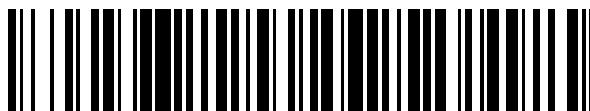


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 134**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014** **PCT/US2014/019645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014** **WO14134562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014** **E 14757000 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 2961378**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de enfermedad mitocondrial**

30 Prioridad:

01.03.2013 US 201361771534 P

01.03.2013 US 201361771642 P

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

21.04.2020

73 Titular/es:

STEALTH BIOTHERAPEUTICS CORP (100.0%)
2nd Floor, Le Prince de Galles, 3-5 Avenue des
Citronniers
98000 MC, MC

72 Inventor/es:

WILSON, D. TRAVIS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 755 134 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 para el tratamiento de enfermedad mitocondrial

5 Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes de patente provisionales estadounidenses 61/771.534, presentada el 1 de marzo de 2013, y 61/771.642, presentada el 1 de marzo de 2013.

10 Campo técnico

La presente tecnología se refiere de manera general a composiciones y a métodos para prevenir, mejorar o tratar la alteración de la función mitocondrial y/o los síntomas de la alteración de la función mitocondrial. En particular, realizaciones de la presente tecnología se refieren a la administración de péptidos aromáticos-catiónicos en cantidades eficaces para prevenir, tratar o mejorar la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial o síntomas de la misma, en una célula tal como la encontrada en un sujeto que padece, o predispuesto a, una enfermedad o trastorno mitocondrial asociado con mutaciones en el gen de proteína del locus *surfeit 1* (*SURF1*) o gen de ADN polimerasa gamma (*POLG*).

20 Antecedentes

La siguiente descripción se proporciona para ayudar a la comprensión por parte del lector. No se admite que ninguna de la información proporcionada o las referencias citadas sean técnica anterior.

25 Las mitocondrias (plural de mitocondria) se describen algunas veces como "centrales eléctricas" celulares porque, entre otras cosas, las mitocondrias son responsables de crear más del 90% de la energía necesaria por el organismo para sostener la vida y soportar el crecimiento. Las mitocondrias son orgánulos encontrados en casi todas las células en el organismo y son responsables de crear más del 90% de la energía celular. Son necesarias para que el organismo sustente la vida y soporte el crecimiento. Además de producir energía, las mitocondrias también están profundamente implicadas en una variedad de otras actividades, tales como producción de hormonas esteroideas y fabricación de elementos estructurales de ADN. La insuficiencia mitocondrial provoca lesión celular que conduce a la muerte celular.

35 Las enfermedades mitocondriales son casi tan comunes como el cáncer infantil. Aproximadamente uno de cada 4.000 niños nacidos en los Estados Unidos cada año desarrollará un trastorno mitocondrial antes de los 10 años de edad. En adultos, se ha encontrado que muchas enfermedades de envejecimiento tienen defectos de la función mitocondrial. Estas incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo 2, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca aterosclerótica, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer y cáncer. Además, fármacos seleccionados pueden dañar a las mitocondrias.

40 Hay múltiples formas de enfermedad mitocondrial. La enfermedad mitocondrial puede manifestarse como un trastorno genético crónico que se produce cuando las mitocondrias de la célula no logran producir suficiente energía para la función celular o del órgano. De hecho, para muchos pacientes, la enfermedad mitocondrial es un estado heredado que se da en las familias (genético). La enfermedad mitocondrial se hereda de varias maneras diferentes, por ejemplo, herencia autosómica, herencia de ADN mitocondrial (ADNmt) y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, las mutaciones de los genes *SURF1* y/o *POLG* pueden contribuir a la enfermedad mitocondrial en seres humanos. Además, algunos pacientes adquieren disfunción o enfermedad mitocondrial debido a otros factores, incluyendo toxinas mitocondriales.

50 La enfermedad mitocondrial se presenta de manera muy diferente de un individuo a otro. En la actualidad no existe ninguna cura para la enfermedad basada en mitocondrias. El tratamiento es generalmente paliativo para mejorar los síntomas de la enfermedad. El tratamiento incluye con frecuencia terapia con vitaminas y conservación de energía. El tratamiento puede implicar dietas especiales y/o una combinación de vitaminas, y reducción de cualquier estrés en el organismo. Sin embargo, se sabe que puede usarse un péptido aromático para tratar el daño oxidativo, la transición de permeabilidad mitocondrial o sujetos que necesitan un antioxidante dirigido a mitocondrias. Por ejemplo, el documento WO2005072295 A2 da a conocer métodos para reducir el daño oxidativo en un mamífero, órgano extirpado o una célula que lo necesita. El documento WO2004070054 A2 da a conocer un método de reducción o prevención de la transición de permeabilidad mitocondrial. El documento WO20100120431 A2 da a conocer métodos para tratar a un sujeto que padece una lesión por quemadura o complicaciones asociadas mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un péptido aromático-catiónico. El documento WO2011139992 A1 da a conocer composiciones y métodos relacionados con péptidos aromáticos-catiónicos. Los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un péptido aromático-catiónico a sujetos que lo necesitan. Por ejemplo, los péptidos pueden administrarse a sujetos que necesitan un antioxidante dirigido a mitocondrias.

Sumario

65 Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o sal farmacéuticamente

aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de síndrome de Leigh, enfermedad de Alpers, trastornos de ataxia-neuropatía, u oftalmoplejia externa progresiva en un sujeto que lo necesita, en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de la enfermedad. La enfermedad o el estado puede estar asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* en mamíferos o células de mamífero. Una sal farmacéuticamente aceptable puede ser una sal de acetato o sal de trifluoroacetato. La divulgación también se refiere a prevenir, tratar o mejorar la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial asociada con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* en un sujeto que lo necesita, o en células de mamífero que lo necesitan, mediante la administración de péptidos aromáticos-catiónicos tal como se da a conocer en el presente documento. El sujeto mamífero puede correr el riesgo de, o padecer o correr un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o estado caracterizado por disfunción mitocondrial asociada con mutaciones de genes mitocondriales. El sujeto puede padecer o correr un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o estado caracterizado por una mutación génica que afecta a la función mitocondrial. La alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial puede estar asociada con al menos una mutación génica. El sujeto puede padecer o correr un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o estado caracterizado por una mutación en *SURF1*. El sujeto puede padecer o correr un riesgo aumentado de padecer una enfermedad o estado caracterizado por una mutación en *POLG*.

La célula de mamífero puede estar o bien *in situ* o bien *ex vivo*. La alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial puede deberse a una alteración del ensamblaje completo de al menos un polipéptido mitocondrial, tal como complejo I; complejo II; complejo III; complejo IV; y complejo V y combinaciones de los mismos. La alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial puede deberse a una alteración de un ensamblaje de supercomplejo mitocondrial.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de síndrome de Leigh, enfermedad de Alpers, trastornos de ataxia-neuropatía, u oftalmoplejia externa progresiva en un sujeto que lo necesita, en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de la enfermedad.

En algunas realizaciones, se previenen, tratan o mejoran síntomas de enfermedad mitocondrial. En algunas realizaciones, los síntomas de la enfermedad, estado o trastorno pueden incluir uno cualquiera o más de los siguientes: crecimiento escaso, pérdida de coordinación muscular, debilidad muscular, déficit neurológico, convulsiones, autismo, espectro autista, características de tipo autista, incapacidades de aprendizaje, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, enfermedad renal, trastornos gastrointestinales, estreñimiento intenso, diabetes, aumento del riesgo de infección, disfunción tiroidea, disfunción suprarrenal, disfunción autonómica, confusión, desorientación, pérdida de memoria, crecimiento escaso, retraso del crecimiento, coordinación escasa, problemas sensoriales (visión, audición), funciones mentales reducidas, enfermedad del órgano, demencia, problemas respiratorios, hipoglucemia, apnea, acidosis láctica, convulsiones, dificultades para tragar, retrasos del desarrollo, trastornos del movimiento (disonía, espasmos musculares, temblores, corea), accidente cerebrovascular y atrofia cerebral.

En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer, la enfermedad o estado mitocondrial está asociado con al menos una mutación génica. En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer, la mutación génica está ubicada en uno o más del gen *SURF1* o *POLG*.

La divulgación se refiere a métodos que se proporcionan para aumentar una razón de desacoplamiento de una célula de mamífero. En algunas realizaciones, los métodos incluyen: poner en contacto la célula con una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, aumentando así la razón de desacoplamiento de la célula. La célula puede ser una célula humana. La célula puede estar en un sujeto humano.

La divulgación se refiere a métodos para la prevención, tratamiento o mejora de enfermedad o estados mitocondriales o síntomas de la misma, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aromático-catiónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tales como sal de acetato o sal de trifluoroacetato. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. El péptido aromático-catiónico puede ser un péptido que tiene:

al menos una carga positiva neta;

un mínimo de cuatro aminoácidos;

un máximo de aproximadamente veinte aminoácidos;

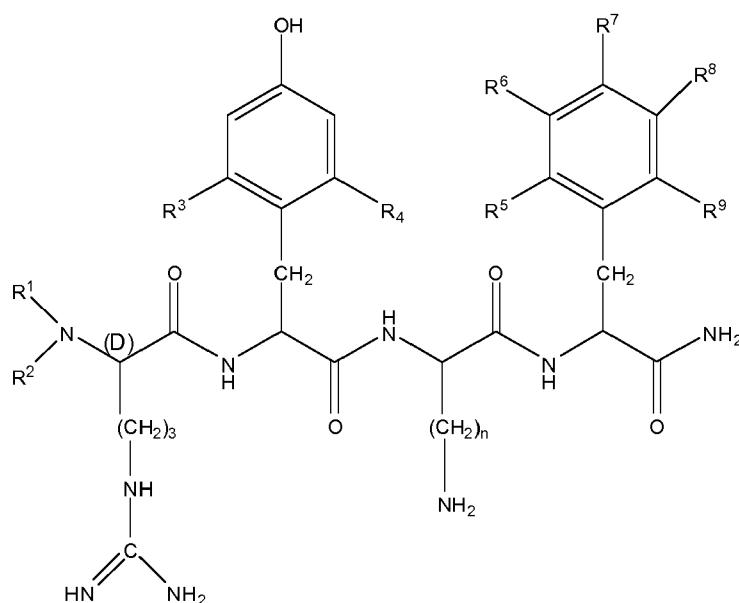
una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) en el que $3p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$; y una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t)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

En algunas realizaciones, $2p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$, y a puede ser igual a p_t . El

péptido aromático-catiónico puede ser un péptido soluble en agua que tiene un mínimo de dos o un mínimo de tres cargas positivas. En algunas realizaciones, el péptido comprende uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural, por ejemplo, uno o más D-aminoácidos. En algunas realizaciones, el grupo carboxilo C-terminal del aminoácido en el extremo C-terminal está amidado. En determinadas realizaciones, 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 algunas realizaciones, el péptido comprende un residuo de tirosina o 2',6'-dimetil tirosina (Dmt) en el extremo N-terminal. Por ejemplo, el péptido puede tener la fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ o 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En otra realización, el péptido comprende un residuo de fenilalanina o 2',6'-dimetilfenilalanina en el extremo N-terminal. Por ejemplo, el péptido puede tener la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ o 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. En una realización particular, el péptido aromático-catiónico tiene la fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como sal de acetato o sal de trifluoroacetato.

En una realización, el péptido está definido por la fórmula I:

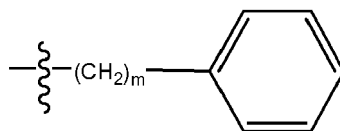


en la que R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente de

(i) hidrógeno;

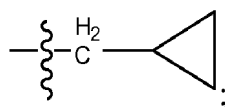
(ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;

(iii)

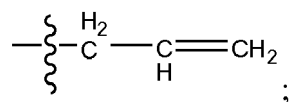


en la que m = 1-3;

(iv)



(v)



R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente de

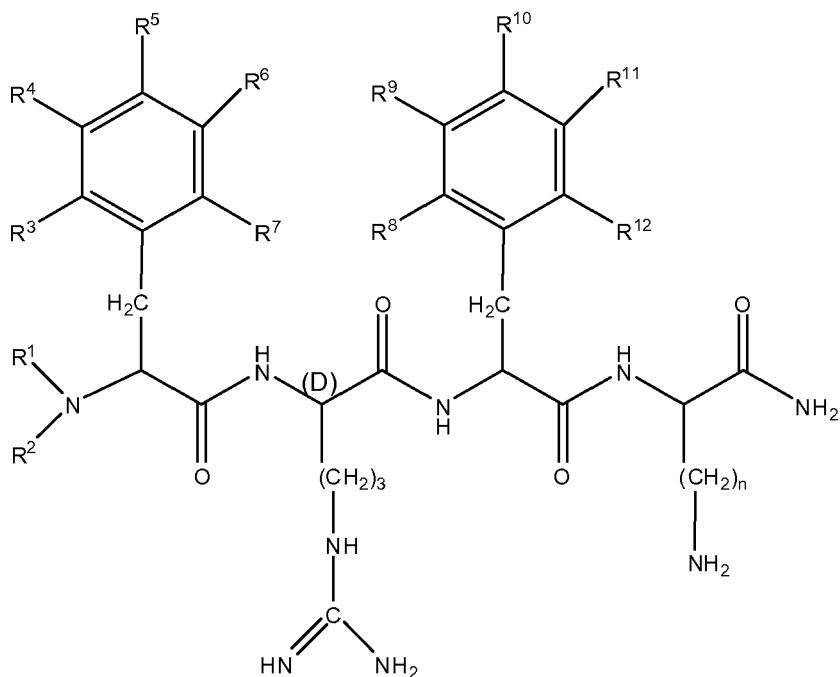
- 5 (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;
- (iii) alcoxilo C₁-C₆;
- 10 (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;
- 15 (vi) dialquilamino C₁-C₄;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;
- 20 (ix) halógeno, en el que "halógeno" abarca cloro, fluoro, bromo y yodo;

R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan cada uno independientemente de

- 25 (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;
- (iii) alcoxilo C₁-C₆;
- 30 (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;
- 35 (vi) dialquilamino C₁-C₄;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;
- 40 (ix) halógeno, en el que "halógeno" abarca cloro, fluoro, bromo y yodo; y n es un número entero de desde 1 hasta 5.

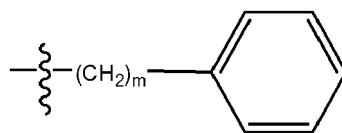
En una realización particular, R¹ y R² son hidrógeno; R³ y R⁴ son metilo; R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son todos hidrógeno; y n es 4.

En una realización, el péptido está definido por la fórmula II:



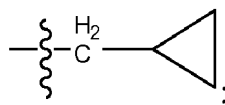
en la que R^1 y R^2 se seleccionan cada uno independientemente de

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

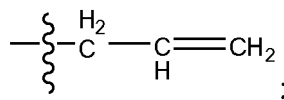


en la que $m = 1-3$;

- (iv)



- (v)



R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} y R^{12} se seleccionan cada uno independientemente de

- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado;
- (iii) alcoxilo C_1 - C_6 ;
- (iv) amino;
- (v) alquilamino C_1 - C_4 ;

(vi) dialquilamino C₁-C₄;

(vii) nitro;

(viii) hidroxilo;

(ix) halógeno, en el que "halógeno" abarca cloro, fluoro, bromo y yodo; y n es un número entero de desde 1 hasta 5.

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

15 Los péptidos aromáticos-catiónicos pueden administrarse de una variedad de maneras. En algunas realizaciones, los péptidos pueden administrarse por vía oral, tópica, intranasal, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o transdérmica (por ejemplo, mediante iontoforesis). En algunas realizaciones, el péptido aromático-catiónico se administra por una vía intracoronaria o una vía intraarterial.

20 En una realización, la presente tecnología proporciona métodos para la prevención, tratamiento o mejora de enfermedad o estados mitocondriales o síntomas de la misma en un sujeto mamífero que lo necesita, y/o el tratamiento, prevención o mejora de la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial en un sujeto que lo necesita, mediante la administración de péptidos aromáticos-catiónicos tal como se da a conocer en el presente documento, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato o sal de trifluoroacetato, mejorando o tratando así enfermedad, defectos o estados mitocondriales, y/o signos o síntomas de los mismos. En una realización, el método comprende además la etapa de administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto. En una realización, el sujeto mamífero corre el riesgo de, o padece o corre un riesgo aumentado de una enfermedad o estado caracterizado por disfunción mitocondrial. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre un riesgo aumentado de una alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre un riesgo aumentado de una enfermedad o estados caracterizados por una mutación genética que afecta a la función mitocondrial. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre un riesgo aumentado de una enfermedad o estados caracterizados por una mutación en *SURF1*. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre un riesgo aumentado de una enfermedad o estados caracterizados por una mutación en *POLG*. En algunas realizaciones, el sujeto se trata mediante la administración de un péptido aromático-catiónico tal como se da a conocer en el presente documento.

35 En otro aspecto, se proporciona péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de síndrome de Leigh en un sujeto que lo necesita, en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de síndrome de Leigh.

40 En otro aspecto, se proporciona péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alpers en un sujeto que lo necesita, en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de enfermedad de Alpers.

45 En otro aspecto, la presente tecnología se refiere a métodos para tratar trastornos de ataxia-neuropatía en un sujeto que lo necesita, en los que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de unos trastornos de ataxia-neuropatía.

50 En otro aspecto, se proporciona péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de oftalmoplejia externa progresiva en un sujeto que lo necesita, en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de oftalmoplejia externa progresiva.

55 En algunas realizaciones, el péptido reduce o mejora uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en crecimiento escaso, pérdida de coordinación muscular, debilidad muscular, déficit neurológico, convulsiones, autismo, espectro autista, características de tipo autista, incapacidades de aprendizaje, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, enfermedad renal, trastornos gastrointestinales, estreñimiento intenso, diabetes, aumento del riesgo de infección, disfunción tiroidea, disfunción suprarrenal, disfunción autonómica, confusión, desorientación, pérdida de memoria, crecimiento escaso, retraso del crecimiento, coordinación escasa, problemas sensoriales (visión, audición), funciones mentales reducidas, demencia, problemas respiratorios, hipoglucemia, apnea, acidosis láctica, convulsiones, dificultades para tragar, retrasos del desarrollo, trastornos del movimiento (disonía, espasmos musculares, temblores, corea), accidente cerebrovascular y atrofia cerebral.

60 En algunas realizaciones, el péptido se administra por vía oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

65 En algunas realizaciones, el síndrome de Leigh está asociado con una mutación del gen *SURF1*. En algunas realizaciones, la mutación de *SURF1* da como resultado una alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial debido a una alteración del ensamblaje completo de al menos un complejo mitocondrial seleccionado del grupo que consiste

en: complejo I; complejo II; complejo III; complejo IV; y complejo V.

En algunas realizaciones, el sujeto con enfermedad de Alper, trastornos de ataxia-neuropatía u oftalmoplejia externa progresiva tiene una mutación de *POLG* que da como resultado una alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gel electroforético que ilustra el ensamblaje de enzima OXPHOS monomérica de complejo IV en sujetos con mutación de *SURF1*.

Las figuras 2A-G son gráficos ilustrativos del efecto de SS-31 sobre la capacidad de OXPHOS en fibroblastos transformados que expresan *SURF1* o *POLG* mutados. "Stealth 2" en las figuras es el nombre de la línea celular de fibroblastos que porta el mutante de *SURF1*; "Stealth 4" en las figuras es el nombre de la línea celular de fibroblastos que porta el mutante de *POLG*.

Las figuras 3A-G son gráficos ilustrativos del efecto de SS-31 sobre la capacidad de OXPHOS en fibroblastos transformados que expresan *POLG* mutado (línea celular "Stealth 4").

La figura 4 proporciona una lista de mutaciones de *POLG* a modo de ejemplo.

La figura 5 proporciona un modelo de estructura de *POLG*.

La figura 6 es un gel electroforético que ilustra el ensamblaje de enzima OXPHOS monomérica de complejo IV en sujetos con mutación de *SURF1*.

Descripción detallada

Debe apreciarse que a continuación se describen determinados aspectos, modos, realizaciones, variaciones y características de la invención en diversos niveles de detalle con el fin de proporcionar una comprensión sustancial de la presente invención. A continuación se proporcionan las definiciones de determinados términos tal como se usan en esta memoria descriptiva. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

En la práctica de la presente invención, se usan muchas técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica de proteínas, biología celular, inmunología, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas se conocen bien y se explican, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I y 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, Met. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); y *Met. Enzymol.*, Vols. 154 y 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds., respectivamente.

Tal como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural 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.

Tal como se usa en el presente documento, la "administración" de un agente, fármaco o péptido a un sujeto incluye cualquier vía de introducir o suministrar a un sujeto un compuesto para realizar su función prevista. La administración puede llevarse a cabo mediante cualquier vía adecuada, incluyendo por vía oral, intranasal, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea) o tópica. En algunas realizaciones, el péptido aromático-catiónico se administra mediante una vía intracoronaria o una vía intraarterial. La administración incluye la administración por el propio paciente y la administración por otra persona.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos que se producen de manera natural y aminoácidos sintéticos, así como análogos de aminoácido y compuestos miméticos de aminoácido que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil-sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma

estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural. Los compuestos miméticos de aminoácido 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 que se produce de manera natural. En el presente documento se puede hacer referencia a los aminoácidos mediante sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que da como resultado la prevención o mejora de una enfermedad o trastorno mitocondrial o síntomas del mismo asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* o uno o más síntomas asociados con la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial asociada con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG*. En el contexto de las aplicaciones terapéuticas, la cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. También dependerá del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto en la técnica podrá determinar dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los métodos descritos en el presente documento, los péptidos aromáticos-catiónicos pueden administrarse a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de los péptidos aromáticos-catiónicos significa niveles en los que, como mínimo, se mejoran los efectos fisiológicos de la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren a medidas y tratamiento terapéutico y profiláctico, en el que el objeto es prevenir o mejorar o ralentizar (disminuir) el estado o trastorno patológico seleccionado como diana. Por ejemplo, un sujeto se “trata” satisfactoriamente para una enfermedad o trastorno mitocondrial asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* si, tras recibir una cantidad terapéutica de los péptidos aromáticos-catiónicos según los métodos descritos en el presente documento, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible en la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial. También debe apreciarse que se pretende que los diversos modos de tratamiento o prevención de estados médicos y/o sus síntomas tal como se describen signifiquen “sustancial”, lo cual incluye el tratamiento total, pero también inferior al total, y en los que se logra algún resultado biológica o médicamente relevante.

Tal como se usa en el presente documento, “prevención de” o “prevenir” un trastorno o estado se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición de síntomas de un trastorno o estado en la muestra tratada con respecto a una muestra de control sin tratar, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o estado con respecto a la muestra de control sin tratar. Tal como se usa en el presente documento, prevenir una enfermedad o trastorno mitocondrial asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* incluye prevenir el daño oxidativo o prevenir la transición de permeabilidad mitocondrial, previniendo o mejorando así los efectos perjudiciales de la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Un polipéptido o péptido “aislado” o “purificado” está sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la que se derivó el agente, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza de manera química. Por ejemplo, un péptido aromático-catiónico aislado estará libre de materiales que interferirán con los usos de diagnóstico o terapéuticos del agente. Tales materiales interferentes pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento para querer decir un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres de péptidos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente denominadas péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas o bien mediante procesos naturales, tales como procesamiento tras la traducción, o bien mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término uso terapéutico “simultáneo” se refiere a la administración de al menos dos principios activos por la misma vía y al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo.

Tal como se usa en el presente documento, el término uso terapéutico “separado” se refiere a una administración de al menos dos principios activos al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo por vías diferentes.

Tal como se usa en el presente documento, el término uso terapéutico “secuencial” se refiere a la administración de al menos dos principios activos en momentos diferentes, siendo la vía de administración idéntica o diferente. Más particularmente, el uso secuencial se refiere a la administración completa de uno de los principios activos antes de que comience la administración del otro u otros. Por tanto, es posible administrar uno de los principios activos a lo largo de varios minutos, horas o días antes de administrar el otro principio o principios activos. En este caso no hay

ningún tratamiento simultáneo.

Mutaciones asociadas con enfermedades mitocondriales

5 *SURF1*

La fosforilación oxidativa (OXPHOS) está implicada en la función celular como fuente primaria de energía (ATP) en la mayor parte de los tipos de células, el punto de control para reacciones redox celulares, y como punto de control para rutas de señalización y metabólicas esenciales que van desde la síntesis de pirimidinas hasta la regulación de la apoptosis. La función OXPHOS óptima requiere la agregación de enzimas de OXPHOS individuales para dar supercomplejos lo cual permite un transporte rápido y eficiente de electrones. Los supercomplejos permiten la formación eficiente de un gradiente electroquímico (de protones) creado por los complejos I, III y IV, que después se usa por el complejo V para sintetizar ATP. En muchas clases de enfermedad mitocondrial, se produce alteración de las enzimas monoméricas (complejos I-V) y ensamblaje de supercomplejo. Los supercomplejos funcionales contienen una única enzima de complejo I, dos enzimas de complejo III y números variables de enzimas de complejo IV (complejos I+III2+IV) más los portadores de electrones móviles CoQ10 y citocromo c. El complejo II también puede asociarse con la estructura de complejo I+III2+IV. Durante el aislamiento de supercomplejos, se observan otras clases de supercomplejos: (1) complejos I+III2+V; (2) complejos I+III2+IV; (3) complejos III+IV. Se desconoce el papel de estas otras clases de supercomplejos, particularmente las que carecen de complejo IV, pero pueden ser una estructura intermedia implicada en el ensamblaje de supercomplejo funcional.

SURF1 es un gen nuclear de nueve exones, de 300 aminoácidos, que funciona como factor de ensamblaje para el complejo IV (citocromo c oxidasa). Las mutaciones patógenas del gen *SURF1* dan normalmente como resultado profundos defectos de complejo IV. Las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en el gen *SURF1* son una causa común de síndrome de Leigh. Se piensa que la enfermedad de OXPHOS atribuida a la mutación de *SURF1* se transmite de una manera recesiva autosómica.

Los efectos de mutaciones génicas que implican al complejo IV (citocromo c oxidasa) en la formación de supercomplejo sólo se han investigado en unos pocos casos que albergaban mutaciones de *SURF1*, *COX10* y *SCO1*, (véase Williams *et al.*, J. Biol. Chem., 279(9): 7462-69 (2004); Diaz *et al.*, Mol. Cell Biol., 26(13): 4872-81 (2006); Acin-Perez *et al.*, Mol. Cell, 32(4): 529-39 (2008)). Las mutaciones en *SURF1*, *COX10* y *SCO1*, factores de ensamblaje de complejo IV, pueden reconocerse por la disminución difusa de actividad de complejo IV mediante enfoques histoquímicos, de inmunofluorescencia, de enzimología y de química de proteínas. Hasta ahora, todos los pacientes con mutaciones en estos genes muestran un ensamblaje alterado de supercomplejos.

La evaluación de pacientes con mutaciones de *SURF1* demuestra diversos efectos sobre la función de OXPHOS. El análisis de supercomplejos de OXPHOS y el análisis de enzimas monoméricas de *SURF1* mutado mostraron las siguientes características:

1) Formación de supercomplejo disminuida de (A) complejos I+III2; (B) complejos I+III2+IV1; y (C) complejos I+III2+IVn (n= 2 o más).

2) El complejo IV monomérico es altamente anómalo, mostrando un ensamblaje disminuido así como estructuras de complejo IV con un peso molecular anómalamente alto y bajo. Estas estructuras de complejo IV anómalas representan probablemente complejo IV disfuncional y ensamblado de manera anómala.

3) En casos graves, el complejo V parece verse afectado. Cuando se aísla la enzima de complejo V completa (ATP sintasa) para un análisis enzimológico en gel nativo claro, los pacientes pueden mostrar una actividad ATPasa alterada. Este hallazgo sugiere que el complejo V puede verse afectado de manera secundaria en algunos pacientes con mutaciones de *SURF1*, contribuyendo por tanto a la variación fenotípica observada entre estos pacientes.

POLG

El gen de la ADN polimerasa gamma, *POLG*, codifica para la subunidad catalítica de ADN polimerasa gamma, que se requiere para la replicación y reparación del ADN mitocondrial. Mutaciones en *POLG* y se han notificado múltiples veces en la bibliografía, y están correlacionadas con numerosas enfermedades y estados, tales como, por ejemplo oftalmoplejia externa progresiva (PEO), enfermedad de Alpers, y neuropatía atáxica sensorial con disartria y oftalmoparesia (SANDO), como una mutación homocigótica o como una mutación heterocigótica compuesta con otra mutación (véase *Nature Genetics*, 28(3):211-2 (2001); Hum. Mol. Genet., 17, 2496-2506 (2009); J. Med. Genet., 46, 209-14 (2009); J. Inher. Metab. Dis., 32, 143-158 (2009); Muscle Nerve, 41(2): 265-9 (2010); Neurology, 73(11): 898-9003 (2009); J. Med. Genet., 46(11):776-85 (2009)). La manifestación más grave de defectos de la proteína *POLG* se ha asociado con mutaciones de la región "espaciadora" de *POLG*. Se notifica que esta mutación altera la interacción de subunidad y reduce la unión a ADN y la eficiencia catalítica de polimerasa.

65 Enfermedades o trastornos mitocondriales

Síndrome de Leigh

Se han identificado más de 40 mutaciones de gen *SURF1* diferentes en pacientes con síndrome de Leigh, un trastorno cerebral progresivo que aparece habitualmente en la lactancia o primera infancia.

Aproximadamente del 10 al 15 por ciento de las personas con síndrome de Leigh tienen una mutación en el gen *SURF1*. La mayor parte de las mutaciones de gen *SURF1* dan como resultado una proteína SURF1 anómalamente corta. Otras mutaciones sustituyen un único aminoácido en la proteína SURF1. Las proteínas mutadas se degradan en la célula, lo cual da como resultado la ausencia de proteína SURF1. Tal como se comentó anteriormente, las mutaciones en el gen *SURF1* están asociadas con una función OXPHOS disminuida.

Enfermedad de Alpers

La enfermedad de Alpers es un síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial (ADNmt) del neurodesarrollo y progresivo. La enfermedad de Alpers es una enfermedad recesiva autosómica provocada por una mutación en el gen para el ADN mitocondrial polimerasa *POLG*. La enfermedad se produce en aproximadamente una de cada 100.000 personas. La mayor parte de los individuos con enfermedad de Alpers no muestran síntomas en el nacimiento y se desarrollan de manera normal de semanas a años antes de la aparición de síntomas. El diagnóstico se establece realizando pruebas para el gen *POLG*. Los síntomas se producen normalmente meses antes de que muestras tisulares muestren el agotamiento de ADN mitocondrial. Aproximadamente el 80 por ciento de los individuos con enfermedad de Alpers desarrollan síntomas en los dos primeros años de vida, y el 20 por ciento desarrollan síntomas entre 2 y 25 años de edad.

Oftalmoplejia externa progresiva

La oftalmoplejia externa progresiva (PEO) es un estado provocado por defectos en mitocondrias. Los individuos afectados con frecuencia tienen grandes deleciones de material genético a partir de ADN mitocondrial (ADNmt) en tejido muscular. La PEO puede resultar de mutaciones en varios genes diferentes. En algunos casos, mutaciones en ADN nuclear son responsables de PEO, particularmente mutaciones en los genes *POLG*. Estos genes son críticos para el mantenimiento de ADNmt. Aunque el mecanismo no queda claro, mutaciones en cualquiera de estos tres genes conducen a grandes deleciones de ADNmt, que oscilan entre 2.000 y 10.000 nucleótidos.

La POE aparece normalmente en adultos de entre 18 y 40 años de edad. Los signos y síntomas de oftalmoplejia externa progresiva incluyen, pero no se limitan a, caída de párpados (ptosis), que puede afectar a uno o ambos párpados, debilidad o parálisis de los músculos que mueven el ojo (oftalmoplejia), debilidad general de los músculos esqueléticos (miopatía), particularmente en el cuello, brazos o piernas, y dificultad para tragar (disfagia).

Espectro de ataxia neuropatía

El espectro de ataxia neuropatía forma parte de un grupo de estados denominados los trastornos relacionados con *POLG*. Los estados en este grupo presentan una gama de signos y síntomas similares que implican a funciones relacionadas con los músculos, nervios y cerebro. El espectro de ataxia neuropatía incluye los estados denominados síndrome de ataxia recesiva mitocondrial (MIRAS) y neuropatía atáxica sensorial, disartria y oftalmoplejia (SANDO).

Las mutaciones en el gen *POLG* dan con frecuencia como resultado menos copias de ADNmt (agotamiento de ADNmt) o deleciones de grandes regiones de ADNmt (delección de ADNmt). El agotamiento de ADNmt y/o la delección de ADNmt pueden conducir a una disminución de OXPHOS.

Los pacientes con espectro de ataxia neuropatía generalmente tienen problemas con la coordinación y el equilibrio (ataxia) y alteraciones en la función nerviosa (neuropatía). La neuropatía puede clasificarse como sensorial, motora o una combinación de las dos. La neuropatía sensorial provoca entumecimiento, hormigueo o dolor en los brazos y las piernas, y la neuropatía motora se refiere a alteración en los nervios usados para el movimiento muscular.

Péptidos aromáticos-catiónicos

La divulgación se refiere a prevenir, tratar o mejorar la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial asociada con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* en un sujeto que lo necesita, mediante la administración de péptidos aromáticos-catiónicos tal como se da a conocer en el presente documento tales como D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tales como sal de acetato o sal de trifluoroacetato. La divulgación se refiere a la prevención, tratamiento o mejora de enfermedad o estados mitocondriales o síntomas de los mismos, en mamíferos mediante la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de péptidos aromáticos-catiónicos tal como se da a conocer en el presente documento, tales como D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tales como sal de acetato o sal de trifluoroacetato, a sujetos que lo necesitan.

Los péptidos aromáticos-catiónicos son solubles en agua y altamente polares. A pesar de estas propiedades, los

péptidos pueden penetrar fácilmente en las membranas celulares. Los péptidos aromáticos-catiónicos incluyen normalmente un mínimo de tres aminoácidos o un mínimo de cuatro aminoácidos, unidos de manera covalente mediante enlaces peptídicos. El número máximo de aminoácidos presentes en los péptidos aromáticos-catiónicos es de aproximadamente veinte aminoácidos unidos de manera covalente mediante enlaces peptídicos. De manera adecuada, el número máximo de aminoácidos es de aproximadamente doce, más preferiblemente de aproximadamente nueve, y lo más preferiblemente de aproximadamente seis.

Los aminoácidos de los péptidos aromáticos-catiónicos pueden ser cualquier aminoácido. Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se usa para hacer referencia a cualquier molécula orgánica que contiene al menos un grupo amino y al menos un grupo carboxilo. Normalmente, al menos un grupo amino está en la posición α con respecto a un grupo carboxilo. Los aminoácidos pueden producirse de manera natural. Los aminoácidos que se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, los veinte aminoácidos levógiros (L) más habituales encontrados normalmente en proteínas de mamíferos, es decir, 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 que se producen de manera natural incluyen, por ejemplo, aminoácidos que se sintetizan en procesos metabólicos no asociados con la síntesis de proteínas. Por ejemplo, los aminoácidos ornitina y citrulina se sintetizan en el metabolismo de mamíferos durante la producción de urea. Otro ejemplo de un aminoácido que se produce de manera natural incluye hidroxiprolina (Hyp).

Los péptidos contienen opcionalmente uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural. De manera óptima, el péptido no tiene ningún aminoácido que se produce de manera natural. Los aminoácidos que no se producen de manera natural pueden ser levógiros (L), dextrógiros (D) o mezclas de los mismos. Los aminoácidos que no se producen de manera natural son los aminoácidos que normalmente no se sintetizan en procesos metabólicos normales en organismos vivos, y no se producen de manera natural en proteínas. Además, de manera adecuada los aminoácidos que no se producen de manera natural tampoco se reconocen por proteasas habituales. El aminoácido que no se produce de manera natural puede estar presente en cualquier posición en el péptido. Por ejemplo, el aminoácido que no se produce de manera natural puede estar en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o en cualquier posición entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal.

Los aminoácidos no naturales pueden comprender, por ejemplo, grupos alquilo, arilo o alquilarilo no encontrados en los aminoácidos naturales. Algunos ejemplos de alquil-aminoácidos no naturales incluyen ácido α -aminobutírico, ácido β -aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido δ -aminovalérico y ácido ε -aminocaproico. Algunos ejemplos de aril-aminoácidos no naturales incluyen ácido orto, meta y para-aminobenzoico. Algunos ejemplos de alquilaril-aminoácidos no naturales incluyen orto, meta y para-aminofenilacético y ácido γ -fenil- β -aminobutírico. Los aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen derivados de aminoácidos que se producen de manera natural. Los derivados de aminoácidos que se producen de manera natural pueden incluir, por ejemplo, la adición de uno o más grupos químicos en el aminoácido que se produce de manera natural.

Por ejemplo, pueden añadirse uno o más grupos químicos a una 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 puede añadirse a un anillo aromático. Algunos ejemplos de tales grupos incluyen alquilo C₁-C₄ ramificado o no ramificado, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo o t-butilo, alquilo C₁-C₄ (es decir, alcoilo), amino, alquilamino C₁-C₄ y dialquilamino C₁-C₄ (por ejemplo, metilamino, dimetilamino), nitro, hidroxilo, halo (es decir, fluoro, cloro, bromo o yodo). Algunos ejemplos específicos de derivados que no se producen de manera natural de aminoácidos que se producen de manera 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 de ácido aspártico o uno de 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 la esterificación, por ejemplo, con alcohol metílico o etílico. Otra modificación de este tipo incluye la derivatización de un grupo amino de un residuo de lisina, arginina o histidina. Por ejemplo, tales grupos amino pueden acilarse. Algunos grupos acilo adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo benzoílo o un grupo alcanolílo que comprende cualquiera de los grupos alquilo C₁-C₄ mencionados anteriormente, tal como un grupo acetilo o propionilo.

De manera adecuada los aminoácidos que no se producen de manera natural son resistentes o insensibles a proteasas habituales. Los ejemplos de aminoácidos que no se producen de manera natural que son resistentes o insensibles a proteasas incluyen la forma dextrógira (D) de cualquiera de los L-aminoácidos que se producen de manera natural anteriormente mencionados, así como L y/o D-aminoácidos que no se producen de manera natural. Los D-aminoácidos no se producen normalmente en proteínas, aunque se encuentran en determinados antibióticos peptídicos que se sintetizan mediante medios distintos de la maquinaria de síntesis de proteínas ribosómica normal de la célula. Tal como se usa en el presente documento, se considera que los D-aminoácidos son aminoácidos que no se producen de manera natural.

Con el fin de minimizar la sensibilidad a proteasas, los péptidos deben tener menos de cinco, preferiblemente menos de cuatro, más preferiblemente menos de tres y, lo más preferiblemente, menos de dos L-aminoácidos contiguos reconocidos por proteasas habituales, independientemente de si los aminoácidos se producen de manera natural o no. De manera óptima, el péptido sólo tiene D-aminoácidos y no L-aminoácidos. Si el péptido contiene secuencias de aminoácidos sensibles a proteasas, al menos uno de los aminoácidos es preferiblemente un D-aminoácido que no se produce de manera natural, confiriendo así resistencia a proteasas. Un ejemplo de una secuencia sensible a proteasas incluye dos o más aminoácidos básicos contiguos que se escinden fácilmente por proteasas habituales, tales como endopeptidasas y tripsina. Los ejemplos de aminoácidos básicos incluyen arginina, lisina e histidina.

Los péptidos aromáticos-catiónicos deben 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 se denominará a continuación (p_m). El número total de residuos de aminoácido en el péptido se denominará a continuación (r). El número mínimo de cargas positivas netas comentado a continuación son todas a pH fisiológico. El término "pH fisiológico" tal como se usa en el presente documento se refiere al pH normal en las células de los tejidos y órganos del cuerpo de mamíferos. Por ejemplo, el pH fisiológico de un ser humano es normalmente de aproximadamente 7,4, pero el pH fisiológico normal en mamíferos puede ser cualquier pH desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,8.

La "carga neta" tal como se usa en el presente documento se refiere al balance del número de cargas positivas y el número de cargas negativas portadas por los aminoácidos presentes en el péptido. En esta memoria descriptiva, se entiende que las cargas netas se miden a pH fisiológico. Los aminoácidos que se producen de manera natural que tienen carga positiva a pH fisiológico incluyen L-lisina, L-arginina y L-histidina. Los aminoácidos que se producen de manera natural que tienen carga negativa a pH fisiológico incluyen L-ácido aspártico y L-ácido glutámico.

Normalmente, un péptido tiene un grupo amino N-terminal con carga positiva y un grupo carboxilo C-terminal con carga negativa. Las cargas se cancelan entre sí a pH fisiológico. Como ejemplo de cálculo de la carga neta, el péptido Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg tiene un aminoácido con carga negativa (es decir, Glu) y cuatro aminoácidos con carga positiva (es decir, dos residuos de Arg, una Lys y una His). Por tanto, el péptido anterior tiene una carga positiva neta de tres.

Los péptidos aromáticos-catiónicos pueden tener 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 la que $3p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$. La relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) es la siguiente:

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

Los péptidos aromáticos-catiónicos pueden tener una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) en la que $2p_m$ es el número más grande que es menor que o igual a $r + 1$. La relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) es la siguiente:

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

El número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácido (r) pueden ser iguales. Los péptidos pueden tener tres o cuatro residuos de aminoácido y un mínimo de una carga positiva neta, de manera adecuada, un mínimo de dos cargas positivas netas y más preferiblemente un mínimo de tres cargas positivas netas.

También es importante que los péptidos aromáticos-catiónicos tengan un número mínimo de grupos aromáticos en comparación con el número total de cargas positivas netas (p_i). El número mínimo de grupos aromáticos se denominará a continuación (a). Los aminoácidos que se producen de manera 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 (aportados por los residuos de tirosina, fenilalanina y triptófano).

Los péptidos aromáticos-catiónicos también deben tener una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas a pH fisiológico (p_i) en la que $3a$ es el número más grande que es menor que o igual a $p_i + 1$, excepto porque cuando p_i es 1, a también puede ser 1. La relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_i) puede ser la siguiente:

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

Los péptidos aromáticos-catiónicos pueden tener una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) en la que $2a$ es el número más grande que es menor que o igual a $p_t + 1$. La relación entre el número mínimo de residuos de aminoácido aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) es la siguiente:

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

El número de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) pueden ser iguales.

- 10 De manera adecuada, los grupos carboxilo, especialmente el grupo carboxilo terminal de un aminoácido C-terminal, están amidados, por ejemplo, con amoníaco para formar la amida C-terminal. Alternativamente, el grupo carboxilo terminal del aminoácido C-terminal puede amidarse cualquier amina primaria o secundaria. La amina primaria o secundaria puede ser, por ejemplo, un alquil, especialmente un alquil C_1 - C_4 ramificado o no ramificado, o un aril-amina. Por consiguiente, el aminoácido en el extremo C-terminal del péptido puede convertirse en un grupo amido, N-metilamido, N-etilamido, N,N-dimetilamido, N,N-dietilamido, N-metil-N-etilamido, N-fenilamido o N-fenil-N-etilamido.
- 15 Los grupos carboxilato libres de los residuos de asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico que no se producen en el extremo C-terminal de los péptidos aromáticos-catiónicos también pueden amidarse en cualquier sitio en el 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.

- 20 El péptido aromático-catiónico puede ser un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y al menos un aminoácido aromático. En una realización particular, el péptido aromático-catiónico es un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y dos aminoácidos aromáticos.

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

TABLA 5: PÉPTIDOS A MODO DE EJEMPLO

2',6'-Dmp-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH ₂
2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂
2',6'-Dmt-D-Arg-PheOrn-NH ₂
2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Ahp(ácido 2-aminoheptanoico)-NH ₂
2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂
2',6'-Dmt-D-Cit-PheLys-NH ₂
Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe
Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly
Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe
Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH ₂
D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH ₂
D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH ₂
D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg
D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH ₂
D-Tyr-Trp-Lys-NH ₂
Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH ₂
Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp.
Gly-D-Phe-Lys-His-D-Arg-Tyr-NH ₂
His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH ₂
Lys-D-Arg-Tyr-NH ₂
Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH ₂
Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH ₂
Met-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-NH ₂
Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg
Phe-Arg-D-His-Asp
Phe-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH ₂
Phe-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His
Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂
Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH ₂

Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr
Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys
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-NH ₂
Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH ₂
Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys
Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH ₂
Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂
Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe
Tyr-His-D-Gly-Met
Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH ₂

Los péptidos pueden tener actividad agonista de receptor opioide mu (es decir, activan el receptor opioide mu). Los péptidos que tienen actividad agonista de receptor opioide mu son normalmente los péptidos que tienen un residuo de tirosina o un derivado de tirosina en el extremo N-terminal (es decir, la primera posición de aminoácido). Los derivados adecuados de tirosina incluyen 2'-metiltirosina (Mmt); 2',6'-dimetiltirosina (2'6'-Dmt); 3',5'-dimetiltirosina (3'5'Dmt); N,2',6'-trimetiltirosina (Tmt); y 2'-hidroxi-6'-metiltirosina (Hmt).

Un péptido que tiene actividad agonista de receptor opioide mu puede tener la fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. La fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ 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 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ puede ser un derivado modificado de tirosina tal como en 2',6'-dimetiltirosina para producir el compuesto que tiene fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. La fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ tiene un peso molecular de 640 y porta una carga positiva neta de tres a pH fisiológico. La fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ penetra fácilmente en la membrana plasmática de varios tipos de células de mamífero de una manera independiente de la energía (Zhao *et al.*, J. Pharmacol Exp Ther., 304:425-432, 2003).

Alternativamente, en otros casos, el péptido aromático-catiónico no tiene actividad agonista de receptor opioide mu. Por ejemplo, durante el tratamiento a largo plazo, tal como en un estado patológico o estado crónico, el uso de un péptido aromático-catiónico que activa el receptor opioide mu puede estar contraindicado. En estos casos, los efectos posiblemente adversos o adictivos del péptido aromático-catiónico pueden descartar el uso de un péptido aromático-catiónico que activa el receptor opioide mu en el régimen de tratamiento de un paciente humano u otro mamífero. Los posibles efectos adversos pueden incluir sedación, estreñimiento y depresión respiratoria. En tales casos, un péptido aromático-catiónico que no activa el receptor opioide mu puede ser un tratamiento apropiado. Los péptidos que no tienen actividad agonista de receptor opioide mu generalmente no tienen un residuo de tirosina o un derivado de tirosina en el extremo N-terminal (es decir, posición de aminoácido 1). El aminoácido en el extremo N-terminal puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural distinto de tirosina. En una realización, el aminoácido en el extremo N-terminal es fenilalanina o su derivado. Los derivados a modo de ejemplo de fenilalanina incluyen 2'-metilfenilalanina (Mmp), 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp), N,2',6'-trimetilfenilalanina (Tmp), y 2'-hidroxi-6'-metilfenilalanina (Hmp).

Un ejemplo de un péptido aromático-catiónico que no tiene actividad agonista de receptor opioide mu tiene la fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. Alternativamente, la fenilalanina N-terminal puede ser un derivado de fenilalanina tal como 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp). En una realización, la secuencia de aminoácidos de 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ se reordena de tal manera que Dmt no está en el extremo N-terminal. Un ejemplo de un péptido aromático-catiónico de este tipo que no tiene actividad agonista de receptor opioide mu tiene la fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.

Las variantes de sustitución adecuadas de los péptidos indicados en el presente documento incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas. Los aminoácidos pueden agruparse según 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 hidrófobos: Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V); y

(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 sustitución conservativa y pueden conservar las características fisicoquímicas del péptido original. En cambio, generalmente es más probable que las sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en un grupo diferente alteren

las características del péptido original.

Los ejemplos de péptidos que activan los receptores opioides μ incluyen, pero no se limitan a, los péptidos aromáticos-catiónicos mostrados en la tabla 6.

5

Posición de aminoácido 1	Posición de aminoácido 2	Posición de aminoácido 3	Posición de aminoácido 4	Modificación C-terminal
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
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 2 755 134 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-Lys	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
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
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

5

Dmt = dimetiltirosina

Mmt = 2'-metiltirosina

10

Tmt = N,2',6'-trimetiltirosina

Hmt = 2'-hidroxi-6'-metiltirosina

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

15

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

Bio = biotina

20

Los ejemplos de péptidos que no activan los receptores opioides mu incluyen, pero no se limitan a, los péptidos aromáticos-catiónicos mostrados en la tabla 7.

TABLA 7. Análogos peptídicos que carecen de actividad opioide mu				
Posición de aminoácido 1	Posición de aminoácido 2	Posición de aminoácido 3	Posición de aminoácido 4	Modificación C-terminal
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 pueden estar en la configuración o bien L o bien D.

Los péptidos pueden sintetizarse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para la síntesis química de la proteína incluyen, por ejemplo, los descritos por Stuart y Young en Solid Phase Peptide Synthesis, segunda edición, *Pierce Chemical Company* (1984), y en *Methods Enzymol.*, 289, Academic Press, Inc., Nueva York (1997).

Usos terapéuticos de péptidos aromáticos-catiónicos.

General. Los péptidos aromáticos-catiónicos descritos en el presente documento tales como D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tales como sal de acetato o sal de trifluoroacetato, son útiles para prevenir o tratar enfermedad mitocondrial asociada con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* o síntomas de la misma. Específicamente, la divulgación proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad, estado o trastorno mitocondrial asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto que tiene una alteración en la fosforilación oxidativa provocada por una mutación génica en *SURF1* o *POLG*. Por consiguiente, la divulgación se refiere a métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno mitocondrial o síntomas del mismo asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un péptido aromático-catiónico a un sujeto que lo necesita para reducir la alteración en la fosforilación oxidativa del sujeto. La presente divulgación se refiere a la prevención, tratamiento o mejora de enfermedad o estados mitocondriales o disfunción mitocondrial o síntomas de los mismos asociados con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* en mamíferos mediante la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de péptidos aromáticos-catiónicos tal como se da a conocer en el presente documento, tales como D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, tales como sal de acetato o sal de trifluoroacetato, a sujetos que lo necesitan.

En algunas realizaciones, la alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, pero no a modo de limitación, una alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos que miden niveles de coenzima Q₁₀ (COQ10). En algunas realizaciones, la alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos que miden la capacidad de OXPHOS mediante la razón de desacoplamiento. En algunas realizaciones, la alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos que miden la razón de control de flujo de rutina neto. En algunas realizaciones, la alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos que miden la razón de control de flujo de fuga. En algunas realizaciones, la alteración en la fosforilación oxidativa se determina mediante ensayos que miden la razón de control respiratorio de fosforilación.

La razón de desacoplamiento (UCR) es una expresión de la capacidad de reserva respiratoria e indica la capacidad de OXPHOS de las células. En algunas realizaciones, UCR se define como Cr_u / Cr . Cr_u es la tasa máxima de uso de oxígeno (flujo de oxígeno) producido cuando se desacoplan químicamente las mitocondrias usando FCCP (carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona). Debe realizarse el ajuste de FCCP dado que la concentración de FCCP requerida para producir un uso de oxígeno máximo varía entre diferentes líneas celulares. Una vez alcanzado el uso de oxígeno máximo, aumentos adicionales de FCCP inhiben el uso de oxígeno mediante fosforilación oxidativa. En algunas realizaciones, Cr representa el uso de oxígeno por las células durante una respiración celular normal con sustratos en exceso.

En algunas realizaciones, la razón de control de flujo de rutina neto (Cr / Cr_u) es la inversa de la UCR. En algunas realizaciones, este valor evalúa lo cerca que funciona la respiración de rutina con respecto a la capacidad respiratoria de fosforilación oxidativa.

En algunas realizaciones, la razón de control respiratorio (RCR) se define como Cr_u / Cr_o . Cr_u se definió anteriormente. Cr_o = respiración tras la inhibición de complejo V (ATP sintasa) mediante oligomicina. En algunas realizaciones, esta razón permite la evaluación del desacoplamiento y la disfunción de OXPHOS.

En algunas realizaciones, la razón de control de flujo de fuga se determina mediante Cr_o / Cr_u . En algunas realizaciones, este parámetro es la inversa de RCR y representa la fuga de protones con la inhibición de la fosforilación de ADP mediante oligomicina.

En algunas realizaciones, la razón de control respiratorio de fosforilación (RCRp) se define como $(Cr - Cr_o) / Cr_u$ (o $1 / UCR - 1 / RCR$). En algunas realizaciones, la RCRp es un índice que expresa la respiración relacionada con la fosforilación ($Cr - Cr_o$) en función de la capacidad respiratoria (Cr_u). En algunas realizaciones, la RCRp permanece constante, si el desacoplamiento parcial se compensa totalmente por una tasa de respiración de rutina aumentada y se mantiene una tasa constante de fosforilación oxidativa. En algunas realizaciones, la capacidad respiratoria disminuye sin ningún efecto sobre la tasa de fosforilación oxidativa; en algunas realizaciones, la RCRp aumenta, lo cual indica que se activa una proporción mayor de la capacidad máxima para impulsar la síntesis de ATP. En algunas realizaciones, la RCRp disminuye hasta cero o bien en células totalmente desacopladas o bien en células en parada metabólica completa.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la prevención terapéutica de síntomas y/o el tratamiento de sujetos que tienen trastorno o enfermedad mitocondrial asociado con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG*, con un péptido aromático-catiónico tal como se da a conocer en el presente documento, tal como D-Arg-2',6'Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato o de trifluoroacetato, reducirá la alteración en la fosforilación oxidativa, mejorando o previniendo así síntomas de enfermedades y trastornos mitocondriales asociados con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG*. Los síntomas de enfermedades o trastornos mitocondriales asociados con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG* incluyen, pero no se limitan a, crecimiento escaso, pérdida de coordinación muscular, debilidad muscular, déficit neurológico, convulsiones, autismo, espectro autista, características de tipo autista, incapacidades de aprendizaje, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, enfermedad renal, trastornos gastrointestinales, estreñimiento intenso, diabetes, aumento del riesgo de infección, disfunción tiroidea, disfunción suprarrenal, disfunción autonómica, confusión, desorientación, pérdida de memoria, crecimiento escaso, retraso del crecimiento, coordinación escasa, problemas sensoriales (visión, audición), funciones mentales reducidas, enfermedad del órgano, demencia, problemas respiratorios, hipoglucemia, apnea, acidosis láctica, convulsiones, dificultades para tragar, retrasos del desarrollo, trastornos del movimiento (disonía, espasmos musculares, temblores, corea), accidente cerebrovascular y atrofia cerebral.

Determinación del efecto biológico del producto terapéutico basado en péptido aromático-catiónico. En diversas realizaciones, se realizan ensayos adecuados *in vitro* o *in vivo* para determinar el efecto de un producto terapéutico basado en péptido aromático-catiónico específico y si su administración está indicada para el tratamiento. En diversas realizaciones, pueden realizarse ensayos *in vitro* con modelos de animales representativos, para determinar si un producto terapéutico basado en péptido aromático dado ejerce el efecto deseado en la reducción de la alteración de la función mitocondrial, tal como alteración de OXPHOS. Pueden someterse a prueba compuestos para su uso en terapia en sistemas de modelos de animales adecuados incluyendo ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos y similares, antes de someterse a prueba en sujetos humanos. De manera similar, para pruebas *in vivo*, puede usarse cualquiera de los sistemas de modelos de animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

Modos de administración y dosificaciones eficaces

Puede emplearse cualquier método conocido por los expertos en la técnica para poner en contacto una célula, órgano o tejido con un péptido. Los métodos adecuados incluyen métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Los métodos *in vivo* incluyen normalmente la administración de un péptido aromático-catiónico, tal como los descritos anteriormente, a un mamífero, de manera adecuada un ser humano. Cuando se usan *in vivo* para terapia, los péptidos aromáticos-catiónicos se administran al sujeto en cantidades eficaces (es decir, cantidades que tienen el efecto terapéutico deseado). La dosis y el régimen de dosificación dependerán del grado de la infección en el sujeto, las características del péptido aromático-catiónico particular usado, por ejemplo, su índice terapéutico, el sujeto y la historia del sujeto.

La cantidad eficaz puede determinarse durante ensayos preclínicos y ensayos clínicos mediante métodos familiares para los médicos y clínicos. Una cantidad eficaz de un péptido útil en los métodos puede administrarse a un mamífero que lo necesita mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos para administrar compuestos farmacéuticos. El péptido puede administrarse de manera sistémica o local.

El péptido puede formularse como una sal farmacéuticamente aceptable. El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal preparada a partir de una base o un ácido que es aceptable para su administración a un paciente, tal como un mamífero (por ejemplo, sales que tienen seguridad para mamíferos aceptable para un régimen de dosificación dado). Sin embargo, se entiende que no se requiere que las sales sean sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de compuestos intermedios que no están destinados a la administración a un paciente. Pueden derivarse sales farmacéuticamente aceptables a partir de bases orgánicas e inorgánicas farmacéuticamente aceptables y a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Además, cuando un péptido contiene tanto un resto básico, tal como una amina, piridina o imidazol, como un resto ácido tal como un ácido carboxílico o tetrazol, pueden formarse zwitteriones y se incluyen dentro del término "sal" tal como se usa en el presente documento. Las sales derivadas a partir de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, cobre,

féricas, ferrosas, de litio, magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, sodio y cinc, y similares. Las sales derivadas a partir de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, incluyendo aminas sustituidas, aminas cíclicas, aminas que se producen de manera natural y similares, tal como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperadina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Las sales derivadas a partir de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos bórico, carbónico, halogenhídrico (bromhídrico, clorhídrico, fluorhídrico o yodhídrico), nítrico, fosfórico, sulfámico y sulfúrico. Las sales derivadas a partir de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos hidroxiácidos alifáticos (por ejemplo, ácidos cítrico, glucónico, glicólico, láctico, lactobiónico, málico y tartárico), ácidos monocarboxílicos alifáticos (por ejemplo, ácido acético, butírico, fórmico, propiónico y trifluoroacético), aminoácidos (por ejemplo, ácidos aspártico y glutámico), ácidos carboxílicos aromáticos (por ejemplo, ácidos benzoico, p-clorobenzoico, difenilacético, gentísico, hipúrico y trifenilacético), hidroxiácidos aromáticos (por ejemplo, ácidos o-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzoico, 1-hidroxinaftaleno-2-carboxílico y 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico), ácido ascórbico, ácidos dicarboxílicos (por ejemplo, ácidos fumárico, maleico, oxálico y succínico), ácidos glucurónico, mandélico, mícico, nicotínico, orótico, pamoico, pantoténico, sulfónicos (por ejemplo, ácidos bencenosulfónico, canforsulfónico, edisílico, etanosulfónico, isetiónico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, naftaleno-2,6-disulfónico y p-toluenosulfónico), ácido xinafoico, y similares. En algunas realizaciones, la sal es una sal de acetato o de trifluoroacetato.

Los péptidos aromáticos-catiónicos descritos en el presente documento pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para su administración, de manera individual o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o la prevención de un trastorno o síntomas relacionados del mismo, descrito en el presente documento. Tales composiciones incluyen normalmente el agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas se formulan normalmente para ser compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea), oral, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, iontoforética y transmucosa. Las disoluciones o suspensiones usadas para 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 disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Puede ajustarse el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados a partir de vidrio o plástico. Por comodidad del paciente o médico encargado, la formulación de dosificación puede proporcionarse en un kit que contiene todos los equipos necesarios (por ejemplo, viales de fármaco, viales de diluyente, jeringas y agujas) para un ciclo de tratamiento (por ejemplo, 7 días de tratamiento).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable pueden incluir disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersión o disoluciones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, una composición para administración parenteral debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe protegerse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de péptido aromático-catiónico pueden incluir un portador, que puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomerasol y similares. Pueden incluirse glutatión y otros antioxidantes para prevenir la oxidación. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes indicados anteriormente, según se requiera,

seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los demás compuestos requeridos de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación típicos incluyen secado a vacío y liofilización, lo que puede proporcionar un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Para el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. También pueden prepararse composiciones orales usando un portador fluido para su uso como enjuague bucal. Pueden incluirse agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal 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 pueden suministrarse en forma de una pulverización de aerosol a partir de un dispensador o recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la patente estadounidense n.º 6.468.798.

La administración sistémica de un compuesto terapéutico tal como se describe en el presente documento también puede realizarse por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan agentes de penetración apropiados para la barrera que va a penetrarse. Tales agentes de penetración se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizaciones nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan para dar pomadas, bálsamos, geles o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica. En una realización, la administración transdérmica puede realizarse mediante iontoforesis.

Una proteína o péptido terapéutico puede formularse en un sistema de portador. El portador puede ser un sistema coloidal. El sistema coloidal puede ser un liposoma, un vehículo de bicapa de fosfolípido. En una realización, el péptido terapéutico se encapsula en un liposoma al tiempo que mantiene la integridad de péptido. Tal como apreciará un experto en la técnica, hay una variedad de métodos para preparar liposomas. (Véanse Lichtenberg *et al.*, *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988); Anselm *et al.*, *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). Las formulaciones liposómicas pueden retardar el aclaramiento y aumentar la captación celular (véase Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923 (2000)). También puede cargarse un agente activo en una partícula preparada a partir de componentes farmacéuticamente aceptables incluyendo liposomas o polímeros solubles, insolubles, permeables, impermeables, biodegradables o gastrorretentivos. Tales partículas incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas, nanopartículas biodegradables, micropartículas, micropartículas biodegradables, nanoesferas, nanoesferas biodegradables, microesferas, microesferas biodegradables, cápsulas, emulsiones, liposomas, micelas y sistemas de vectores virales.

El portador también puede ser un polímero, por ejemplo, una matriz polimérica biodegradable y biocompatible. En una realización, el péptido terapéutico puede incorporarse en la matriz polimérica al tiempo que se mantiene la integridad de proteína. El polímero puede ser natural, tal como polipéptidos, proteínas o polisacáridos, o sintético, tal como poli(α -hidroxiácidos). Los ejemplos incluyen portadores compuestos, por ejemplo, por colágeno, fibronectina, elastina, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, polisacárido, fibrina, gelatina y combinaciones de los mismos. En una realización, el polímero es poli(ácido láctico) (PLA) o co-poli(ácido láctico/glicólico) (PGLA). Las matrices poliméricas pueden prepararse y aislarse en una variedad de formas y tamaños, incluyendo microesferas y nanoesferas. Las formulaciones de polímeros pueden conducir a una duración prolongada del efecto terapéutico. (Véase Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923 (2000)). Se ha usado una formulación de polímero para hormona del crecimiento humana (hGH) en ensayos clínicos. (Véase Kozarich y Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552 (1998)).

Se describen ejemplos de formulaciones de liberación sostenida de microesferas de polímeros en la publicación PCT WO 99/15154 (Tracy *et al.*), patentes estadounidenses n.ºs 5.674.534 y 5.716.644 (ambas a nombre de Zale *et al.*), publicación PCT WO 96/40073 (Zale *et al.*), y publicación PCT WO 00/38651 (Shah *et al.*). Las patentes estadounidenses n.ºs 5.674.534 y 5.716.644 y la publicación PCT WO 96/40073 describen una matriz polimérica que contiene partículas de eritropoyetina que están estabilizadas frente a la agregación con una sal.

En algunas realizaciones, los compuestos terapéuticos se preparan con portadores que protegerán a los compuestos terapéuticos frente a la eliminación rápida a partir del organismo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Tales formulaciones pueden prepararse usando técnicas conocidas. Los materiales también pueden

obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células específicas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos específicos de célula) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.522.811.

Los compuestos terapéuticos también pueden formularse para potenciar la administración intracelular. Por ejemplo, en la técnica se conocen sistemas de administración liposómicos, véase, por ejemplo, Chonn y 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); y 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), describen el uso de liposomas fusogénicos para administrar una proteína a células tanto *in vivo* como *in vitro*.

La dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de los agentes terapéuticos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Se prefieren compuestos que muestran altos índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en los métodos, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos de animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Normalmente, una cantidad eficaz de los péptidos aromáticos-catiónicos, suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, oscila entre aproximadamente 0,000001 mg por kilogramo de peso corporal al día y aproximadamente 10,000 mg por kilogramo de peso corporal al día. De manera adecuada, los intervalos de dosificación son de desde aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal al día hasta aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 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 intervalo de 1-10 mg/kg cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas. En una realización, una única dosificación de péptido oscila entre 0,001-10.000 microgramos por kg de peso corporal. En una realización, las concentraciones de péptido aromático-catiónico en un portador oscilan entre 0,2 y 2000 microgramos por mililitro administrado. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo conlleva la administración una vez al día o una vez por semana. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o se termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el sujeto muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, se le puede administrar a un paciente un régimen profiláctico.

En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido aromático-catiónico puede definirse como una concentración de péptido en el tejido diana de 10^{-12} a 10^{-6} molar, por ejemplo, aproximadamente 10^{-7} molar. Esta concentración puede administrarse mediante dosis sistémicas de 0,001 a 100 mg/kg o dosis equivalente por área de superficie corporal. El calendario de dosis se optimizará para mantener la concentración terapéutica en un tejido diana, lo más preferiblemente mediante administración diaria o semanal individual, pero incluyendo también la administración continua (por ejemplo, infusión parenteral o aplicación transdérmica).

El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y el momento requeridos para tratar de manera eficaz a un sujeto, incluyendo 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 eficaz de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

El mamífero tratado según los presentes métodos puede 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 realización preferida, el mamífero es un ser humano.

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

En algunas realizaciones, los péptidos aromáticos-catiónicos pueden combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de enfermedades o trastornos mitocondriales asociados con mutaciones en el gen *SURF1* o el gen *POLG*. El tratamiento para enfermedades o trastornos mitocondriales implica normalmente tomar vitaminas y cofactores. Además, también pueden administrarse antibióticos, hormonas, agentes antineoplásicos, inmunomoduladores, fármacos dermatológicos, agentes antitrombóticos, agentes antianémicos y agentes cardiovasculares, a modo de ejemplo no limitativo.

En una realización, el péptido aromático-catiónico se combina con uno o más cofactores o vitaminas. A modo de ejemplo, tales compuestos pueden incluir uno o más de CoQ10, levocarnitina, riboflavina, acetil-1-carnitina, tiamina, nicotinamida, vitamina E, vitamina C, ácido lipoico, selenio, b-caroteno, biotina, ácido fólico, calcio, magnesio, fósforo, succinato, creatina, uridina, citratos, prednisona y vitamina K.

En una realización, se administra un agente terapéutico adicional a un sujeto en combinación con un péptido aromático-catiónico, de tal manera que se produce un efecto terapéutico sinérgico. Un "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico mayor que el aditivo que se produce mediante una combinación de dos agentes terapéuticos, y que supera el que se obtendría de otro modo como resultado a partir de la administración individual de cualquier agente terapéutico solo. Por tanto, pueden usarse dosis inferiores de uno o ambos de los agentes terapéuticos en el tratamiento de insuficiencia cardíaca, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada y efectos secundarios reducidos.

En cualquier caso, los múltiples agentes terapéuticos pueden administrarse en cualquier orden o incluso de manera simultánea. Si se administran de manera simultánea, los múltiples agentes terapéuticos pueden proporcionarse en una única forma unificada o en múltiples formas (únicamente a modo de ejemplo, o bien como una única pastilla o bien como dos pastillas independientes). Uno de los agentes terapéuticos puede administrarse en múltiples dosis o ambos pueden administrarse como múltiples dosis. Si no se administran de manera simultánea, el tiempo entre las múltiples dosis puede variar desde más de cero semanas hasta menos de cuatro semanas. Además, los métodos, composiciones y formulaciones de combinación no deben limitarse al uso de tan sólo dos agentes.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante lo siguiente.

Ejemplo 1: confirmación de sujetos mutantes con respecto a *SURF1*

Las mutaciones de *SURF1* dan normalmente como resultado profundos defectos de complejo IV. El complejo IV monomérico es altamente anómalo, mostrando ensamblaje reducido así como estructuras de complejo IV con un peso molecular anómalamente alto y bajo (figura 1, figura 6). La figura 1 muestra el complejo IV monomérico de un paciente pediátrico y un paciente adulto con enfermedad de Leigh. El paciente pediátrico muestra ensamblaje de complejo IV monomérico reducido con una forma de peso molecular anómalo de complejo IV. Estas estructuras de complejo IV anómalas representan probablemente complejo IV disfuncional y ensamblado de manera anómala. La figura 6 muestra el ensamblaje de complejo IV en dos sujetos pediátricos con enfermedad de Leigh. Por consiguiente, los sujetos que padecen enfermedad de Leigh pueden tratarse con los péptidos aromáticos-catiónicos dados a conocer en el presente documento.

Ejemplo 2: D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) aumenta OXPHOS en mutaciones de *SURF1*

Se mutó *SURF1* en dos regiones: 1) exón 4: 344-353 del 10, ins AT (secuencia delecionada = TCTGCCAGCC) (heterocigótico) y 2) exón 9: 875-876 del CT (heterocigótico). Se transformaron células de fibroblasto con *SURF1* mutado.

Después se hicieron crecer las células transformadas con *SURF1* mutado en DMEM y se dividieron en tres grupos. Se trató al grupo 1, el grupo de solución salina, con DMEM + solución salina. Se trató al grupo 2, el grupo de tratamiento crónico, con DMEM + SS-31 10 nM durante 5 días. Se trató al grupo 3, el grupo de tratamiento agudo, con DMEM + SS-31 10 nM durante 1 día (16-24 horas). Se usaron células de fibroblastos no transformados como controles y se dividieron en 3 grupos de tratamiento como se indicó anteriormente.

También se cultivaron fibroblastos transformados y de control en condiciones con inhibición de glicolisis. En la condición con inhibición de glicolisis, se cultivaron fibroblastos en medios de inhibición de glicolisis complementados con lactato y piruvato. Las condiciones de inhibición de glicolisis aumentaron la dependencia de las células con respecto a la fosforilación oxidativa e hicieron que los cambios fueran más evidentes.

La razón de desacoplamiento (UCR) es una expresión de la capacidad de reserva respiratoria e indica la capacidad de OXPHOS de las células. UCR se define como Cr_u / Cr . Cr_u es la tasa máxima de uso de oxígeno (flujo de oxígeno) producida cuando se desacoplan químicamente las mitocondrias usando FCCP (carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona). Debe realizarse el ajuste de FCCP dado que la concentración de FCCP requerida para

producir un uso de oxígeno máximo varía entre diferentes líneas celulares. Una vez alcanzado el uso de oxígeno máximo, aumentos adicionales de FCCP inhiben el uso de oxígeno mediante fosforilación oxidativa. Cr representa el uso de oxígeno por las células durante una respiración celular normal con sustratos en exceso. Se realizaron los siguientes ensayos adicionales y se usan las siguientes definiciones:

1) Razón de desacoplamiento (UCR): la UCR se define como Cr_u / Cr . La UCR es una expresión de la capacidad de reserva respiratoria. Cr_u es la tasa máxima de uso de oxígeno (flujo de oxígeno) producida cuando se desacoplan químicamente las mitocondrias usando FCCP (carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona). Debe realizarse el ajuste de FCCP dado que la concentración de FCCP requerida para producir un uso de oxígeno máximo varía entre diferentes líneas celulares. Una vez alcanzado el uso de oxígeno máximo, aumentos adicionales de FCCP inhiben el uso de oxígeno mediante fosforilación oxidativa (OXPHOS). Cr representa el uso de oxígeno por las células durante una respiración celular normal con sustratos en exceso.

2) Razón de control de flujo de rutina neto (Cr / Cr_u). Este valor es la inversa de la UCR. Este valor evalúa lo cerca que funciona la respiración de rutina con respecto a la capacidad respiratoria de fosforilación oxidativa.

3) Razón de control respiratorio (RCR): la RCR se define como Cr_u / Cr_o . Cr_u se definió anteriormente. Cr_o = respiración tras la inhibición de complejo V (ATP sintasa) mediante oligomicina. Esta razón permite la evaluación del desacoplamiento y la disfunción de OXPHOS.

4) Razón de control de flujo de fuga: Cr_o / Cr_u . Este parámetro es la inversa de RCR y representa la fuga de protones con inhibición de ADP fosforilación mediante oligomicina.

5) Razón de control respiratorio de fosforilación: la RCRp se define como $(Cr - Cr_o) / Cr_u$ (o $1 / UCR - 1 / RCR$). La RCRp es un índice que expresa la respiración relacionada con la fosforilación ($Cr - Cr_o$) en función de la capacidad respiratoria (Cr_u). La RCRp permanece constante, si el desacoplamiento parcial se compensa totalmente por una tasa de respiración de rutina aumentada y se mantiene una tasa constante de fosforilación oxidativa. Sin embargo, si la capacidad respiratoria disminuye sin ningún efecto sobre la tasa de fosforilación oxidativa, la RCRp aumenta, lo cual indica que se activa una proporción mayor de la capacidad máxima para impulsar la síntesis de ATP. La RCRp disminuye hasta cero o bien en células totalmente desacopladas o bien en células en parada metabólica completa.

En la figura 2A-G se muestran los resultados. "Stealth 2" en las figuras es el nombre de la línea celular de fibroblastos que porta el mutante de *SURF1*; "Stealth 4" en las figuras es el nombre de la línea celular de fibroblastos que porta el mutante de *POLG*. Tal como se muestra en las figuras, los péptidos aromáticos-catiónicos de la presente divulgación son útiles para tratar trastornos mitocondriales, tales como los provocados por mutaciones de *SURF1*, por ejemplo, síndrome de Leigh, y para tratar enfermedades o estados asociados con desregulación de OXPHOS.

Ejemplo 3: D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ aumenta OXPHOS en mutaciones de *POLG*

Se transformaron células de fibroblastos con un gen mutado de *POLG*, mutación en el exón 7; c.13399G>A, p. Ala467Thr (homocigótica). *POLG* codifica para la subunidad catalítica de ADN polimerasa gamma, que se requiere para la replicación y reparación del ADN mitocondrial. Se sabe que mutaciones en *POLG* provocan oftalmoplejia externa progresiva (PEO), enfermedad de Alpers y neuropatía atáxica sensorial con disartria y oftalmoparesia (SANDO).

Se hicieron crecer las células de fibroblastos con *POLG* mutado y se dividieron en tres grupos. Se trató al grupo 1, el grupo de solución salina, con DMEM y solución salina. Se trató al grupo 2, el grupo de tratamiento crónico, con DMEM + D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 10 nM durante 5 días. Se trató al grupo 3, el grupo de tratamiento agudo, con DMEM + D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 10 nM durante 1 día (16-24 horas). Se usaron células de fibroblastos no transformados como controles y se dividieron en 3 grupos de tratamiento como se indicó anteriormente.

También se cultivaron fibroblastos transformados y de control en condiciones con inhibición de glicolisis. En la condición con inhibición de glicolisis, se cultivaron fibroblastos en medios de inhibición de glicolisis complementados con lactato y piruvato. Las condiciones de inhibición de glicolisis aumentaron la dependencia de las células con respecto a la fosforilación oxidativa e hicieron que los cambios fueran más evidentes. Se usan las siguientes definiciones:

Se midieron los efectos del tratamiento con D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ mediante UCR. La razón de desacoplamiento (UCR) es una expresión de la capacidad de reserva respiratoria e indica la capacidad de OXPHOS de las células. UCR se define como Cr_u / Cr . Cr_u es la tasa máxima de uso de oxígeno (flujo de oxígeno) producida cuando se desacoplan químicamente las mitocondrias usando FCCP (carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona). Debe realizarse el ajuste de FCCP dado que la concentración de FCCP requerida para producir un uso de oxígeno máximo varía entre diferentes líneas celulares. Una vez alcanzado el uso de oxígeno máximo, aumentos adicionales de FCCP inhiben el uso de oxígeno mediante fosforilación oxidativa. Cr representa el uso de oxígeno por las células durante una respiración celular normal con sustratos en exceso. Se realizaron los siguientes ensayos adicionales y se usan las siguientes definiciones:

1) Razón de desacoplamiento (UCR): la UCR se define como Cr_u / Cr . La UCR es una expresión de la capacidad de reserva respiratoria. Cr_u es la tasa máxima de uso de oxígeno (flujo de oxígeno) producida cuando se desacoplan químicamente las mitocondrias usando FCCP (carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona). Debe realizarse el ajuste de FCCP dado que la concentración de FCCP requerida para producir un uso de oxígeno máximo varía entre diferentes líneas celulares. Una vez alcanzado el uso de oxígeno máximo, aumentos adicionales de FCCP inhiben el uso de oxígeno mediante fosforilación oxidativa (OXPHOS). Cr representa el uso de oxígeno por las células durante una respiración celular normal con sustratos en exceso.

2) Razón de control de flujo de rutina neto (Cr / Cr_u). Este valor es la inversa de la UCR. Este valor evalúa lo cerca que funciona la respiración de rutina con respecto a la capacidad respiratoria de fosforilación oxidativa.

3) Razón de control respiratorio (RCR): la RCR se define como Cr_u / Cr_o . Cr_u se definió anteriormente. Cr_o = respiración tras la inhibición de complejo V (ATP sintasa) mediante oligomicina. Esta razón permite la evaluación del desacoplamiento y la disfunción de OXPHOS.

4) Razón de control de flujo de fuga: Cr_o / Cr_u . Este parámetro es la inversa de RCR y representa la fuga de protones con inhibición de ADP fosforilación mediante oligomicina.

5) Razón de control respiratorio de fosforilación: la RCRp se define como $(Cr - Cr_o) / Cr_u$ (o $1 / UCR - 1 / RCR$). La RCRp es un índice que expresa la respiración relacionada con la fosforilación ($Cr - Cr_o$) en función de la capacidad respiratoria (Cr_u). La RCRp permanece constante, si el desacoplamiento parcial se compensa totalmente por una tasa de respiración de rutina aumentada y se mantiene una tasa constante de fosforilación oxidativa. Sin embargo, si la capacidad respiratoria disminuye sin ningún efecto sobre la tasa de fosforilación oxidativa, la RCRp aumenta, lo cual indica que se activa una proporción mayor de la capacidad máxima para impulsar la síntesis de ATP. La RCRp disminuye hasta cero o bien en células totalmente desacopladas o bien en células en parada metabólica completa.

En la figura 3A-G se muestran los resultados. "Stealth 4" en las figuras es el nombre de la línea celular de fibroblastos que porta el mutante de *POLG*. Tal como se muestra en las figuras, los péptidos aromáticos-catiónicos de la presente divulgación, tales como D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, son útiles para tratar trastornos mitocondriales, tales como los provocados por mutaciones de *POLG*, por ejemplo, enfermedad de Alper, oftalmoplejia externa progresiva (PEO) y neuropatía atáxica sensorial con disartria y oftalmoparesia (SANDO), y para tratar enfermedades o estados asociados con desregulación de OXPHOS.

Equivalentes

La presente invención no debe limitarse en cuanto a las realizaciones particulares descritas en esta solicitud, que se pretende que sean ilustraciones individuales de aspectos individuales de la invención. Métodos y aparatos funcionalmente equivalentes dentro del alcance de la invención, además de los indicados en el presente documento, resultaron evidentes para los expertos en la técnica a partir de las descripciones anteriores. Se pretende que tales modificaciones y variaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La presente invención debe limitarse únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes al que tienen derecho tales reivindicaciones.

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

Tal como se entendió por un experto en la técnica, para todos y cada uno de los fines, particularmente en cuanto a proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos dados a conocer en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Puede reconocerse fácilmente que cualquier intervalo indicado describe de manera suficiente y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades, tercios, cuartos, quintas partes, décimas partes, etc., iguales. Como ejemplo no limitativo, cada intervalo comentado en el presente documento puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, un tercio central y un tercio superior, etc. Tal como también entenderá un experto en la técnica, todas las expresiones tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que", y similares, incluyen el número indicado y se refieren a intervalos que pueden dividirse posteriormente en subintervalos tal como se comentó anteriormente. Finalmente, tal como entendió un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Por tanto, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 células se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 células. De manera similar, un grupo que tiene 1-5 células se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 células, y así sucesivamente.

Dentro de las siguientes reivindicaciones se exponen otras realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de síndrome de Leigh, enfermedad de Alpers, trastornos de ataxia-neuropatía, u oftalmoplejia externa progresiva en un sujeto que lo necesita en el que el péptido reduce o mejora al menos un síntoma de la enfermedad.
5
2. Péptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el síndrome de Leigh está asociado con una mutación del gen *SURF1*.
10
3. Péptido para su uso según cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido reduce o mejora uno o más síntomas seleccionados del grupo que consiste en crecimiento escaso, pérdida de coordinación muscular, debilidad muscular, déficit neurológico, convulsiones, autismo, espectro autista, características de tipo autista, incapacidades de aprendizaje, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, enfermedad renal, trastornos gastrointestinales, estreñimiento intenso, diabetes, aumento del riesgo de infección, disfunción tiroidea, disfunción suprarrenal, disfunción autonómica, confusión, desorientación, pérdida de memoria, crecimiento escaso, retraso del crecimiento, coordinación escasa, problemas sensoriales (visión, audición), funciones mentales reducidas, demencia, problemas respiratorios, hipoglucemia, apnea, acidosis láctica, convulsiones, dificultades para tragar, retrasos del desarrollo, trastornos del movimiento (disonía, espasmos musculares, temblores, corea), accidente cerebrovascular y atrofia cerebral.
15
20
4. Péptido para su uso según cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido se administra por vía oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.
- 25 5. Péptido para su uso según la reivindicación 2, en el que la mutación génica da como resultado una alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial debido a una alteración del ensamblaje completo de al menos un complejo mitocondrial seleccionado del grupo que consiste en: complejo I; complejo II; complejo III; complejo IV; y complejo V.
- 30 6. Péptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que el sujeto tiene una mutación de *POLG* que da como resultado una alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

FIG. 1

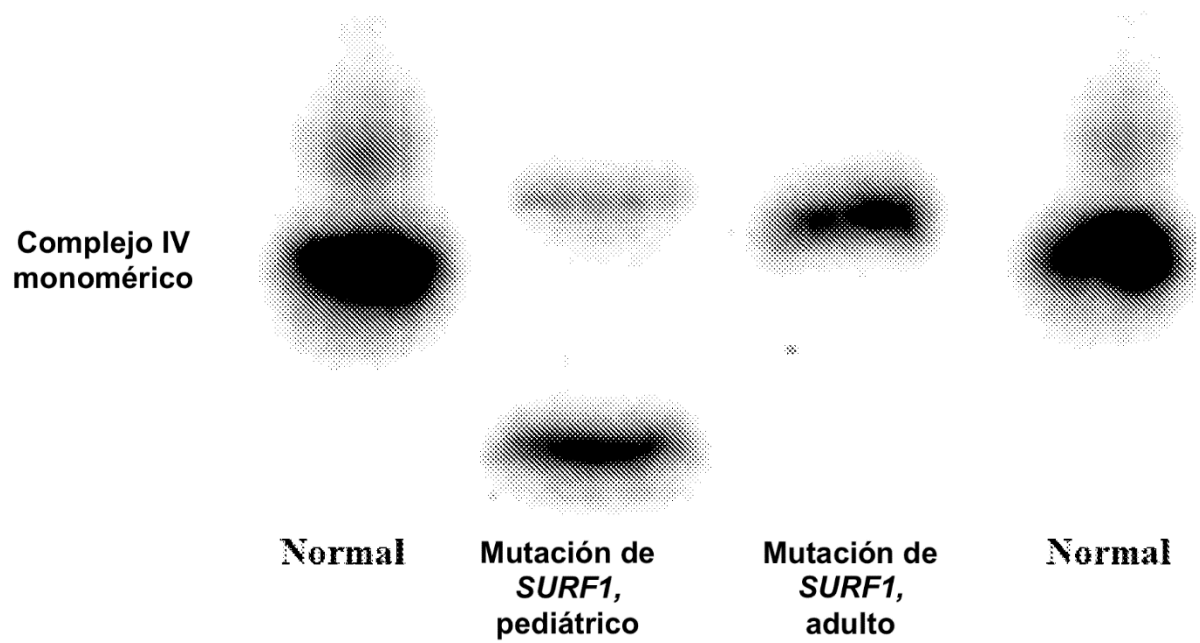
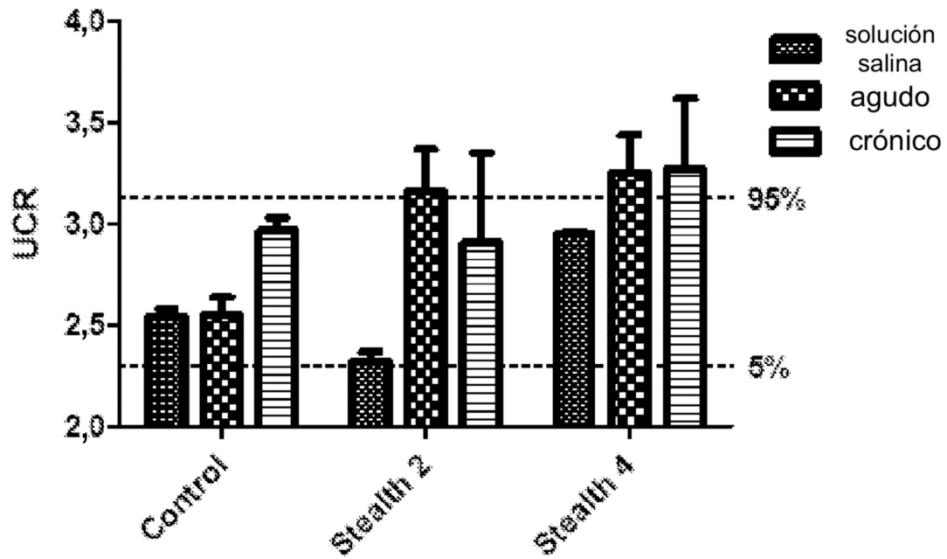


FIG. 2A

Razón de desacoplamiento – Condiciones normales



Razón de desacoplamiento – Inhibición de glicólisis

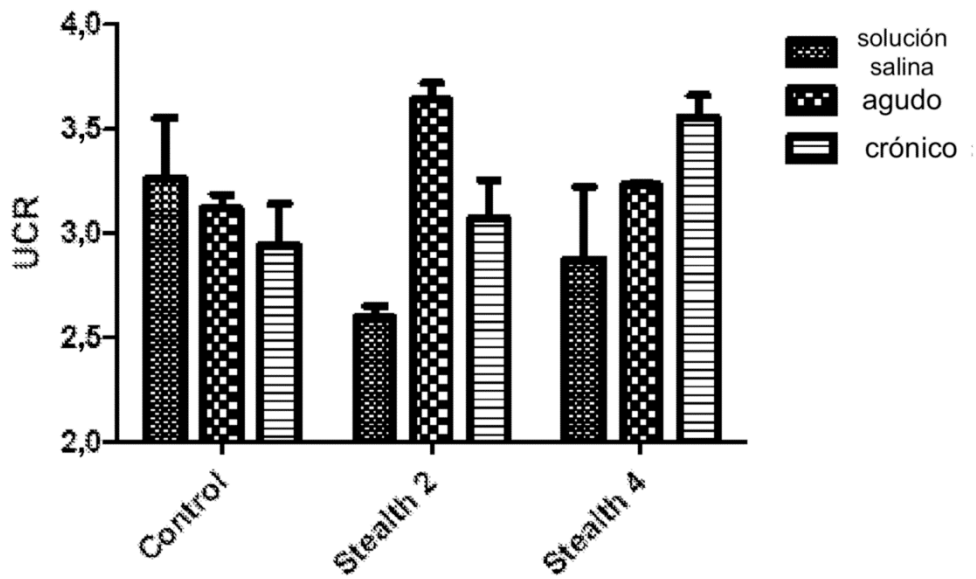
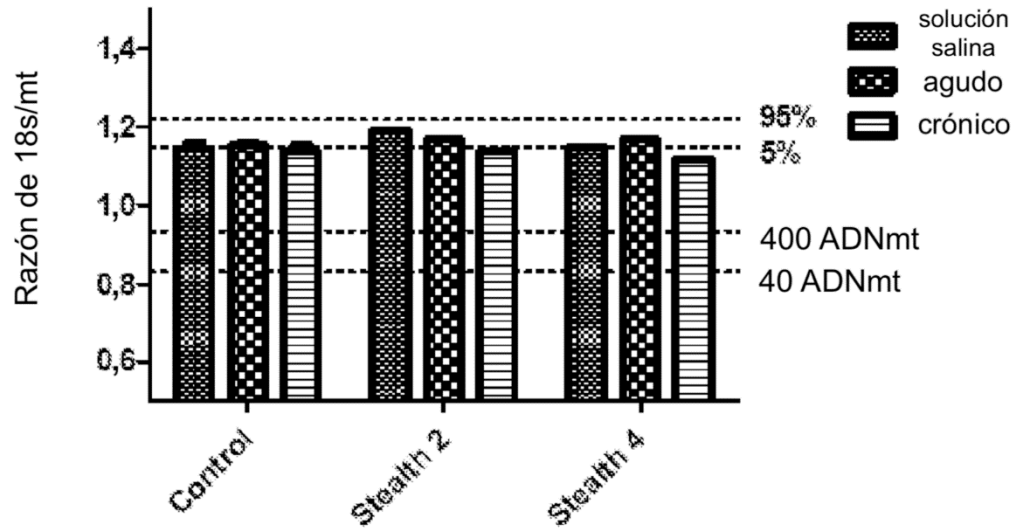


FIG. 2B

Agotamiento de ADNmt – Condiciones normales



Agotamiento de ADNmt – Inhibición de glicólisis

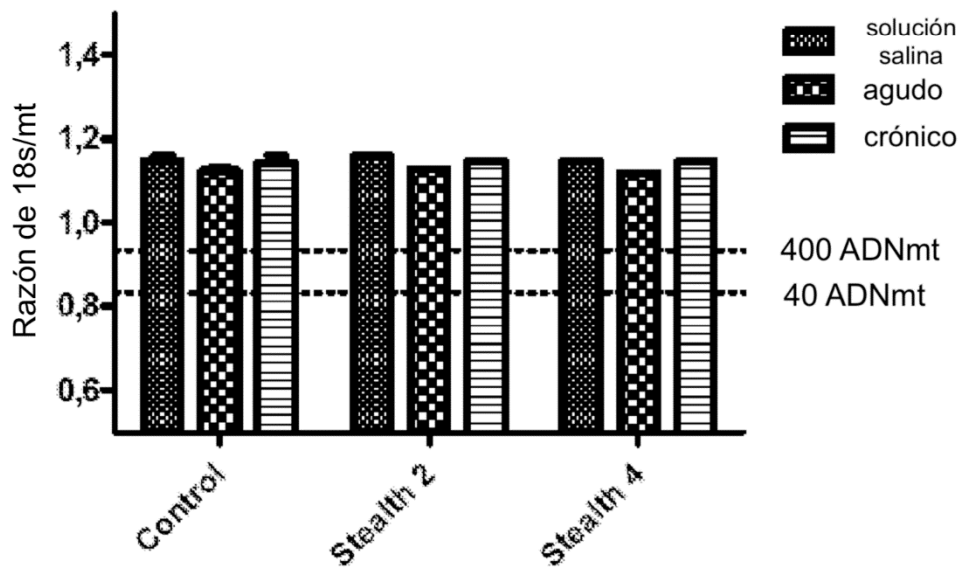
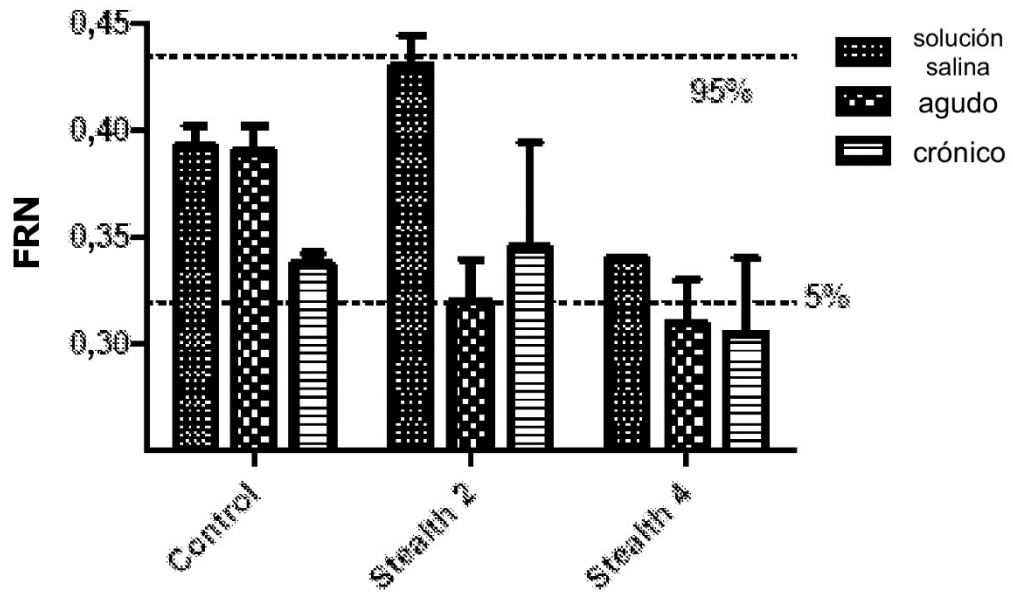


FIG. 2C

Flujo de rutina neto – Condiciones normales



Flujo de rutina neto – Inhibición de glicólisis

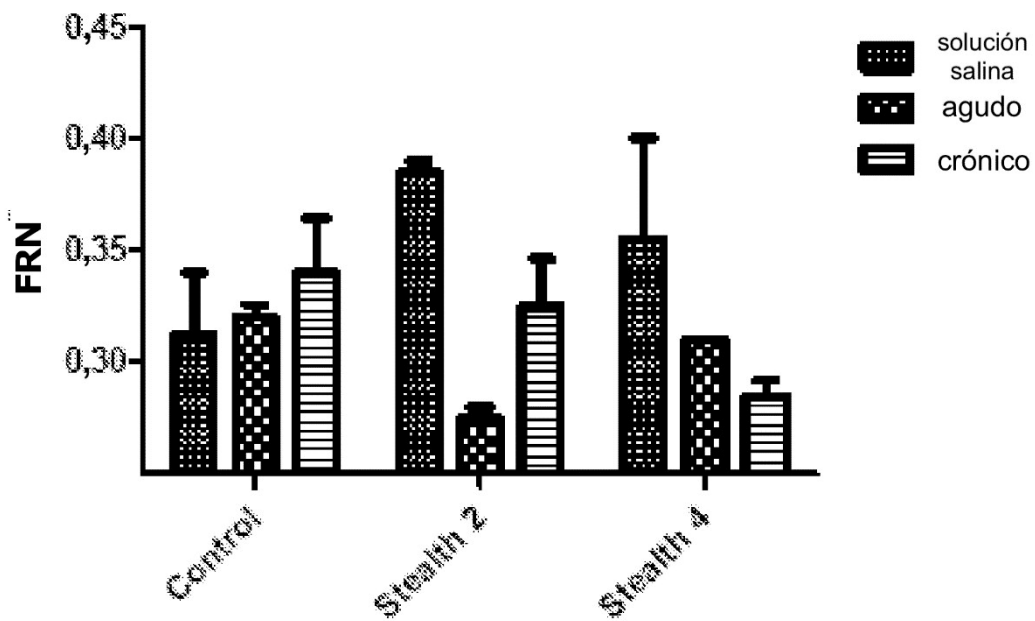
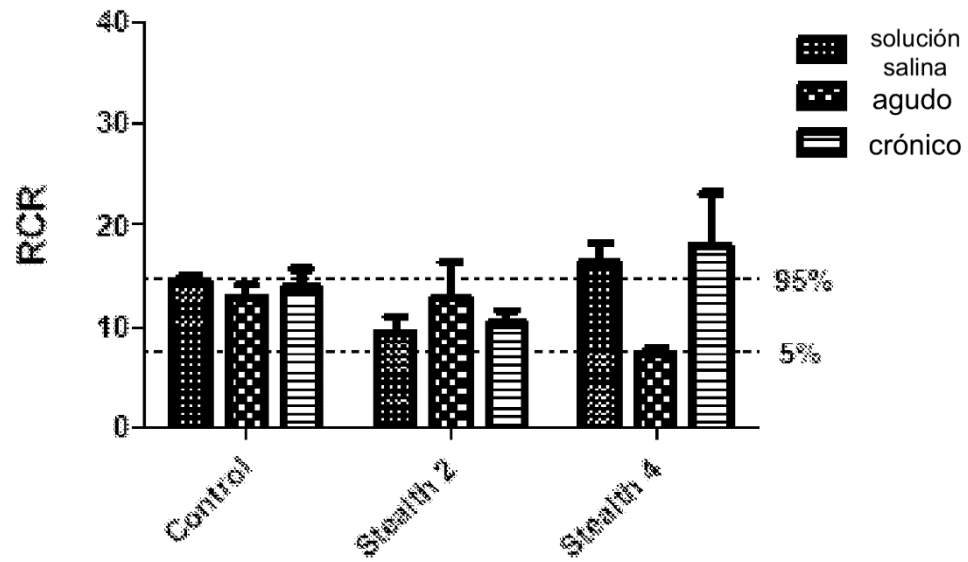


FIG. 2D

Razón de control respiratorio – Condiciones normales



Razón de control respiratorio – Inhibición de glicólisis

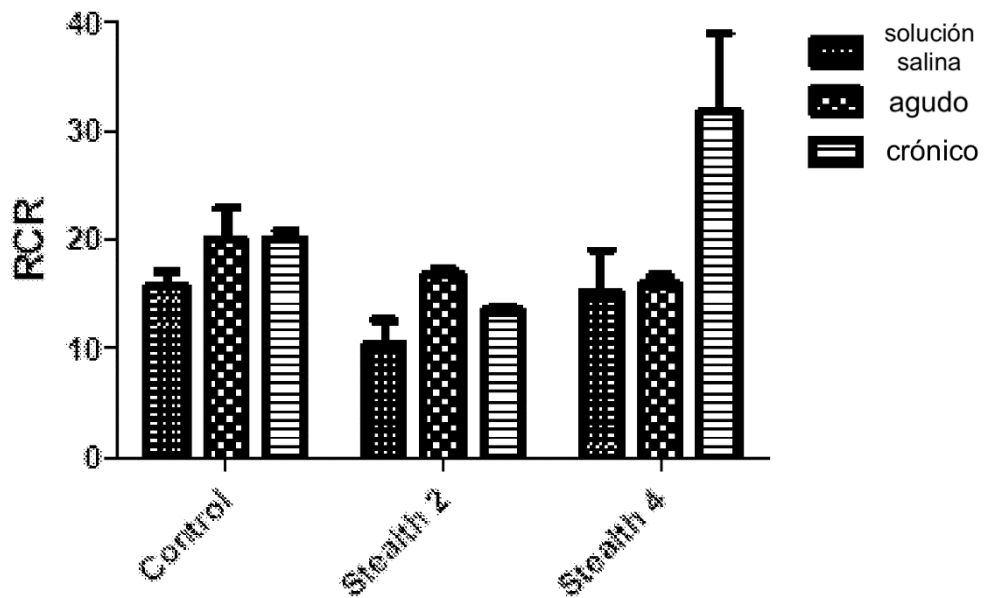
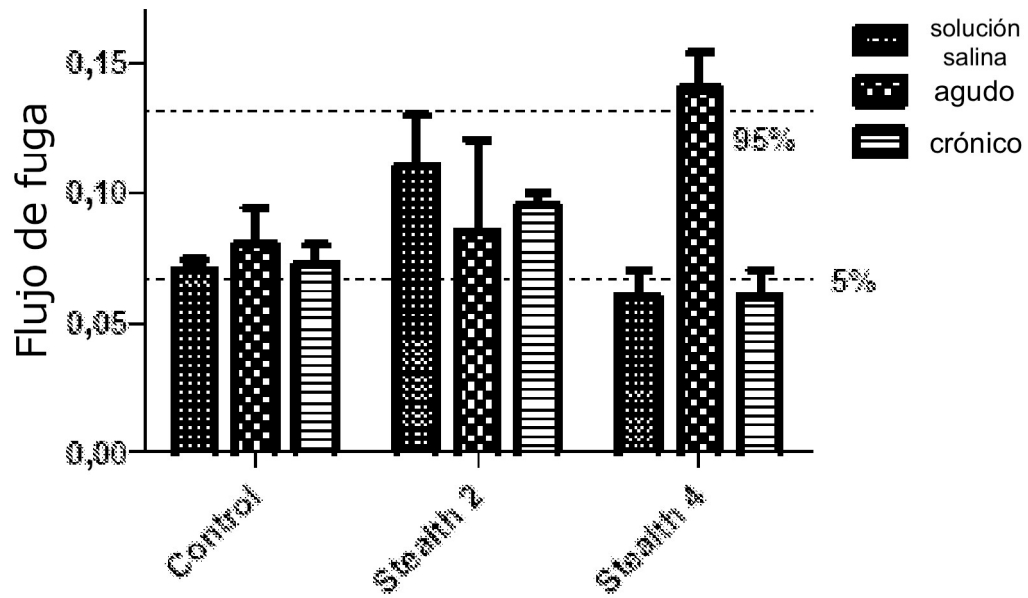


FIG. 2E

Razón de control de flujo de fuga – Condiciones normales



Razón de control de flujo de fuga – Inhibición de glicólisis

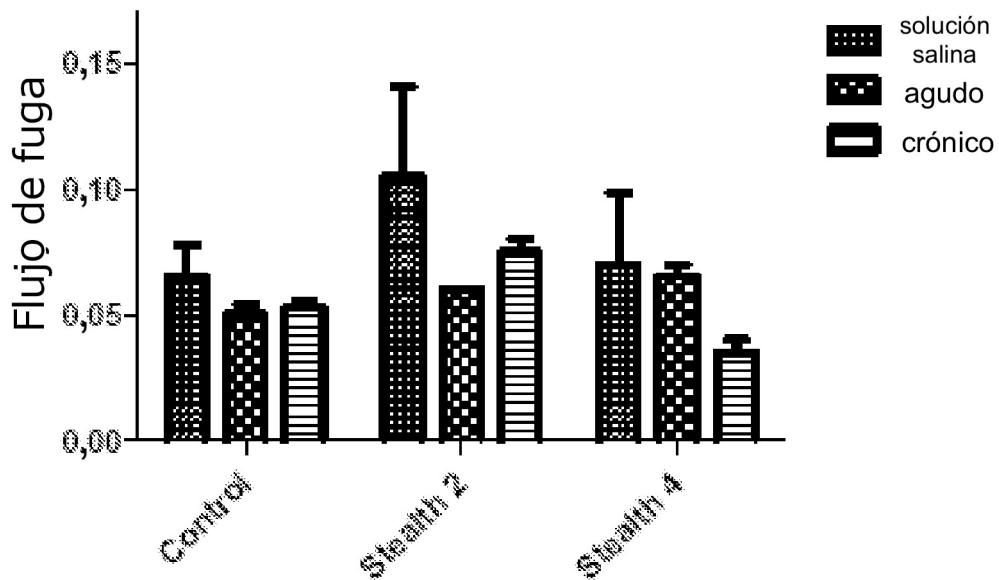
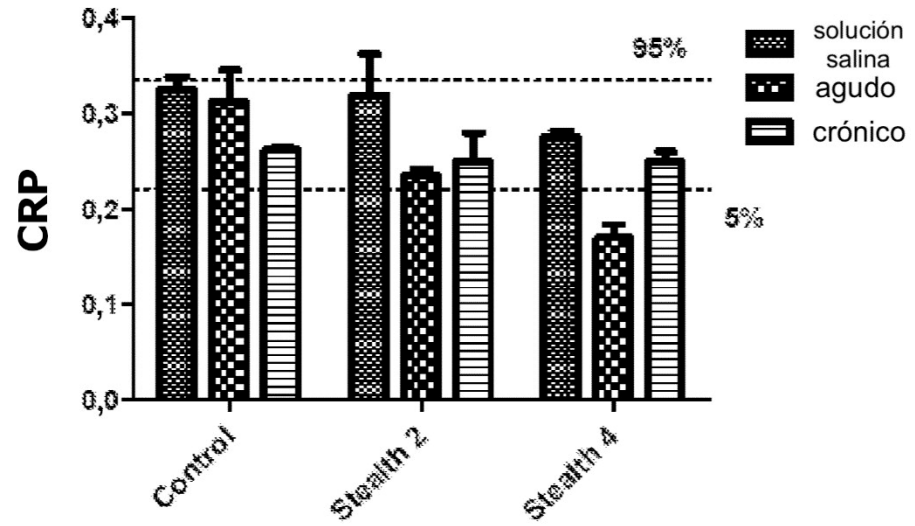


FIG. 2F

Razón de control respiratorio de fosforilación – Condiciones normales



Razón de control respiratorio de fosforilación – Inhibición de glicólisis

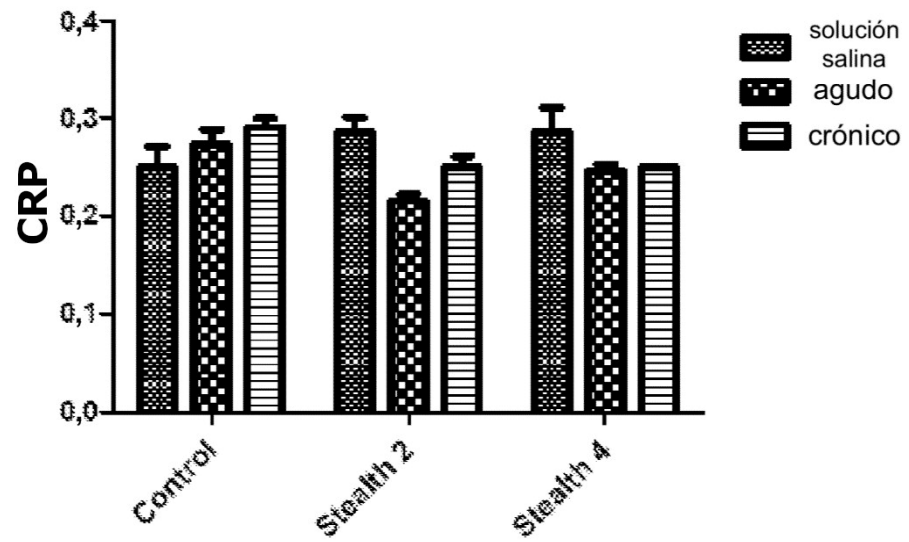
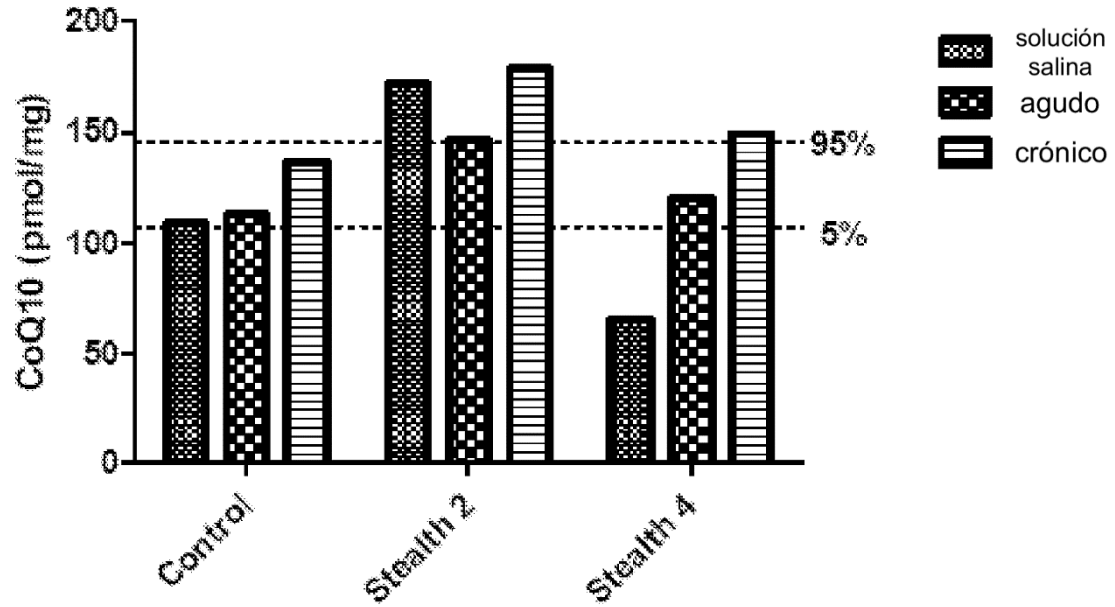


FIG. 2G

Niveles de CoQ10: condiciones de crecimiento normales



Niveles de CoQ10: Inhibición de glicólisis

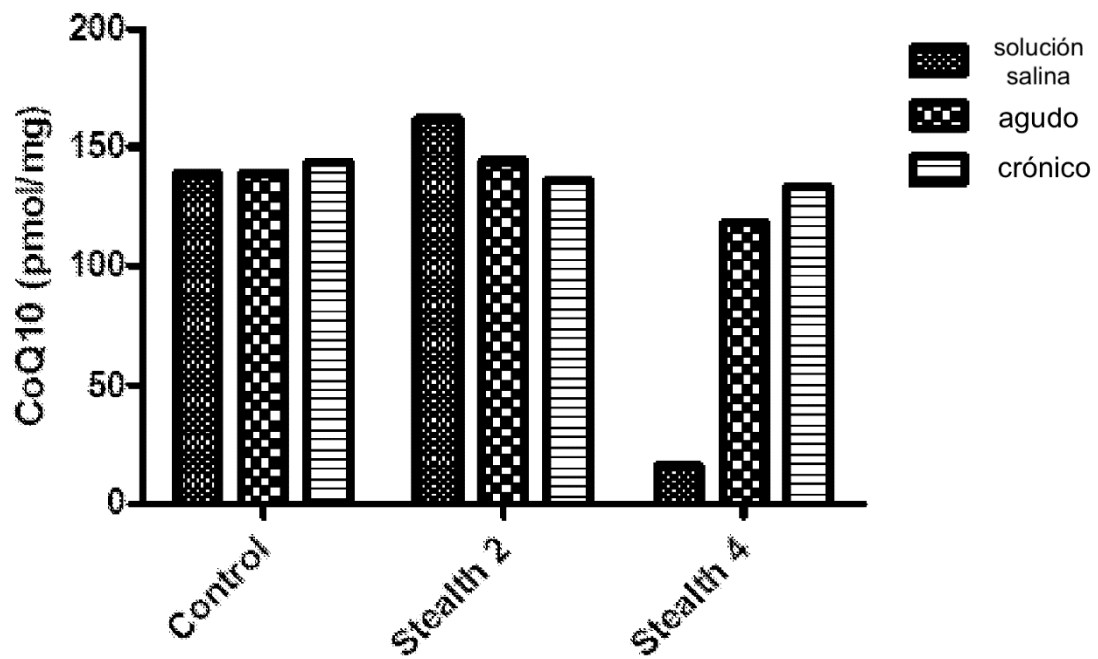
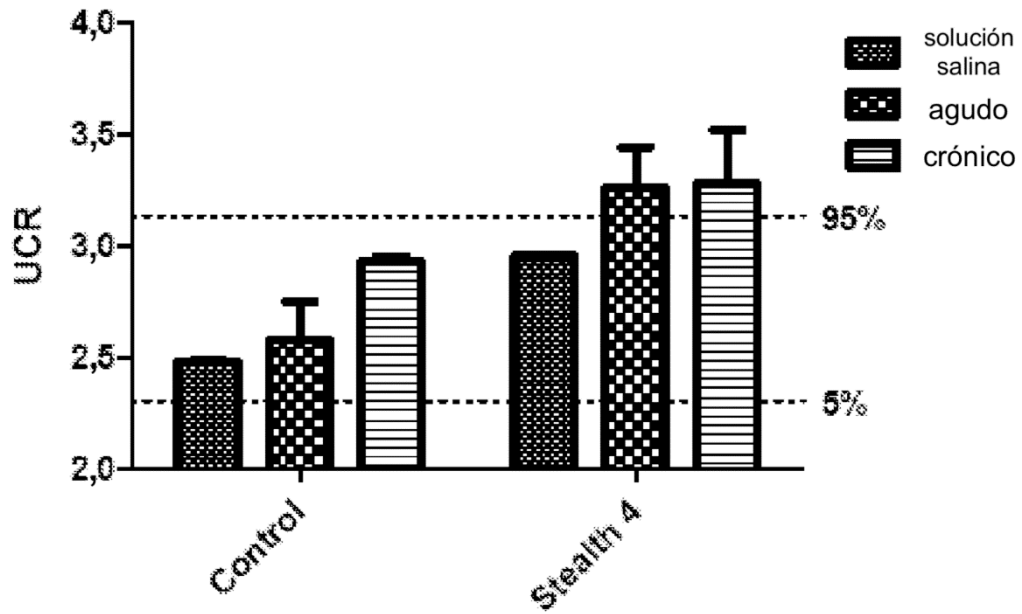


FIG. 3A

Razón de desacoplamiento – Condiciones normales



Razón de desacoplamiento – Inhibición de glicólisis

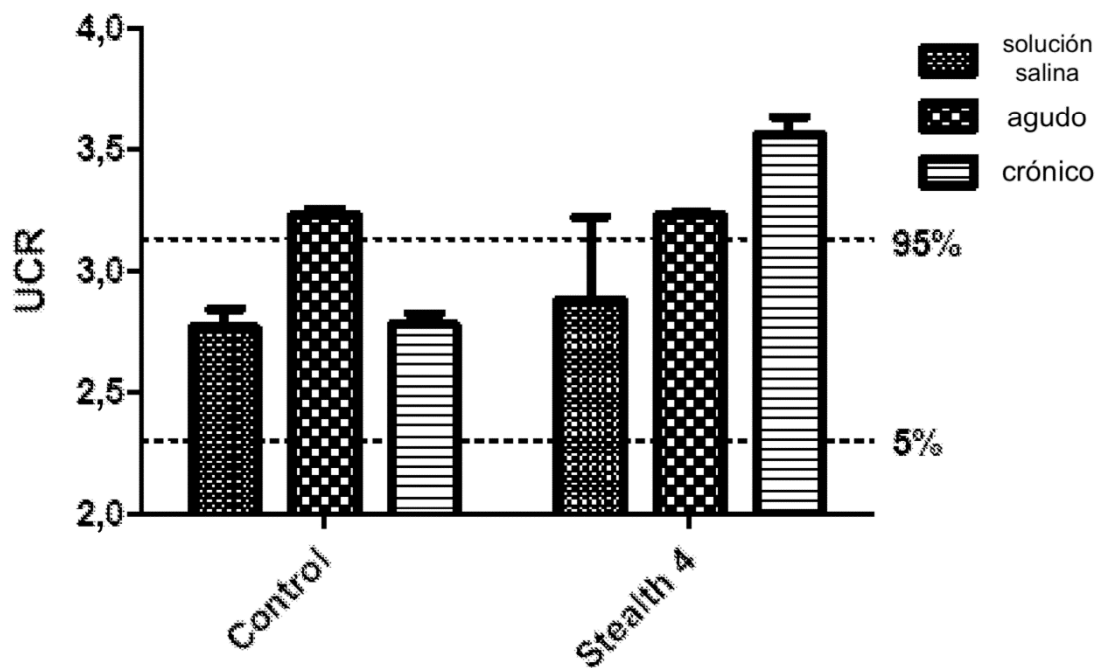
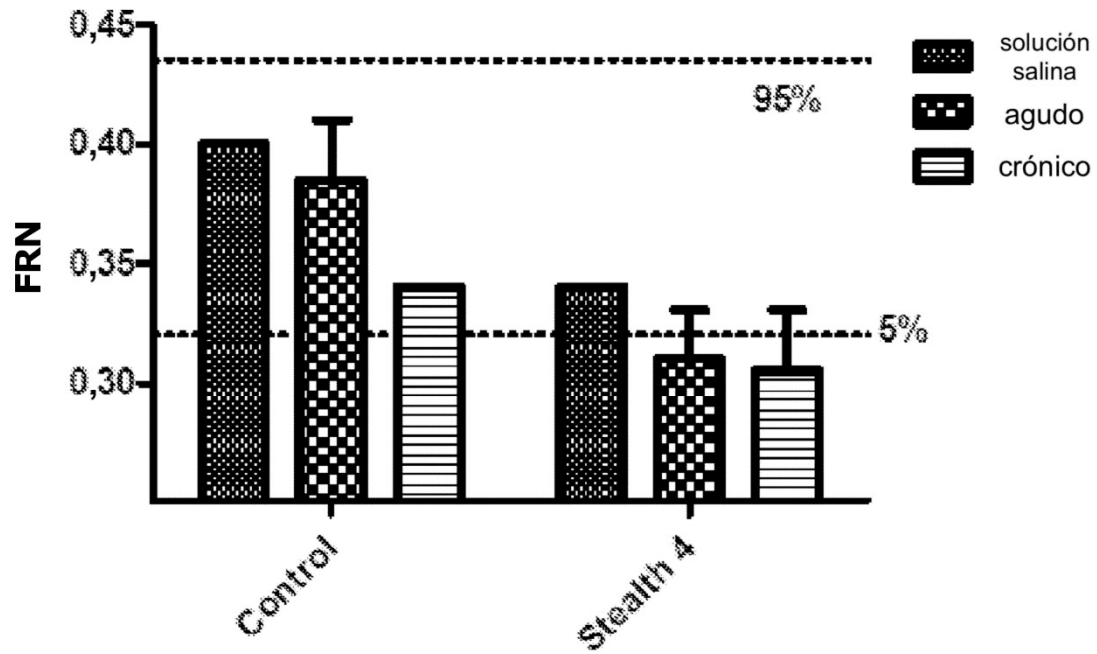


FIG. 3B

Flujo de rutina neto – Condiciones normales



Flujo de rutina neto – Inhibición de glicólisis

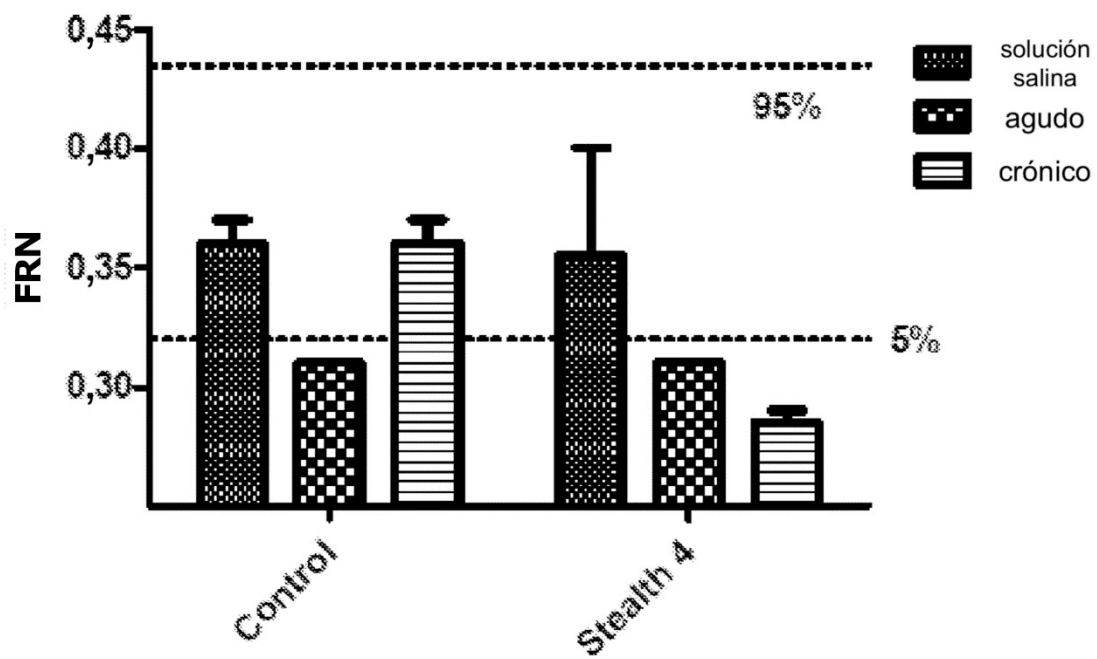
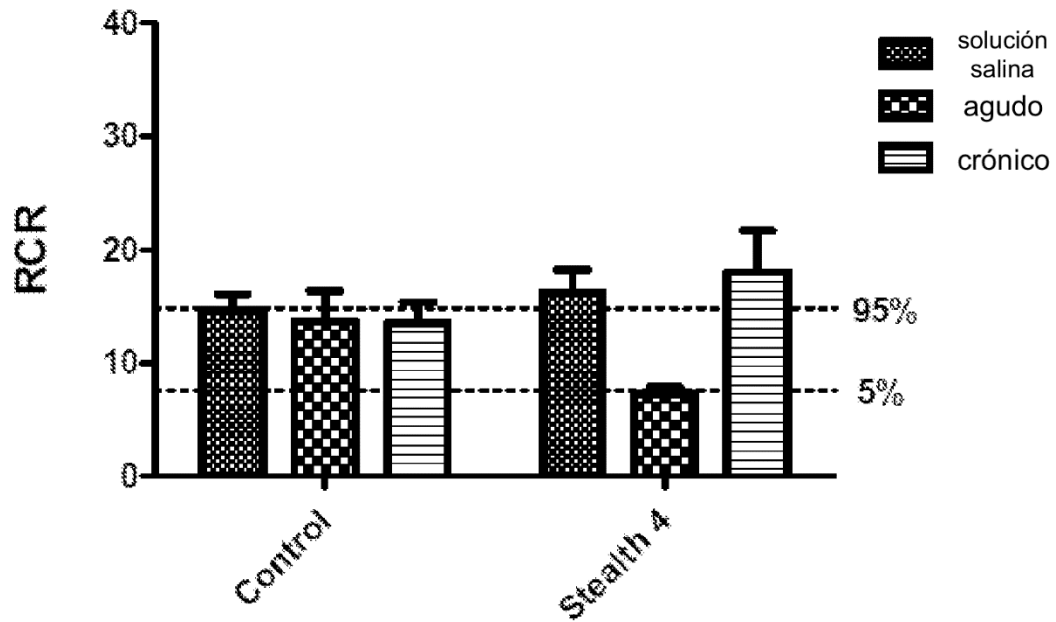


FIG. 3C

Razón de control respiratorio – Condiciones normales



Razón de control respiratorio – Inhibición de glicólisis

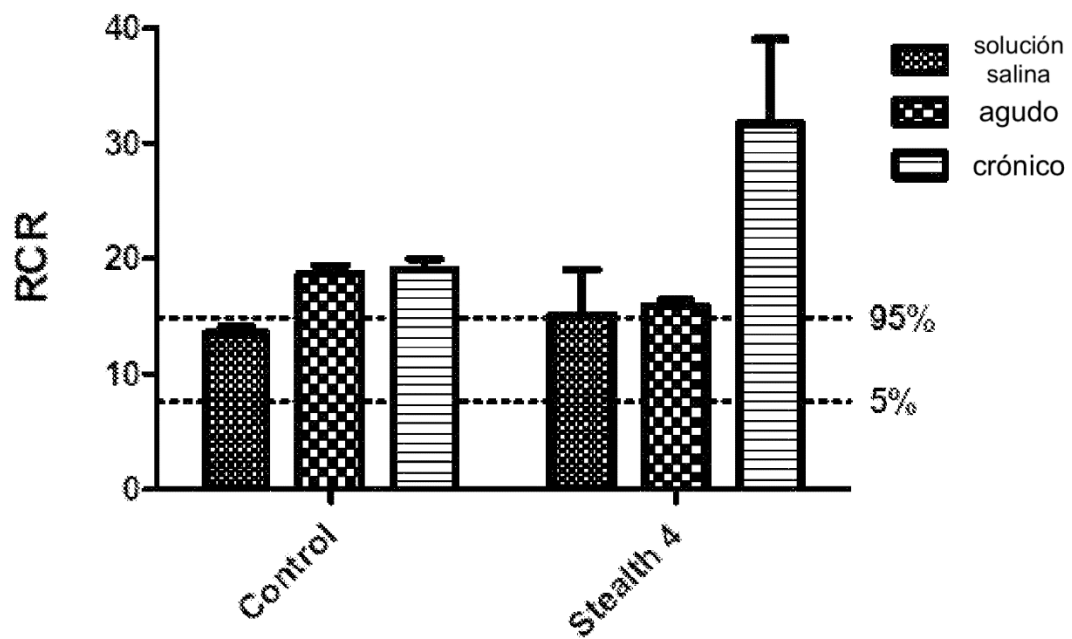
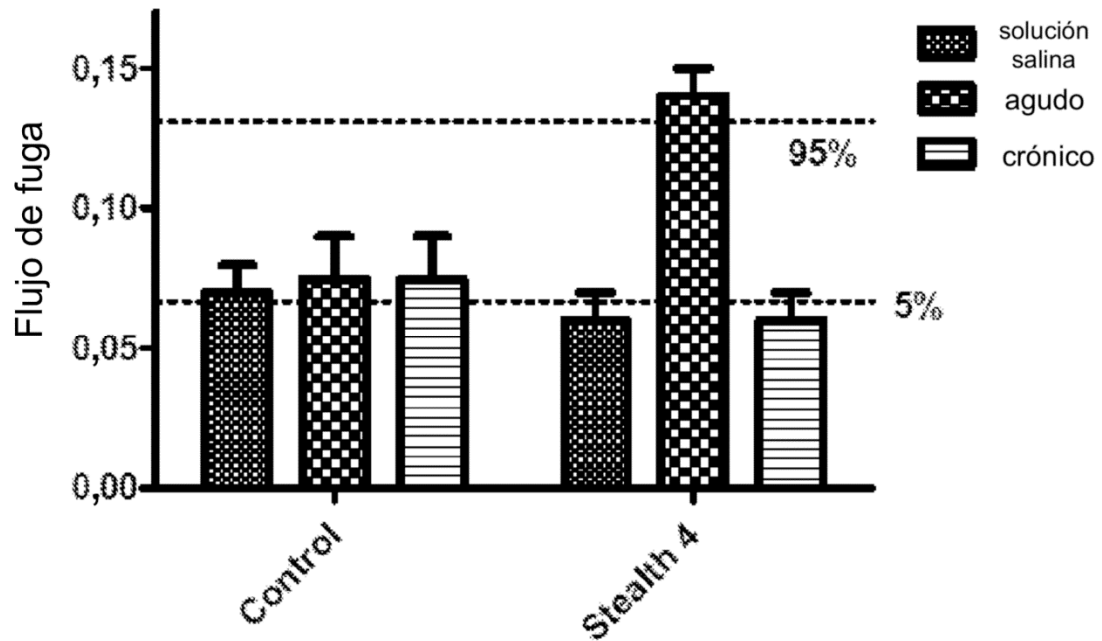


FIG. 3D

Razón de control de flujo de fuga – Condiciones normales



Razón de control respiratorio de fosforilación – Inhibición de glicólisis

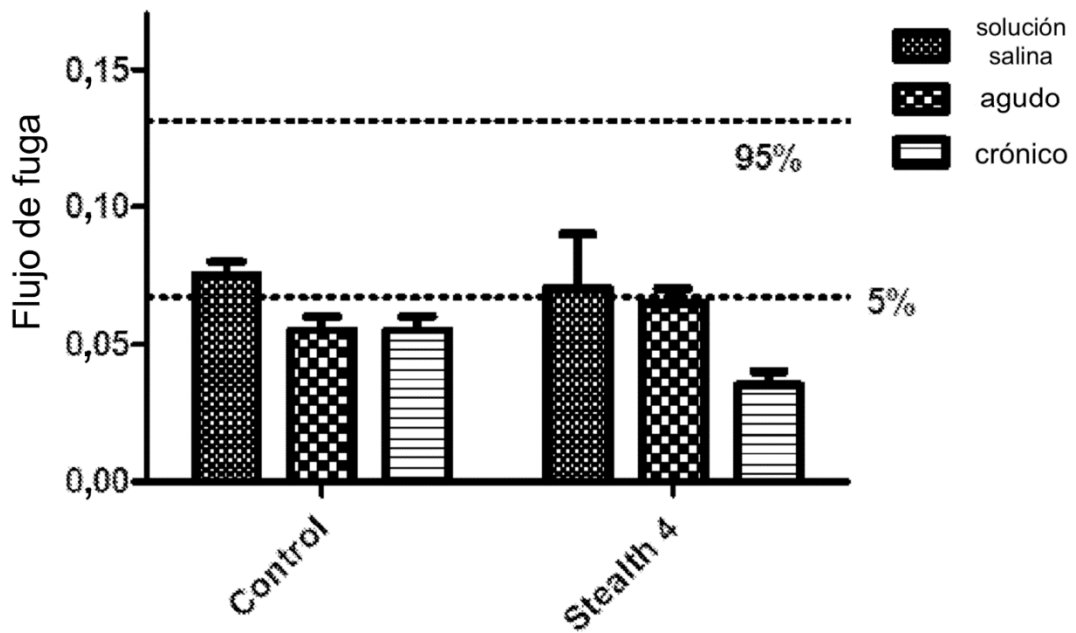
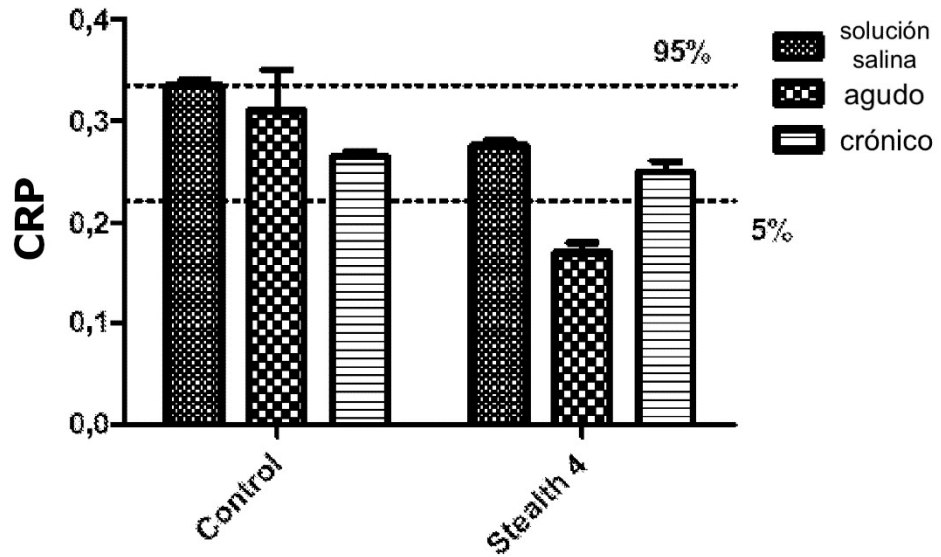


FIG. 3E

Razón de control respiratorio de fosforilación – Condiciones normales



Razón de control respiratorio de fosforilación – Inhibición de glicólisis

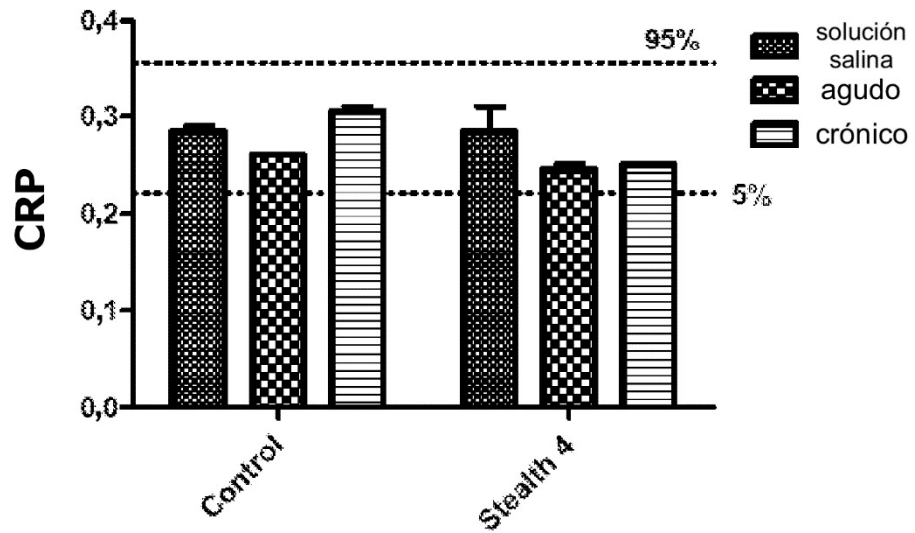
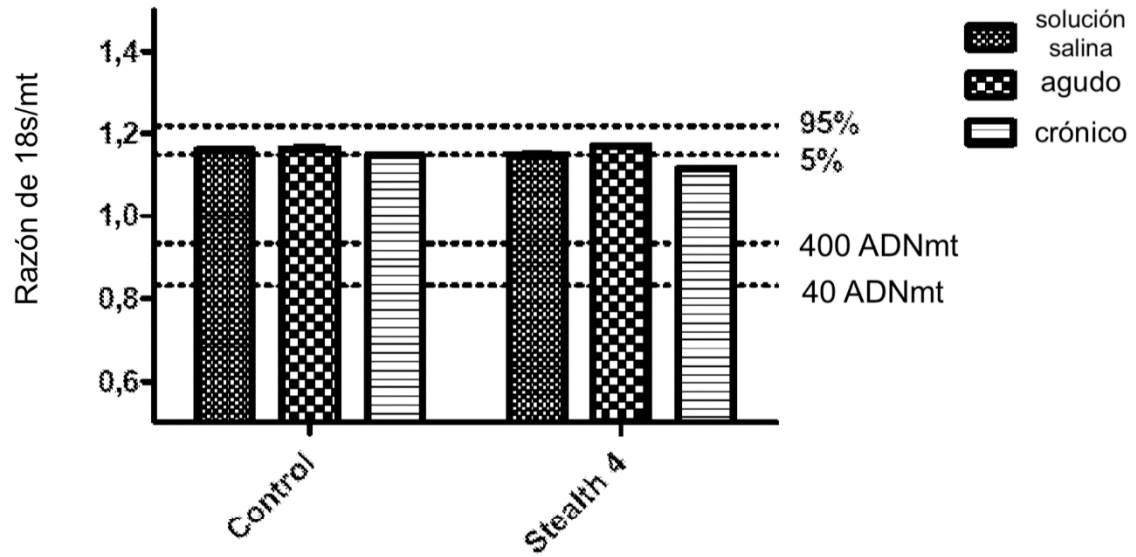


FIG. 3F

Agotamiento de ADNmt – Condiciones normales



Agotamiento de ADNmt – Inhibición de glicólisis

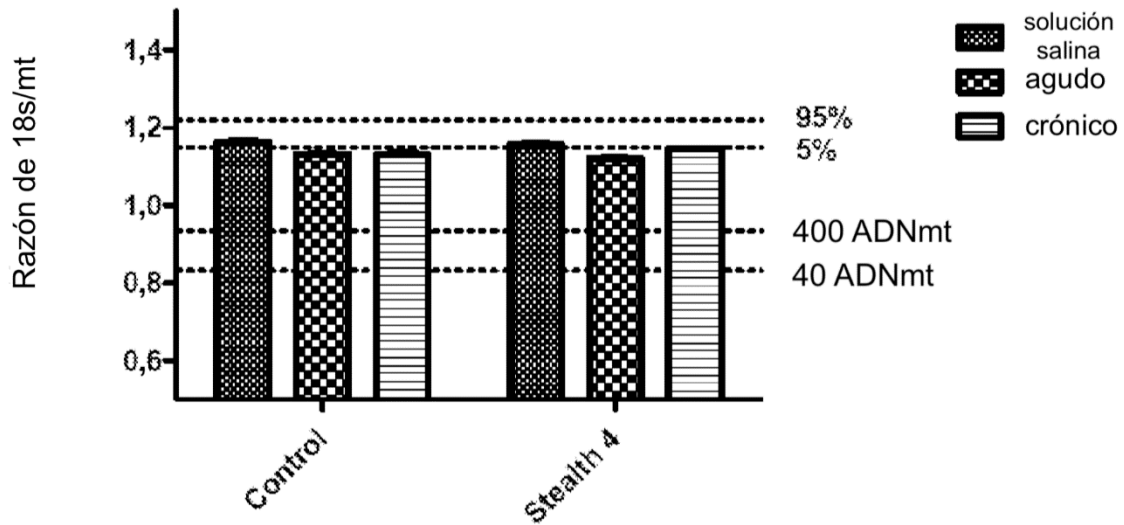
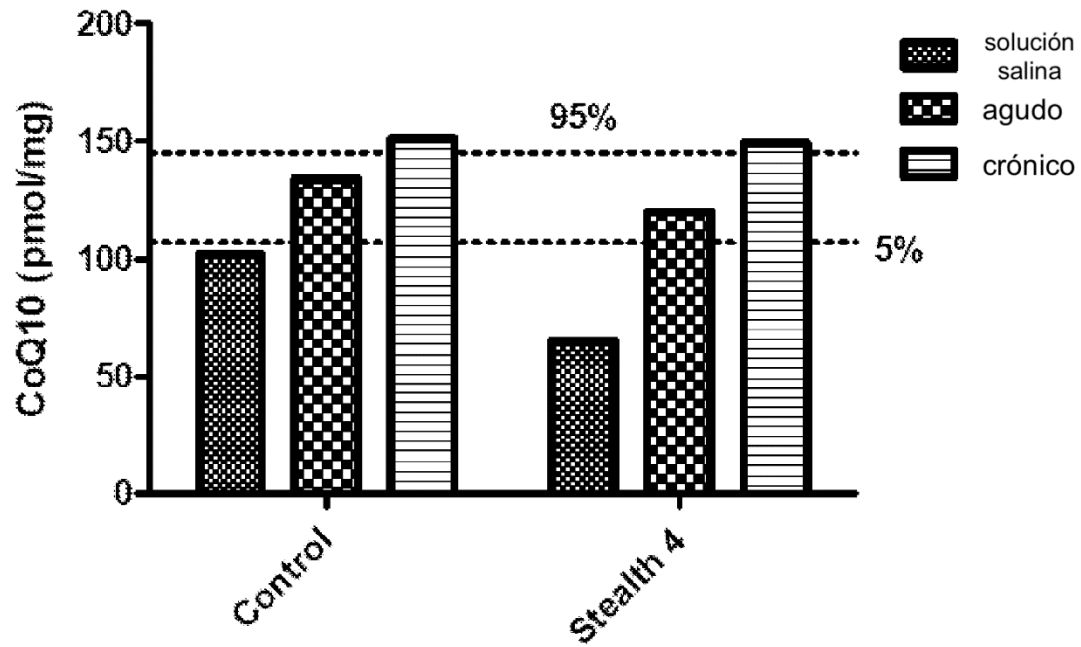
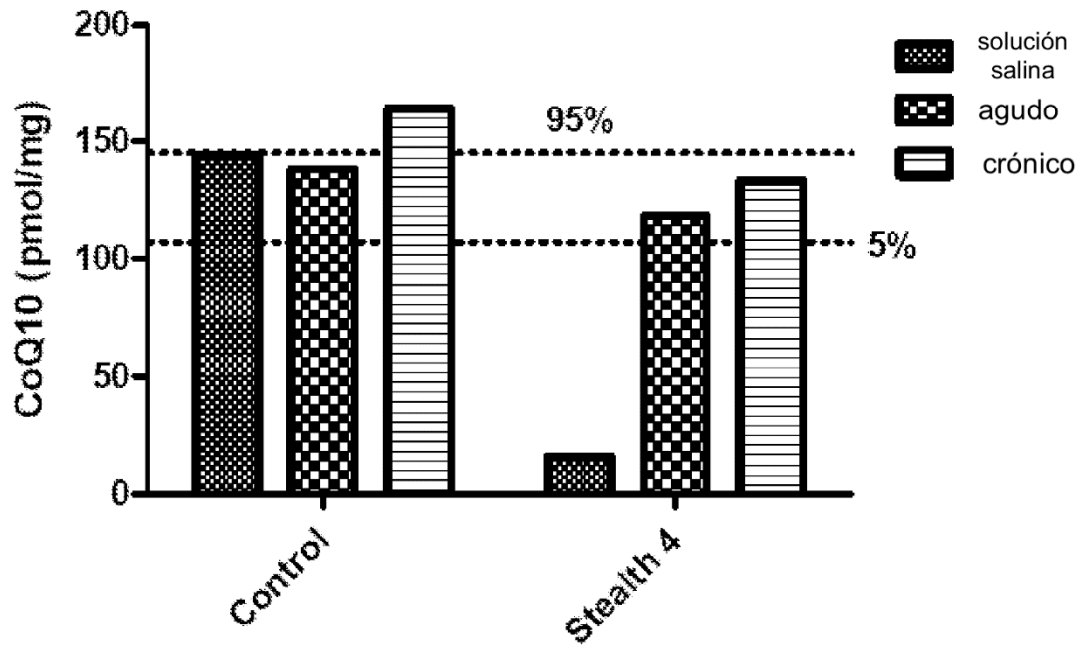


FIG. 3G

Niveles de CoQ10: condiciones de crecimiento normales



Niveles de CoQ10: Inhibición de glicólisis



[illegible]

FIG. 5

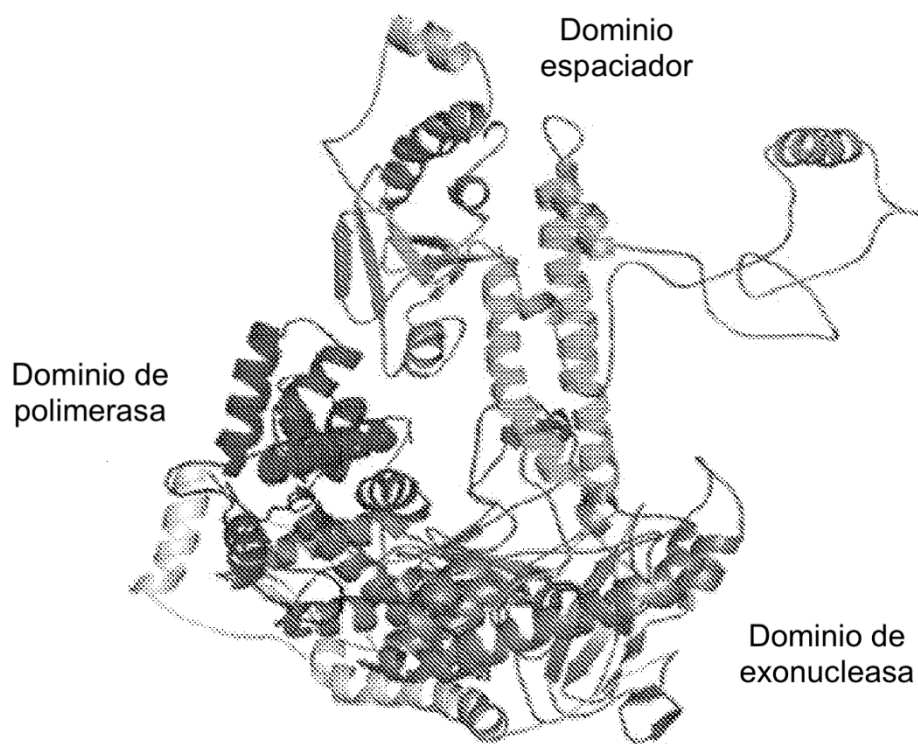


FIG. 6

