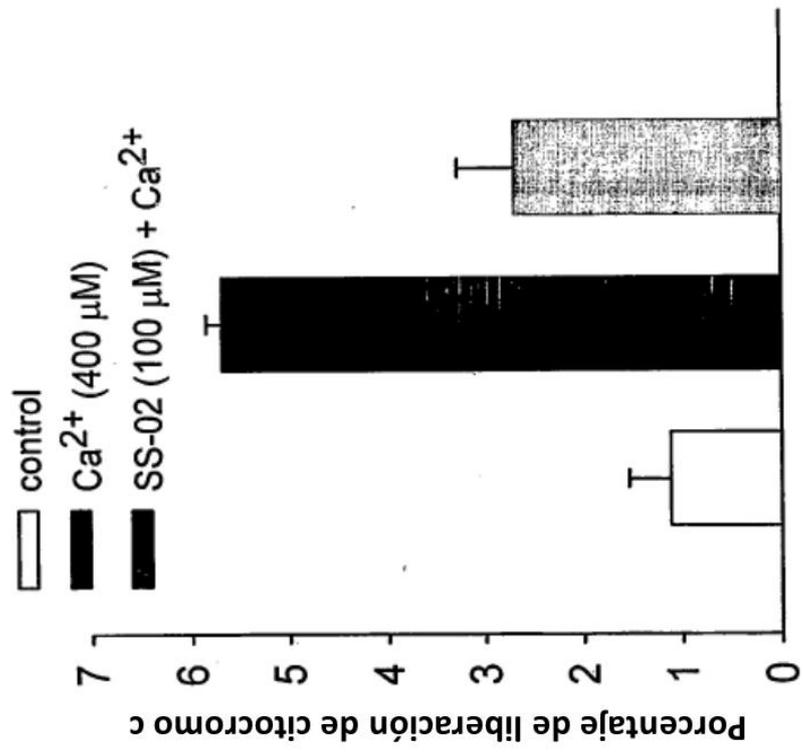


Figura 3B



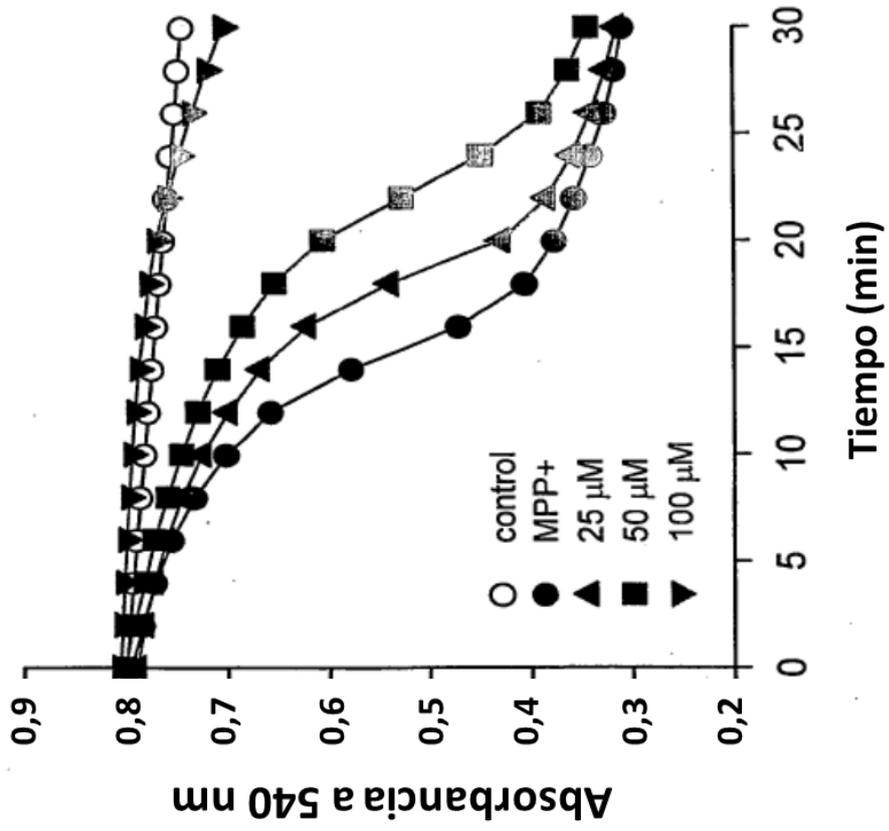


Figura 3C

Figura 4A

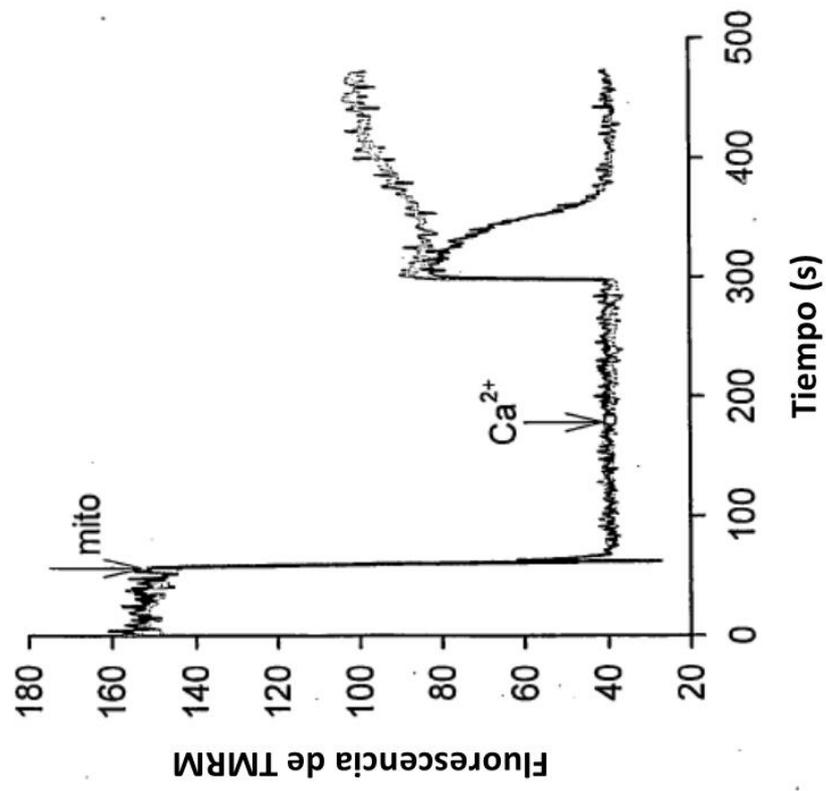


Figura 4B

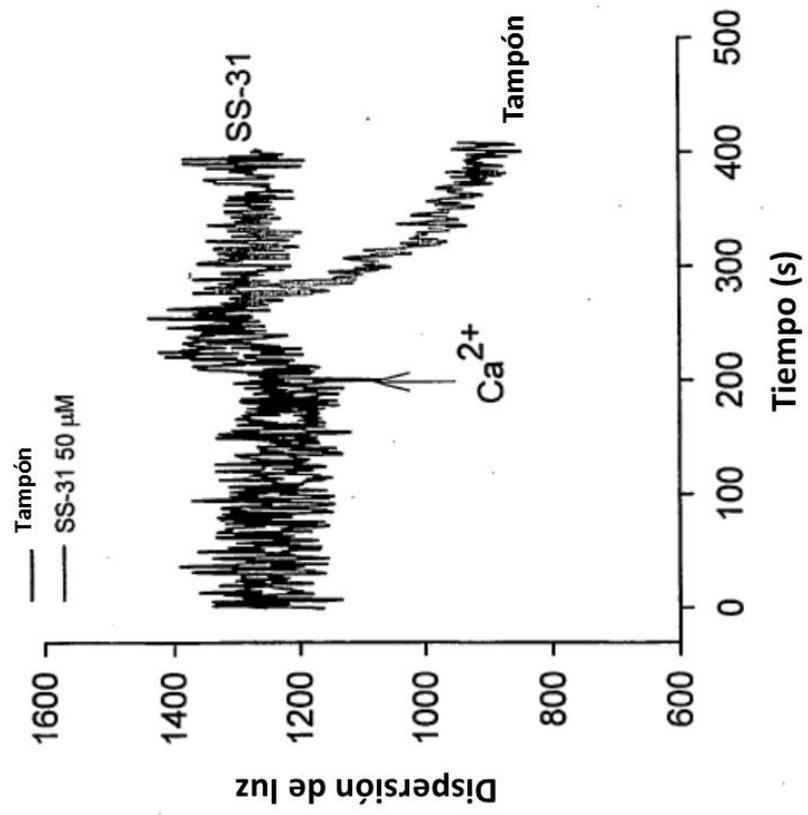


Figura 4C

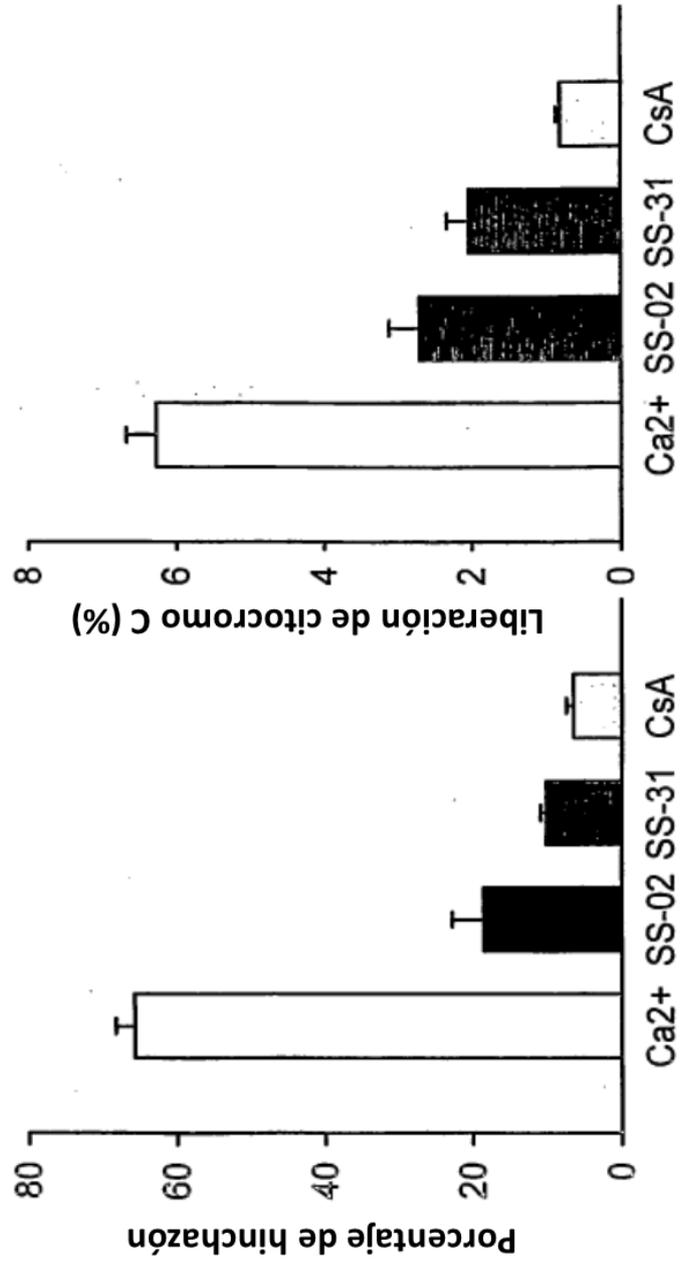
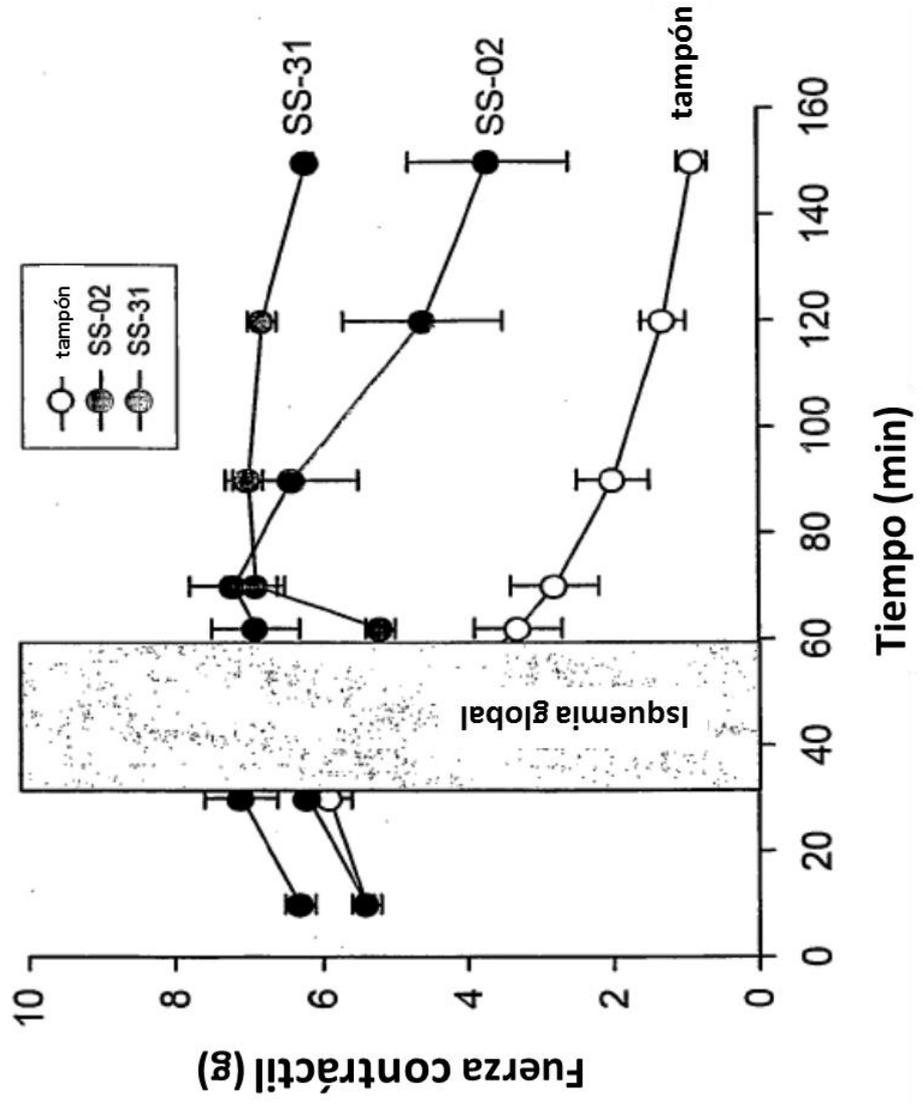


Figura 5



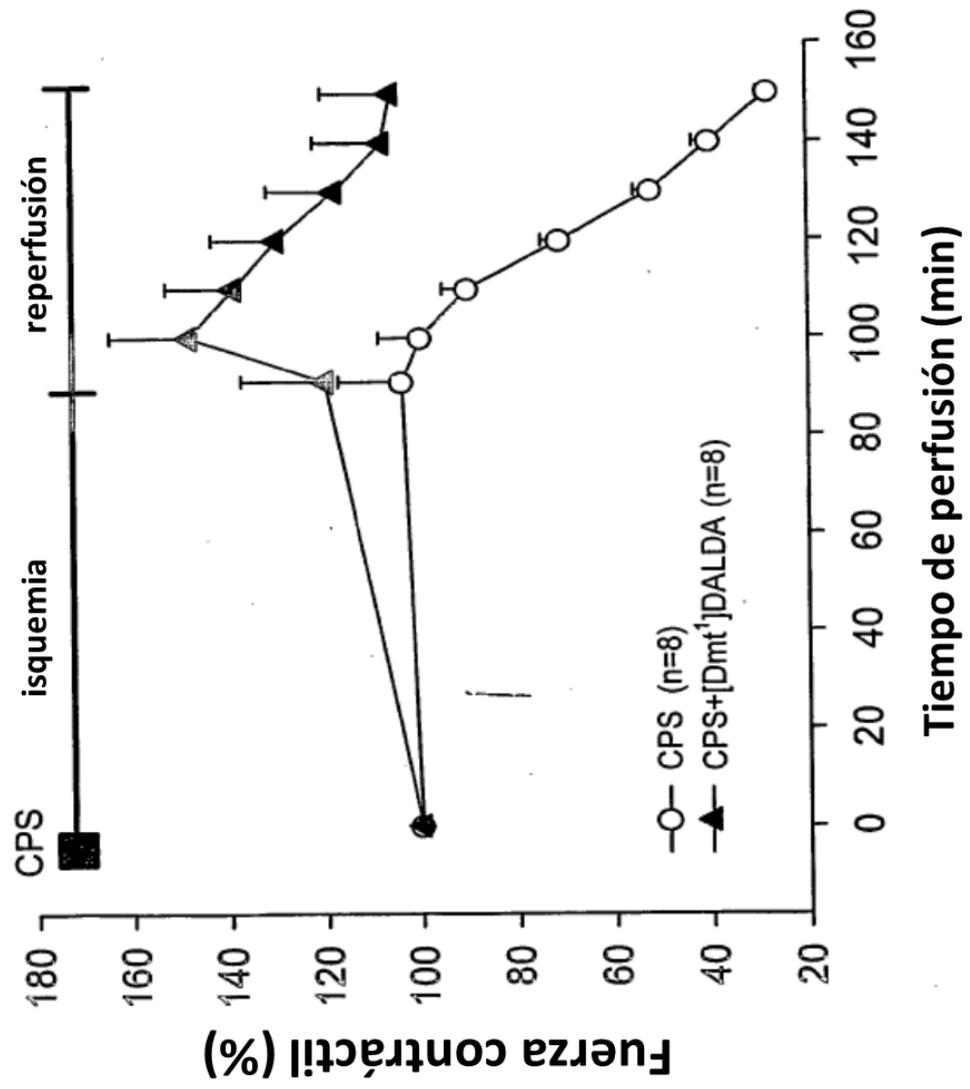


Figura 6