

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/03 (2015.01) **A61K 38/07** (2015.01)
C07K 5/00 (2015.01) **C07K 5/10** (2015.01)
C07K 5/11 (2015.01) **C07K 5/103** (2015.01)
C07K 5/117 (2015.01) **C07K 5/107** (2015.01)

(22) Data de pedido: **2004.02.03**

(30) Prioridade(s): **2003.02.04 US 444777 P**
2004.01.08 US 535690 P

(43) Data de publicação do pedido: **2013.10.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.05.20**
172/2015

(73) Titular(es):

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
395 PINE TREE ROAD, SUITE 310 ITHACA, NY
14850 US
CLINICAL RESEARCH INSTITUTE OF
MONTREAL CA

(72) Inventor(es):

HAZEL H. SZETO US
KESHENG ZHAO US
PETER W. SCHILLER CA

(74) Mandatário:

FERNANDO ANTÓNIO FERREIRA MAGNO
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º 1200-195 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÕES DE PÉPTIDO AROMÁTICO CATIONICO**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO REFERE-SE A UM PÉPTIDO AROMÁTICO CATIONICO ESPECÍFICO QUE É ÚTIL EM APLICAÇÕES CLÍNICAS TAIS COMO PARA AUMENTAR A CONTRACTILIDADE CARDÍACA NUM INDIVÍDUO E INIBIR O ATORDOAMENTO CARDÍACO NUM INDIVÍDUO. O PÉPTIDO PODE TAMBÉM SER UTILIZADO PARA MELHORAR A CONSERVAÇÃO DE UM ÓRGÃO REMOVIDO.

RESUMO

"Utilizações de péptido aromático catiónico"

O presente invento refere-se a um péptido aromático catiónico específico que é útil em aplicações clínicas tais como para aumentar a contractilidade cardíaca num indivíduo e inibir o atordoamento cardíaco num indivíduo. O péptido pode também ser utilizado para melhorar a conservação de um órgão removido.

DESCRIÇÃO

"Utilizações de péptido aromático catiónico"

ANTECEDENTES DO INVENTO

As mitocôndrias existem em praticamente todas as células eucarióticas e são essenciais para a sobrevivência celular através da produção de trifosfato de adenosina (ATP) por fosforilação oxidativa. A interrupção desta função vital pode conduzir a morte celular.

As mitocôndrias também desempenham um papel importante na regulação do cálcio intracelular através da acumulação de cálcio (Ca^{2+}). A acumulação de cálcio tem lugar na matriz mitocondrial através de um uniporter acionado pelo potencial de membrana.

A captação de cálcio ativa as desidrogenases mitocondriais e poderá ser importante para manter a produção de energia e a fosforilação oxidativa. Além disso, as mitocôndrias funcionam como um reservatório para o Ca^{2+} citosólico em excesso, protegendo assim a célula de uma sobrecarga de Ca^{2+} e de morte necrótica.

A isquemia ou a hipoglicemia podem conduzir a disfunção mitocondrial, incluindo hidrólise do ATP e sobrecarga de Ca^{2+} . A disfunção causa transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). A TPM é caracterizada por desacoplamento da fosforilação oxidativa, perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento da permeabilidade da membrana interna e intumescimento.

Adicionalmente, o espaço intermembranar da mitocôndria é um reservatório de proteínas apoptogénicas. Deste modo, a perda do potencial mitocondrial e a TPM podem levar a uma libertação de proteínas apoptogénicas para o citoplasma. Sem surpresa, existem indícios crescentes de que a TPM está envolvida na morte celular necrótica e apoptótica (Crompton, *Biochem J.* 341:233-249, 1999). As formas mais moderadas de injúria celular poderão conduzir a apoptose em vez de necrose.

A ciclosporina pode inibir a TPM. O bloqueio da TPM pela ciclosporina A pode inibir a apoptose em vários tipos de células, incluindo as células submetidas a isquemia, hipoxia, sobrecarga de Ca^{2+} e stress oxidativo (Kroemer *et al.*, *Annu Rev Physiol.* 60:619-642, 1998).

A ciclosporina A, contudo, é tudo menos ideal como medicamento para tratamento contra a morte celular necrótica e apoptótica. Por exemplo, a ciclosporina A não visa especificamente as mitocôndrias. Além disso, é fracamente entregue no cérebro. Adicionalmente, a utilidade da ciclosporina A é reduzida pela sua atividade imunossupressora.

O tetrapéptido [Dmt¹]DALDA (2',6'-dimetiltirosina-D-Arg-Phe-Lys-NH₂; SS-02) possui um peso molecular de 640 e transporta uma carga efetiva 3+ a pH fisiológico. O péptido [Dmt¹]DALDA penetra facilmente a membrana plasmática de vários tipos de células de mamífero de uma forma independente de energia (Zhao *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* 304:425-432, 2003) e penetra a barreira hematoencefálica (Zhao *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther.* 302:188-196, 2002). Embora tenha sido demonstrado que o péptido [Dmt¹]DALDA é um agonista potente dos recetores opioides μ , a sua utilidade não foi ampliada para incluir a inibição da TPM.

Assim, há necessidade de inibir a TPM em condições como a isquemia-reperfusão, a hipoxia, a hipoglicemia e outras doenças e condições que originam alterações patológicas em resultado da ocorrência da transição de permeabilidade das membranas mitocondriais. Tais doenças e condições incluem muitas das doenças neurodegenerativas comuns.

Rigobello M P *et al.*, num artigo intitulado "Effect of polycation peptides on mitochondrial permeability transition", publicado em *Biochemical & Biophysical Research Communications*, vol. 217, no. 1, 1995, pp. 144-149, descrevem tetrapéptidos catiónicos e o seu efeito no intumescimento mitocondrial e na libertação de glutatona.

Wu D *et al.*, num artigo intitulado "A highly potent peptide analgesic that protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial stunning", publicado em *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, The American Physiological Society, US, vol. 283, 9 May 2002 (2002-05-09), páginas H783-H791, descrevem DMT-DALDA e a sua atividade protetora contra o atordoamento do miocárdio induzido por isquemia.

Berezowska I *et al.*, num artigo intitulado "Highly potent fluorescent analogues of the opioid peptide [Dmt¹]DALDA", publicado em *Peptides*, Elsevier, Amsterdam, vol. 24, 1 January 2003 (2003-01-01), páginas 1195-1200, descrevem análogos fluorescentes de [Dmt¹]-DALDA.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona um péptido aromático catiónico para utilização no aumento da força contráctil cardíaca em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, em que o péptido aromático catiónico possui a fórmula D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH

O presente invento também proporciona um péptido aromático catiónico para utilização na inibição do atordoamento cardíaco em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, em que o péptido aromático catiónico possui a fórmula D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Internalização e acumulação celular de [Dmt¹]DALDA (SS-02) em mitocôndrias. (A) A captação mitocondrial de SS-19 foi determinada utilizando espectrofotometria de fluorescência (ex/em = 320/420 nm). A adição de mitocôndrias isoladas do fígado de ratinhos (0,35 mg/ml) resultou em supressão (*quenching*) imediata da intensidade de fluorescência de SS-19 (*linha cinzenta*). O pré-tratamento das mitocôndrias com FCCP (1,5 µM) reduziu a

supressão em <20% (*linha preta*). (B) As mitocôndrias isoladas foram incubadas com [³H]SS-02 a 37°C durante 2 min. A captação foi parada por centrifugação (16000 x g) durante 5 min a 4°C e a radioatividade foi determinada no depósito. O pré-tratamento das mitocôndrias com FCCP inibiu a captação de [³H]SS-02 em ~20%. Os resultados são apresentados como média ± e.p.; n = 3. *, P<0,05 pelo teste t de Student. (C) A captação de TMRM pelas mitocôndrias isoladas é perdida com o intumescimento mitocondrial induzido por alameticina, enquanto a captação de SS-19 é, em larga medida, conservada. *Linha preta*, TMRM; *linha vermelha*, SS-19. (D) A adição de SS-02 (200 µM) a mitocôndrias isoladas não alterou o potencial mitocondrial medido através da fluorescência de TMRM. A adição de FCCP (1,5 µM) causou uma despolarização imediata, ao passo que o Ca²⁺ (150 µM) resultou em despolarização e início progressivo da TPM.

Figura 2. [Dmt¹]DALDA (SS-02) protege contra a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) induzida pela sobrecarga de Ca²⁺ e pelo ácido 3-nitropropiónico (3NP). (A) O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com SS-02 10 µM (adição indicada pela seta descendente) preveniu o início da TPM causada pela sobrecarga de Ca²⁺ (seta ascendente). *Linha preta*, tampão; *linha vermelha*, SS-02. (B) O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com SS-02 aumentou a tolerância mitocondrial a múltiplas adições de Ca²⁺ antes do início da TPM. A seta indica a adição de tampão ou de SS-02. *Linha 1*, tampão; *linha 2*, SS-02 50 µM; *linha 3*, SS-02 100 µM. (C) O SS-02 atrasou de uma forma dose-dependente o início da TPM causada por 3NP 1 mM. A seta indica a adição de tampão ou de SS-02. *Linha 1*, tampão; *linha 2*, SS-02 0,5 µM; *linha 3*, SS-02 5 µM; *linha 4*, SS-02 50 µM.

Figura 3. [Dmt¹]DALDA (SS-02) inibe o intumescimento mitocondrial e a libertação de citocromo c. (A) O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com SS-02 inibiu de uma forma dose-dependente o intumescimento mitocondrial induzido por Ca²⁺ 200 µM de uma forma dose-dependente. O intumescimento foi medido através da absorvância a 540 nm. (B) O SS-02 inibiu a libertação de citocromo c induzida por Ca²⁺ a partir das mitocôndrias isoladas. A quantidade de citocromo c libertada foi expressa como uma percentagem do

citocromo c total nas mitocôndrias. Os resultados são apresentados como média \pm e.p., n = 3. (C) O SS-02 também inibiu o intumescimento mitocondrial induzido por MPP^+ (300 μ M).

Figura 4. D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) inibe o intumescimento mitocondrial e a libertação de citocromo c. (A) O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com SS-31 (10 μ M) previne o início da TPM induzida por Ca^{2+} . *Linha cinzenta*, tampão; *linha vermelha*, SS-31. (B) O pré-tratamento das mitocôndrias com SS-31 (50 μ M) inibiu o intumescimento mitocondrial induzido por Ca^{2+} 200 nM. O intumescimento foi medido por dispersão de luz medida a 570 nm. (C) Comparação de SS-02 e de SS-31 com a ciclosporina (CsA) na inibição do intumescimento mitocondrial e da libertação de citocromo c induzidos por Ca^{2+} . A quantidade de citocromo c libertada foi expressa como uma percentagem do citocromo c total nas mitocôndrias. Os resultados são apresentados como média \pm e.p., n = 3.

Figura 5. [Dmt¹]DALDA (SS-02) e D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) protegem a força contráctil do miocárdio durante a isquemia-reperfusão do coração perfundido e isolado de porquinhos-da-índia. Os corações foram perfundidos com tampão ou com tampão contendo SS-02 (100 nM) ou SS-31 (1 nM) durante 30 min e depois foram submetidos a isquemia global durante 30 min. A reperfusão foi efetuada utilizando a mesma solução da perfusão. Obtiveram-se diferenças significativas entre os três grupos de tratamento (ANOVA com dois fatores, $P < 0,001$).

Figura 6. A adição de [Dmt¹]DALDA a solução cardioplégica aumentou significativamente a função contráctil após isquemia prolongada do coração perfundido e isolado de porquinhos-da-índia. Após uma estabilização de 30 min, os corações foram perfundidos com solução cardioplégica de St. Thomas (SCP) ou com SCP contendo [Dmt¹]DALDA a 100 nM durante 3 min. A isquemia global foi depois induzida por interrupção total da perfusão coronária durante 90 min. A reperfusão foi subsequentemente realizada durante 60 min com solução de Krebs-Henseleit oxigenada. A força contráctil pós-isquémica foi significativamente melhorada no grupo que recebeu [Dmt¹]DALDA ($P < 0,001$).

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

O invento baseia-se na constatação surpreendente efetuada pelos inventores de que determinados péptidos aromáticos catiónicos reduzem significativamente o número de mitocôndrias submetidas a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), ou previnem mesmo totalmente a ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial. A redução do número de mitocôndrias submetidas a TPM, e a prevenção da ocorrência da TPM, é importante, uma vez que a TPM está associada a várias doenças e condições comuns nos mamíferos. Além disso, um órgão removido de um mamífero é sensível a TPM. Estas doenças e condições têm uma importância clínica particular, pois atingem uma grande proporção da população humana em algum momento das suas vidas.

Péptidos

O péptido aromático catiónico utilizado no presente invento é solúvel em água e altamente polar. Apesar destas propriedades, o péptido pode penetrar facilmente as membranas celulares.

Alguns péptidos possuem atividade agonista do recetor opioide mu (isto é, ativam o recetor opioide mu). A ativação do recetor opioide mu desencadeia tipicamente um efeito analgésico.

Em determinadas circunstâncias, um péptido aromático catiónico possuindo atividade para o recetor opioide mu pode ser útil. Por exemplo, durante um tratamento de curta duração, como acontece com uma doença ou uma condição aguda, poderá ser benéfico utilizar um péptido aromático catiónico que ative o recetor opioide mu. Tais doenças e condições agudas estão muitas vezes associadas a dor moderada ou intensa. Nestes casos, o efeito analgésico do péptido aromático catiónico poderá ser benéfico no regime de tratamento do doente ou de outro mamífero, embora um péptido aromático catiónico que não ative o recetor opioide mu também possa ser utilizado, com ou sem um analgésico de acordo com os requisitos clínicos.

Alternativamente, em outras circunstâncias, um péptido aromático catiónico que não possui atividade para o recetor opioide mu pode ser útil. Por exemplo, durante um tratamento de longa duração, como acontece com uma doença ou uma condição crónica, a utilização de um péptido aromático catiónico que ativa o recetor opioide mu pode ser contraindicada. Nestas circunstâncias os efeitos potencialmente adversos ou de habituação do péptido aromático catiónico podem impedir a utilização de um péptido aromático catiónico que ativa o recetor opioide mu no regime de tratamento de um doente humano ou de outro mamífero.

Os potenciais efeitos adversos poderão incluir sedação, obstipação e depressão respiratória. Nestas circunstâncias um péptido aromático catiónico que não ativa o recetor opioide mu pode constituir um tratamento apropriado.

Os exemplos de condições agudas incluem o ataque cardíaco, o acidente vascular cerebral e as lesões traumáticas. As lesões traumáticas poderão incluir a lesão traumática do cérebro e da medula espinal.

Os exemplos de doenças ou condições crónicas incluem a doença das artérias coronárias e quaisquer distúrbios neurodegenerativos, como aqueles descritos abaixo.

Um exemplo de um péptido que tem atividade para o recetor opioide mu é um que possui a fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (isto é, Dmt¹-DALDA, que é aqui designado por SS-02).

O péptido aromático catiónico que é utilizado de acordo com o presente invento não possui atividade para o recetor opioide mu e tem a fórmula D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂ (designado neste fascículo por SS-31).

Métodos de tratamento

O péptido descrito pode ser útil no tratamento de qualquer doença ou condição que esteja associada à TPM. Tais doenças e condições incluem, embora não lhes estejam

limitadas, a isquemia e/ou a reperfusão de um tecido ou de um órgão, a hipoxia e qualquer uma de várias doenças neurodegenerativas. Os mamíferos necessitados de tratamento ou de prevenção da TPM são aqueles mamíferos que sofrem destas doenças ou condições. No presente invento, porém, o péptido destina-se a utilização, especificamente, para (a) aumentar a força contráctil cardíaca em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, ou (b) inibir o atordoamento cardíaco em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, em que o péptido aromático catiónico possui a fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.

A isquemia de um tecido ou de um órgão de um mamífero é uma condição patológica multifacetada que é causada por privação de oxigénio (hipoxia) e/ou privação de glucose (por exemplo, substrato). A privação de oxigénio e/ou glucose nas células de um tecido ou órgão conduz a uma redução ou uma perda total da capacidade de geração de energia e à consequente perda da função de transporte ativo de iões através das membranas celulares. A privação de oxigénio e/ou glucose também conduz a alterações patológicas em outras membranas celulares, incluindo a transição de permeabilidade nas membranas mitocondriais. Além disso, outras moléculas, como as proteínas apoptóticas normalmente compartimentalizadas no interior das mitocôndrias, poderão sofrer fugas para o citoplasma e causar morte celular apoptótica. A isquemia profunda pode conduzir a morte celular necrótica.

A isquemia ou hipoxia de um tecido ou de um órgão particular poderá ser causada por uma perda ou uma diminuição importante do suprimento sanguíneo para o tecido ou o órgão. A perda ou diminuição importante do suprimento sanguíneo poderá dever-se, por exemplo, a acidente vascular cerebral tromboembólico, a aterosclerose coronária ou a doença vascular periférica. O tecido afetado por isquemia ou hipoxia é tipicamente o músculo, como o músculo cardíaco, esquelético ou liso.

O órgão afetado por isquemia ou hipoxia poderá ser qualquer órgão que esteja sujeito a isquemia ou hipoxia. Os exemplos de órgãos afetados por isquemia ou hipoxia incluem o cérebro, o coração, o rim e a próstata. Por exemplo, a isquemia ou hipoxia do músculo cardíaco é habitualmente causada por bloqueios ateroscleróticos ou trombóticos que conduzem a uma redução ou perda do aporte de oxigénio aos tecidos cardíacos pelo suprimento de sangue arterial e capilar cardíaco. Esta isquemia ou hipoxia cardíaca poderá causar dor e necrose do músculo cardíaco afetado e, no final, poderá conduzir a falência cardíaca.

A isquemia ou hipoxia do músculo-esquelético ou do músculo liso poderá resultar de causas similares. Por exemplo, a isquemia ou hipoxia do músculo liso intestinal ou do músculo-esquelético dos membros também poderá ser causada por bloqueios ateroscleróticos ou trombóticos.

A reperfusão é a restauração do fluxo sanguíneo para qualquer órgão ou tecido em que o fluxo de sangue esteja diminuído ou bloqueado. Por exemplo, o fluxo sanguíneo pode ser restaurado para qualquer órgão ou tecido afetado por isquemia ou hipoxia. A restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão) pode ocorrer por qualquer método conhecido pelos peritos. Por exemplo, a reperfusão dos tecidos cardíacos isquémicos poderá resultar de angioplastia, *bypass* da artéria coronária com enxerto ou a utilização de fármacos trombolíticos.

O péptido também pode ser utilizado no tratamento ou na profilaxia de doenças neurodegenerativas associadas à TPM. As doenças neurodegenerativas associadas à TPM incluem, por exemplo, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica (ELA, também conhecida como doença de Lou Gherig). O péptido pode ser utilizado para atrasar o início ou retardar a progressão destas e de outras doenças neurodegenerativas associadas à TPM. O péptido pode ser particularmente útil no tratamento de seres humanos que sofrem das fases precoces de doenças neurodegenerativas associadas à TPM e nos seres humanos com predisposição para estas doenças.

O péptido também poderá ser administrado a um mamífero que está a tomar um medicamento para tratar uma condição ou uma doença. Caso um efeito secundário do medicamento inclua a TPM, os mamíferos que tomam tais medicamentos beneficiariam grandemente do péptido.

Um exemplo de um medicamento que induz toxicidade celular por causar TPM é o medicamento de quimioterapia Adriamicina.

Síntese do péptido

O péptido útil no presente invento poderá ser sintetizado quimicamente por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica. Os métodos adequados para sintetizar a proteína incluem, por exemplo, aqueles descritos por Stuart e Young em "Solid Phase Peptide Synthesis," Second Edition, Pierce Chemical Company (1984) e em "Solid Phase Peptide Synthesis" Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, New York (1997).

Modos de administração

O péptido útil no presente invento é administrado a um mamífero numa quantidade eficaz para reduzir o número de mitocôndrias submetidas a TPM, ou prevenir a ocorrência de TPM. A quantidade eficaz é determinada durante os ensaios pré-clínicos e os ensaios clínicos por métodos familiares aos médicos e aos clínicos.

Uma quantidade eficaz de um péptido útil no presente invento, preferencialmente numa composição farmacêutica, poderá ser administrada a um mamífero disso necessitado por meio de qualquer um de vários métodos de administração de compostos farmacêuticos bem conhecidos.

O péptido poderá ser administrado sistémica ou localmente. Numa concretização, o péptido é administrado intravenosamente. Por exemplo, o péptido aromático catiónico do presente invento poderá ser administrado por via de injeção intravenosa rápida em *bolus*. De preferência, contudo,

o péptido é administrado como uma infusão intravenosa a velocidade constante.

O péptido pode ser injetado diretamente na artéria coronária durante, por exemplo, a angioplastia ou a cirurgia de *bypass* coronário, ou pode ser aplicado em *stents* coronários.

O péptido também poderá ser administrado oralmente, topicamente, intranasalmente, intramuscularmente, subcutaneamente ou transdermicamente. Numa concretização preferida, a administração transdérmica do péptido aromático catiónico é por iontoforese, em que o péptido carregado é entregue através da pele por uma corrente elétrica.

Outras vias de administração incluem as vias intracerebroventricular ou intratecal. A administração intracerebroventricular refere-se à administração no sistema ventricular do cérebro. A administração intratecal refere-se à administração no espaço sob a membrana aracnoide da medula espinal. Assim, a administração intracerebroventricular ou intratecal poderá ser preferida para aquelas doenças e condições que afetam os órgãos ou os tecidos do sistema nervoso central. Numa concretização preferida, a administração intratecal é utilizada para as lesões traumáticas da medula espinal.

O péptido útil no invento também poderá ser administrado aos mamíferos por libertação prolongada, como é conhecida na técnica. A administração por libertação prologada é um método de entrega de medicamentos que permite obter um determinado nível do medicamento ao longo de um período de tempo particular. O nível é normalmente medido através da concentração sérica ou plasmática.

Qualquer formulação conhecida na técnica da farmácia é adequada para administração do péptido aromático catiónico útil no presente invento. No caso da administração oral, é possível utilizar formulações líquidas ou sólidas. Alguns exemplos de formulações incluem as pastilhas, as cápsulas de gelatina, os comprimidos, os trociscos, os elixires, as suspensões, os xaropes, as hóstias, a pastilha elástica e

similares. O péptido pode ser misturado com um veículo ou um excipiente farmacêutico adequado conforme entendido pelos executantes na técnica. Os exemplos de veículos e excipientes incluem o amido, o leite, o açúcar, determinados tipos de argila, a gelatina, o ácido láctico, o ácido esteárico ou seus sais, incluindo o estearato de magnésio ou de cálcio, o talco, os óleos ou gorduras vegetais, as gomas e os glicóis.

No caso da administração sistêmica, intracerebroventricular, intratecal, tópica, intranasal, subcutânea ou transdérmica, as formulações do péptido aromático catiónico útil no presente invento poderão utilizar diluentes, veículos, excipientes, etc. convencionais, conforme conhecidos na técnica, para entregar os péptidos. Por exemplo, as formulações poderão compreender um ou mais dos seguintes elementos: um agente de estabilização, um tensoativo, preferencialmente um tensoativo não iônico, e opcionalmente um sal e/ou um agente tampão. O péptido poderá ser entregue na forma de uma solução aquosa ou numa forma liofilizada.

O agente de estabilização poderá ser, por exemplo, um aminoácido como, por exemplo, a glicina; ou um oligossacárido como, por exemplo, a sacarose, a tetralose, a lactose ou um dextrano. Em alternativa, o agente de estabilização poderá ser um açúcar-álcool como, por exemplo, o manitol; ou uma combinação destes. Preferencialmente, o agente de estabilização ou a combinação de agentes de estabilização constitui cerca de 0,1% a cerca de 10% em peso por peso do péptido.

O tensoativo é preferencialmente um tensoativo não iônico, tal como um polissorbato. Alguns exemplos de tensoativos adequados incluem o Tween20, o Tween80; ou um polietilenoglicol ou polioxietileno-polioxipropilenoglicol, como o Pluronic F-68, numa quantidade entre cerca de 0,001% (p/v) e cerca de 10% (p/v).

O sal ou agente tampão poderá ser qualquer sal ou agente tampão como, por exemplo, o cloreto de sódio ou o fosfato de sódio/potássio, respetivamente. De preferência, o agente tampão mantém o pH da composição farmacêutica no intervalo

entre cerca de 5,5 e cerca de 7,5. O sal e/ou o agente tampão também é útil para manter a osmolalidade num nível apropriado para administração a um ser humano ou um animal. Preferencialmente, o sal ou o agente tampão está presente numa concentração aproximadamente isotónica de cerca de 150mM a cerca de 300mM.

As formulações do péptido útil no presente invento poderão conter adicionalmente um ou mais aditivos convencionais. Alguns exemplos destes aditivos incluem um agente de solubilização como, por exemplo, o glicerol; um antioxidante como, por exemplo, o cloreto de benzalcónio (uma mistura de compostos de amónio quaternário conhecidos como "quats"), o álcool benzílico, a cloretona ou o clorobutanol; um agente anestésico como, por exemplo, um derivado de morfina; ou um agente isotónico, etc. como descrito acima. Como precaução adicional contra a oxidação ou outro tipo de degradação, as composições farmacêuticas poderão ser armazenadas sob azoto em frascos selados com rolhas impermeáveis.

O mamífero pode ser qualquer mamífero, incluindo, por exemplo, animais de quinta, como ovelhas, porcos, vacas e cavalos; animais domésticos, como cães e gatos; e animais de laboratório, como ratos, ratinhos e coelhos. Numa concretização preferida, o mamífero é um ser humano.

EXEMPLOS

Os exemplos 1 a 7 e 10 utilizando o composto [Dmt¹]DALDA (SS-02) são meramente para referência e não fazem parte do presente invento.

Exemplo 1: [Dmt¹]DALDA penetra a membrana celular.

A captação celular de [³H][Dmt¹]DALDA foi estudada utilizando uma linha celular de epitélio intestinal humano (Caco-2) e confirmada com as células SH-SY5Y (célula de neuroblastoma humano), HEK293 (célula de rim embrionário humano) e CRFK (célula epitelial renal). As monocamadas das células foram crescidas em placas de 12 poços

(5×10^5 células/poço) revestidas com colagénio durante 3 dias. No 4º dia, as células foram lavadas duas vezes com solução HBSS previamente aquecida e depois foram incubadas com 0,2 ml de solução HBSS contendo [^3H][Dmt¹]DALDA 250nM a 37°C ou a 4°C, durante períodos de tempo variáveis até 1 h.

O péptido [^3H][Dmt¹]DALDA foi observado no lisado celular logo aos 5 min, e os níveis de estado estacionário foram obtidos aos 30 min. A quantidade total de [^3H][Dmt¹]DALDA recuperada no lisado celular após 1 h de incubação representou cerca de 1% do fármaco total. A captação de [^3H][Dmt¹]DALDA foi mais lenta a 4°C em comparação com 37°C, mas atingiu 76,5% aos 45 min e 86,3% à 1 h. A internalização de [^3H][Dmt¹]DALDA não ficou limitada às células Caco-2, tendo sido também observada nas células SH-SY5Y, HEK293 e CRFK. A concentração intracelular de [Dmt¹]DALDA foi estimada como sendo cerca de 50 vezes mais elevada que a concentração extracelular.

Numa experiência separada, as células foram incubadas com uma gama de concentrações de [Dmt¹]DALDA (1 μM - 3 mM) durante 1 h a 37°C. No final do período de incubação, as células foram lavadas 4 vezes com solução HBSS e adicionaram-se 0,2 ml de NaOH 0,1N contendo SDS a 1% a cada poço. Os conteúdos celulares foram depois transferidos para frascos de cintilação e a radioatividade foi contada. Para distinguir a radioatividade internalizada da radioatividade associada à superfície, incluiu-se um passo de lavagem ácida. Antes da lise celular, as células foram incubadas com 0,2 ml de ácido acético 0,2 M/NaCl 0,05 M durante 5 min em gelo.

A captação de [Dmt¹]DALDA para o interior das células Caco-2 foi confirmada por microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) utilizando um análogo fluorescente de [Dmt¹]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-dnsDap-NH₂; em que dnsDap = ácido -dansil-1- , -diaminopropiónico). As células foram crescidas da forma descrita acima e foram plaqueadas em placas de fundo de vidro (35 mm) (MatTek Corp., Ashland, Massachusetts) durante 2 dias. O meio foi depois removido, e as células foram incubadas com 1 ml de solução HBSS contendo 0,1 μM a 1,0 μM do análogo fluorescente do péptido a 37°C durante 1 h. As células foram depois lavadas três vezes com solução HBSS

gelada e cobertas com 200 μ l de PBS. A microscopia foi efetuada no espaço de 10 min à temperatura ambiente, utilizando um microscópio confocal de varrimento laser Nikon com uma objetiva C-Apochromat 63x/1.2W Corr. A excitação foi realizada a 340 nm por meio de um laser UV e a emissão foi medida a 520 nm. Para o seccionamento ótico na direção z, efetuaram-se 5-10 planos com 2,0 μ m.

A microscopia confocal de varrimento laser confirmou a captação de Dmt-D-Arg-Phe-dnsDap-NH₂ fluorescente para o interior das células Caco-2, após incubação com [Dmt¹,DnsDap⁴]DALDA 0,1 μ M durante 1 h a 37°C. A captação do péptido fluorescente foi similar a 37°C e a 4°C. A fluorescência mostrou-se difusa em todo o citoplasma mas foi completamente excluída do núcleo.

Exemplo 2: Direcionamento de [Dmt¹]DALDA para as mitocôndrias.

Para analisar a distribuição subcelular de [Dmt¹]DALDA, preparou-se o análogo fluorescente [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA (Dmt-D-Arg-Phe-atnDap-NH₂; em que atn = ácido -antranoil-1- , -diaminopropiônico). O análogo continha ácido -antranoil-1- , -diaminopropiônico em vez do resíduo de lisina na posição 4. As células foram crescidas da forma descrita no Exemplo 1 e foram plaqueadas em placas de fundo de vidro (35 mm) (MatTek Corp., Ashland, Massachusetts) durante 2 dias. O meio foi depois removido, e as células foram incubadas com 1 ml de solução HBSS contendo [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA 0,1 μ M a 37°C, durante 15 min até 1 h.

As células foram também incubadas com éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM, 25 nM), um corante usado para corar as mitocôndrias, durante 15 min a 37°C. As células foram depois lavadas três vezes com solução HBSS gelada e cobertas com 200 μ l de PBS. A microscopia foi efetuada no espaço de 10 min à temperatura ambiente, utilizando um microscópio confocal de varrimento laser Nikon com uma objetiva C-Apochromat 63x/1.2W Corr.

No caso de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA, a excitação foi realizada a 350 nm por meio de um laser UV e a emissão foi

medida a 520 nm. No caso de TMRM, a excitação foi realizada a 536 nm e a emissão foi medida a 560 nm.

A microscopia confocal de varrimento laser mostrou a captação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA fluorescente para o interior das células Caco-2, após incubação durante um período de apenas 15 min a 37°C. A captação do corante foi completamente excluída do núcleo, mas o corante azul revelou uma distribuição raiada no citoplasma. As mitocôndrias foram marcadas a vermelho com TMRM. A distribuição de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA para as mitocôndrias foi demonstrada pela sobreposição da distribuição de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA com a distribuição de TMRM.

Exemplo 3: Captação de [Dmt¹]DALDA para o interior das mitocôndrias.

Para isolar as mitocôndrias do fígado de ratinhos, os ratinhos foram sacrificados por decapitação. O fígado foi removido e colocado rapidamente em meio para homogeneização de fígado gelado. O fígado foi cortado em pequenos pedaços com uma tesoura e depois foi homogeneizado à mão utilizando um homogeneizador de vidro.

O homogenato foi centrifugado durante 10 min a 1000xg, a 4°C. O sobrenadante foi aspirado, transferido para tubos de policarbonato e novamente centrifugado durante 10 min a 3000xg, 4°C. O sobrenadante resultante foi removido, e os lípidos gordos na parede lateral do tubo foram cuidadosamente limpos.

O depósito foi ressuspensão em meio de homogenato de fígado e a homogeneização foi repetida duas vezes. O depósito mitocondrial purificado final foi ressuspensão em meio. A concentração de proteína na preparação mitocondrial foi determinada pelo procedimento de Bradford.

Aproximadamente 1,5 mg de mitocôndrias em 400 µl de tampão foram incubadas com [³H][Dmt¹]DALDA durante 5-30 min a 37°C. As mitocôndrias foram depois depositadas por centrifugação, e a quantidade de radioatividade foi determinada na fração mitocondrial e na fração do tampão.

Assumindo um volume da matriz mitocondrial de 0,7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de proteína (Lim *et al.*, *J Physiol* 545:961-974, 2002), verificou-se que a concentração de [^3H][Dmt¹]DALDA nas mitocôndrias foi 200 vezes mais elevada que no tampão. Assim, [Dmt¹]DALDA está concentrado nas mitocôndrias.

Com base nestes resultados, é possível estimar a concentração de [Dmt¹]DALDA nas mitocôndrias quando os corações isolados de porquinhos-da-índia foram perfundidos com [Dmt¹]DALDA:

Concentração de [Dmt ¹]DALDA no perfusado coronário	0,1 μM
Concentração de [Dmt ¹]DALDA no miócito	5 μM
Concentração de [Dmt ¹]DALDA nas mitocôndrias	1,0 mM

Exemplo 4: Acumulação de [Dmt¹]DALDA por mitocôndrias isoladas (Fig. 1).

Para demonstrar adicionalmente que [Dmt¹]DALDA é distribuído seletivamente para as mitocôndrias, analisou-se a captação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA e de [^3H][Dmt¹]DALDA para o interior de mitocôndrias isoladas do fígado de ratinhos. A captação rápida de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA foi observada como supressão (*quenching*) imediata da sua fluorescência com a adição das mitocôndrias (Figura 1A). O pré-tratamento das mitocôndrias com FCCP (p-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona do cianeto de carbonilo), um desacoplador que resulta na despolarização imediata das mitocôndrias, só reduziu a captação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA em <20%. Deste modo, a captação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA não foi dependente do potencial.

Para confirmar que o direcionamento para as mitocôndrias não foi um artefacto do fluoróforo, analisou-se também a captação mitocondrial de [^3H][Dmt¹]DALDA. As mitocôndrias isoladas foram incubadas com [^3H][Dmt¹]DALDA e a radioatividade foi determinada no depósito e no sobrenadante mitocondrial. A quantidade de radioatividade no depósito não variou dos 2 min aos 8 min. O tratamento das mitocôndrias com

FCCP só diminuiu a quantidade de [^3H][Dmt¹]DALDA associada ao depósito mitocondrial em ~20% (Figura 1B).

O efeito mínimo de FCCP na captação de [Dmt¹]DALDA sugeriu que o péptido [Dmt¹]DALDA estaria provavelmente associado às membranas mitocondriais ou no espaço intermembranar e não na matriz. Em seguida, analisou-se o efeito do intumescimento mitocondrial na acumulação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA nas mitocôndrias, utilizando alameticina para induzir o intumescimento e a rotura da membrana externa. Ao contrário do TMRM, a captação de [Dmt¹,AtnDap⁴]DALDA foi só parcialmente revertida pelo intumescimento mitocondrial (Fig. 1C). Assim, o péptido [Dmt¹]DALDA está associado às membranas mitocondriais.

Exemplo 5: [Dmt¹]DALDA não altera a respiração nem o potencial mitocondrial (Fig. 1D).

A acumulação de [Dmt¹]DALDA nas mitocôndrias não alterou a função mitocondrial. A incubação das mitocôndrias isoladas do fígado de ratinhos com [Dmt¹]DALDA 100 μM não alterou o consumo de oxigénio durante o estado 3 ou o estado 4 nem a razão de controlo respiratório (estado 3/estado 4) (6,2 versus 6,0). O potencial de membrana mitocondrial foi medido utilizando TMRM (Fig. 1D). A adição das mitocôndrias resultou na supressão (*quenching*) imediata do sinal de TMRM, que foi prontamente revertida pela adição de FCCP, indicando uma despolarização mitocondrial. A adição de Ca^{2+} (150 μM) resultou em despolarização imediata, seguida de perda progressiva da supressão (*quenching*) indicativa de TPM. A adição de [Dmt¹]DALDA sozinho, mesmo a 200 μM , não causou despolarização mitocondrial nem TPM.

Exemplo 6: [Dmt¹]DALDA protege contra a TPM induzida por Ca^{2+} e por ácido 3-nitropropiónico (Fig. 2).

Além de não ter qualquer efeito direto sobre o potencial mitocondrial, o péptido [Dmt¹]DALDA foi capaz de proteger contra a TPM induzida pela sobrecarga de Ca^{2+} . O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com [Dmt¹]DALDA (10 μM), durante 2 min antes da adição de Ca^{2+} , resultou apenas em despolarização momentânea e preveniu o início da TPM (Figura 2A). O péptido [Dmt¹]DALDA aumentou de forma dose-

dependente a tolerância das mitocôndrias a provocações cumulativas de Ca^{2+} . A Figura 2B mostra que o péptido [Dmt¹]DALDA aumentou o número de adições de Ca^{2+} que as mitocôndrias isoladas conseguiam tolerar antes da TPM.

O ácido 3-nitropropiónico (3NP) é um inibidor irreversível da succinato-desidrogenase no complexo II da cadeia de transporte de elétrons. A adição de 3NP (1 mM) a mitocôndrias isoladas causou a dissipação do potencial mitocondrial e o início da TPM (Figura 2C). O pré-tratamento das mitocôndrias com [Dmt¹]DALDA atrasou de forma dose-dependente o início da TPM induzida por 3NP (Figura 2C).

De modo a demonstrar que o péptido [Dmt¹]DALDA pode penetrar as membranas celulares e proteger contra a despolarização mitocondrial desencadeada por 3NP, as células Caco-2 foram tratadas com 3NP (10 mM) na ausência ou na presença de [Dmt¹]DALDA (0,1 μM) durante 4 h e, em seguida, foram incubadas com TMRM e examinadas sob microscopia confocal de varrimento laser. Nas células de controlo, as mitocôndrias são distintamente visualizadas como listras finas em todo o citoplasma. Nas células tratadas com 3NP, a fluorescência de TMRM foi grandemente reduzida, sugerindo uma despolarização generalizada. Em contraste, o tratamento simultâneo com [Dmt¹]DALDA protegeu contra a despolarização mitocondrial causada por 3NP.

Exemplo 7: [Dmt¹]DALDA protege contra o intumescimento mitocondrial e a libertação de citocromo c.

A abertura de poros de TPM resulta em intumescimento mitocondrial. Os efeitos de [Dmt¹]DALDA no intumescimento mitocondrial foram analisados por medição da diminuição da absorvância a 540 nm (A_{540}). A suspensão mitocondrial foi depois centrifugada, e o citocromo c no depósito e no sobrenadante mitocondrial foi determinado por um *kit* de ELISA disponível comercialmente. O pré-tratamento das mitocôndrias isoladas com SS-02 inibiu o intumescimento (Fig. 3A) e a libertação de citocromo c (Fig. 3B) induzidos pela sobrecarga de Ca^{2+} . Além de prevenir a TPM induzida pela sobrecarga de Ca^{2+} , o péptido SS-02 também preveniu o intumescimento mitocondrial induzido por MPP^+ (ião 1-metil-4-

fenilpiridínio), um inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Fig. 3C).

Exemplo 8: D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) pode proteger contra a TPM, o intumescimento mitocondrial e a liberação de citocromo c.

O péptido não opioide SS-31 possui a mesma capacidade de proteção contra a TPM (Fig. 4A), o intumescimento mitocondrial (Fig. 4B) e a liberação de citocromo c (Fig. 4C) induzidos por Ca²⁺. Os métodos para o estudo são conforme descritos acima para SS-02. Neste exemplo, o intumescimento mitocondrial foi medido utilizando a dispersão de luz monitorizada a 570 nm.

Exemplo 9: [Dmt¹]DALDA (SS-02) e D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) protegem contra o atordoamento do miocárdio induzido por isquemia-reperfusão.

Os corações de porquinhos-da-índia foram isolados rapidamente, e a aorta foi canulada *in situ* e perfundida de forma retrógrada com uma solução de Krebs-Henseleit oxigenada (pH 7,4) a 34°C. O coração foi depois excisado, montado num sistema modificado de perfusão de Langendorff e perfundido a pressão constante (40 cm H₂O). A força contráctil foi medida com um pequeno gancho inserido no vértice do ventrículo esquerdo e uma ligadura de seda firmemente ligada a um transdutor de deslocamento-força. O fluxo coronário foi medido através da recolha cronometrada do efluente da artéria pulmonar.

Os corações foram perfundidos com tampão, [Dmt¹]DALDA (SS-02) (100 nM) ou D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) (1 nM) durante 30 min e depois foram submetidos a 30 min de isquemia global. A reperfusão foi efetuada com a mesma solução utilizada antes da isquemia.

A ANOVA com dois fatores revelou diferenças significativas na força contráctil (P<0,001), na frequência cardíaca (P=0,003) e no fluxo coronário (P<0,001) entre os três grupos de tratamento. No grupo de tampão, a força contráctil foi significativamente mais baixa durante a reperfusão em comparação com antes da isquemia (Fig. 5). Os

corações tratados com ambos os péptidos SS-02 e SS-31 toleraram a isquemia muito melhor do que os corações tratados com o tampão (Fig. 5). Em particular, SS-31 proporcionou uma inibição total do atordoamento cardíaco. Além disso, o fluxo coronário é bem mantido ao longo da reperfusão e não ocorreu diminuição da frequência cardíaca.

Exemplo 10: [Dmt¹]DALDA (SS-02) melhora a conservação de órgãos.

No caso de transplante cardíaco, o coração do dador é conservado numa solução cardioplégica durante o transporte. A solução de conservação contém uma quantidade elevada de potássio que, na realidade, impede o coração de bater e conserva a energia. Contudo, o tempo de sobrevivência do coração isolado ainda é bastante limitado.

Analisou-se se o péptido [Dmt¹]DALDA prolonga ou não a sobrevivência dos órgãos. Neste estudo, o péptido [Dmt¹]DALDA foi adicionado a uma solução cardioplégica usada habitualmente (St. Thomas) para determinar se [Dmt¹]DALDA aumenta a sobrevivência do coração após isquemia prolongada (modelo de sobrevivência de órgão *ex vivo*).

Os corações isolados de porquinhos-da-índia foram perfundidos de forma retrógrada com uma solução de Krebs-Henseleit oxigenada a 34°C. Após 30 min de estabilização, os corações foram perfundidos com uma solução cardioplégica SCP (St. Thomas) com ou sem [Dmt¹]DALDA a 100 nM durante 3 min. A isquemia global foi depois induzida através de interrupção completa da perfusão coronária durante 90 min. A reperfusão foi subsequentemente realizada durante 60 min com solução de Krebs-Henseleit oxigenada. A força contráctil, a frequência cardíaca e o fluxo coronário foram monitorizados continuamente ao longo de toda a experiência.

A adição de [Dmt¹]DALDA à solução cardioplégica aumentou significativamente a função contráctil (Fig. 6) após isquemia prolongada.

REIVINDICAÇÕES

1. Péptido aromático catiónico para utilização no aumento da força contráctil cardíaca em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, em que o péptido aromático catiónico possui a fórmula D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH

2. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é utilizado em conjunto com a reperfusão de tecidos cardíacos isquémicos.

3. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a reperfusão de tecidos cardíacos isquémicos compreende angioplastia, *bypass* da artéria coronária com enxerto ou a utilização de fármacos trombolíticos.

4. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o péptido é aplicado em *stents* coronários.

5. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é administrado localmente ou sistemicamente.

6. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o péptido é administrado por via intravenosa, oral, tópica, intranasal, intramuscular, subcutânea, transdérmica ou iontoforética.

7. Péptido aromático catiónico para utilização na inibição do atordoamento cardíaco em tecido cardíaco que está sujeito a, ou está a recuperar de, isquemia, num indivíduo disso necessitado, em que o péptido aromático catiónico possui a fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.

8. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o péptido é utilizado em conjunto com a reperfusão de tecidos cardíacos isquémicos.

9. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a reperfusão de tecidos cardíacos isquémicos compreende angioplastia, *bypass* da artéria coronária com enxerto ou a utilização de fármacos trombolíticos.

10. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 8, em que o péptido é aplicado em *stents* coronários.

11. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o péptido é administrado localmente ou sistemicamente.

12. Péptido para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o péptido é administrado por via intravenosa, oral, tópica, intranasal, intramuscular, subcutânea, transdérmica ou iontoforética.

Lisboa, 2015-08-13

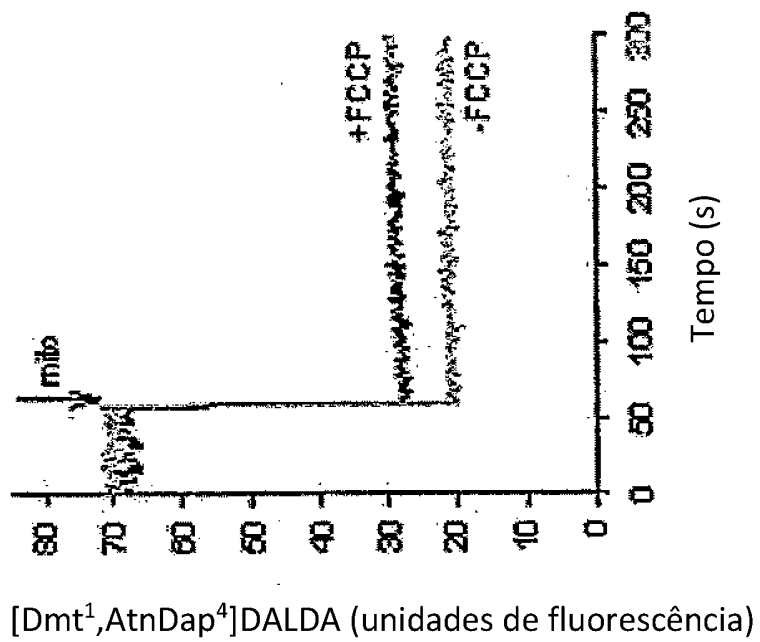


Figura 1A

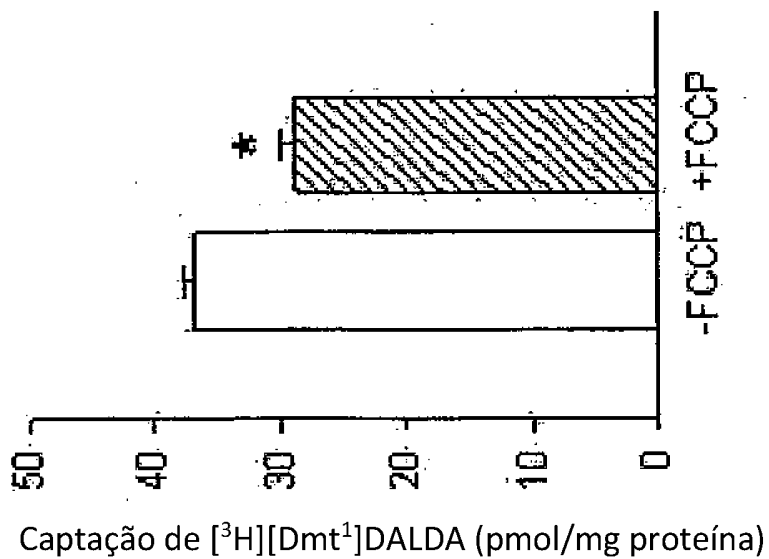


Figura 1B

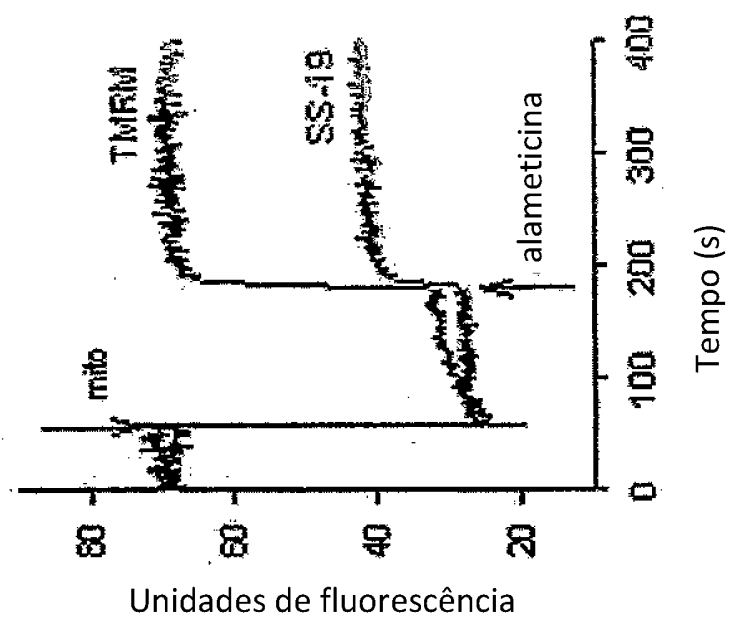


Figura 1C

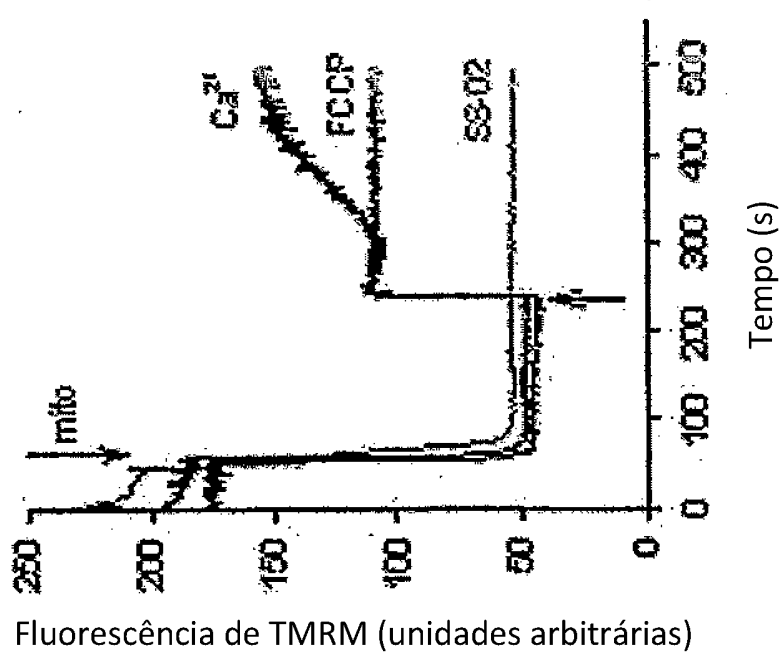


Figura 1D

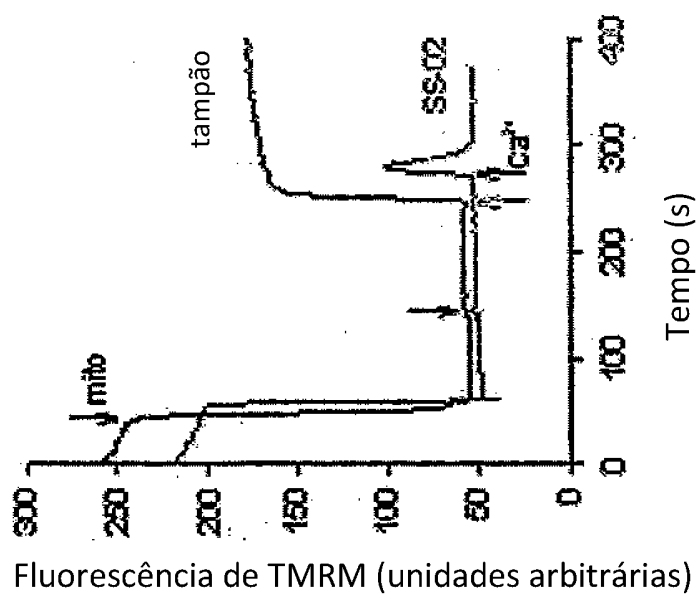


Figura 2A

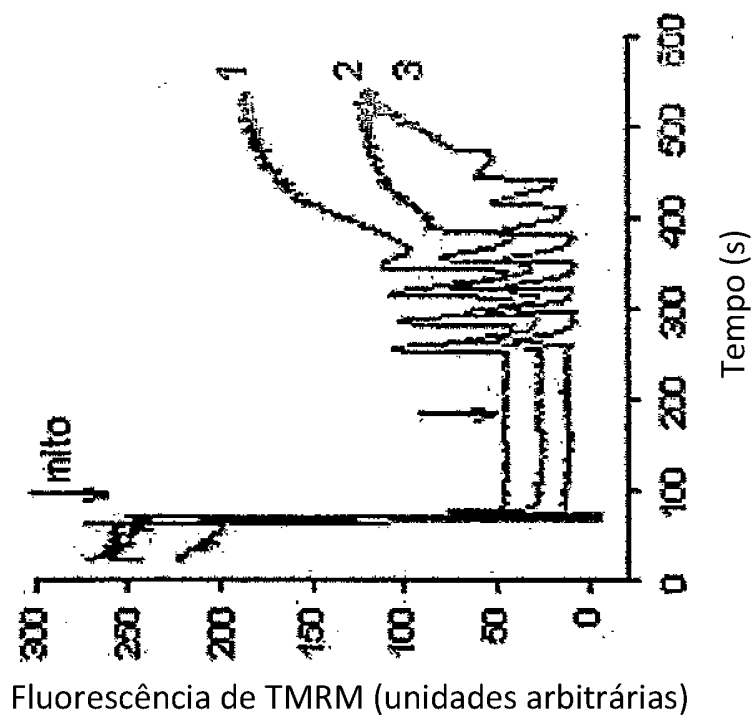


Figura 2B

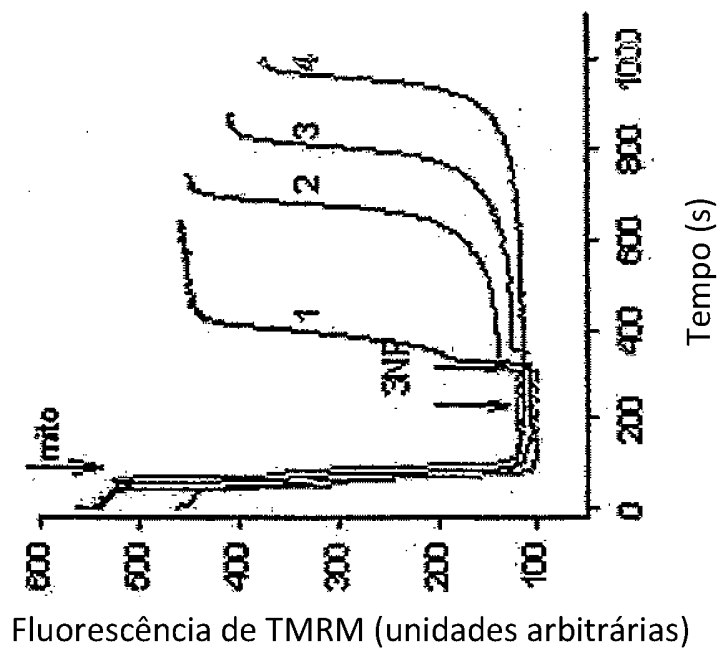


Figura 2C

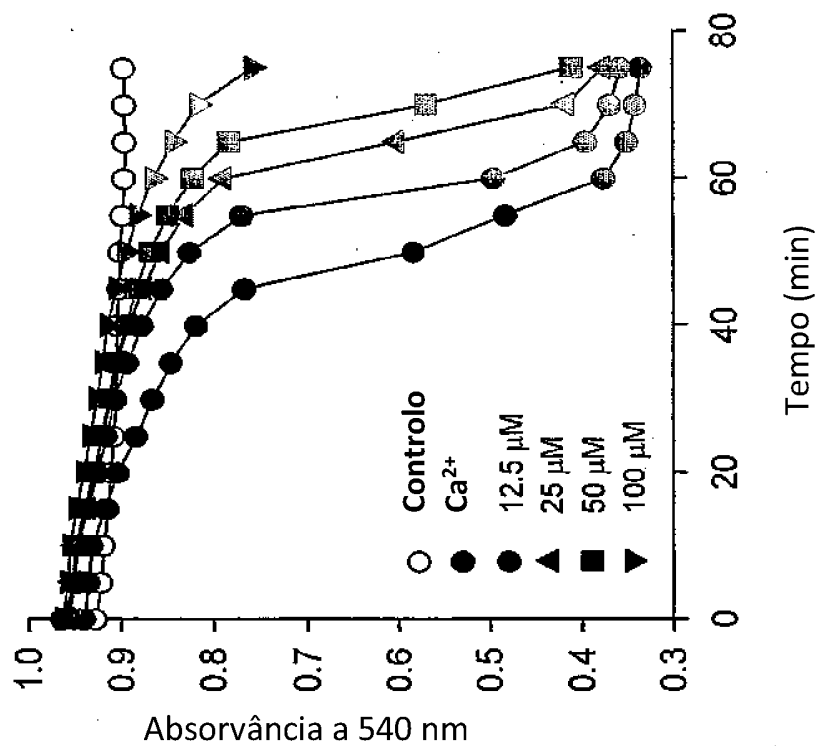


Figura 3A

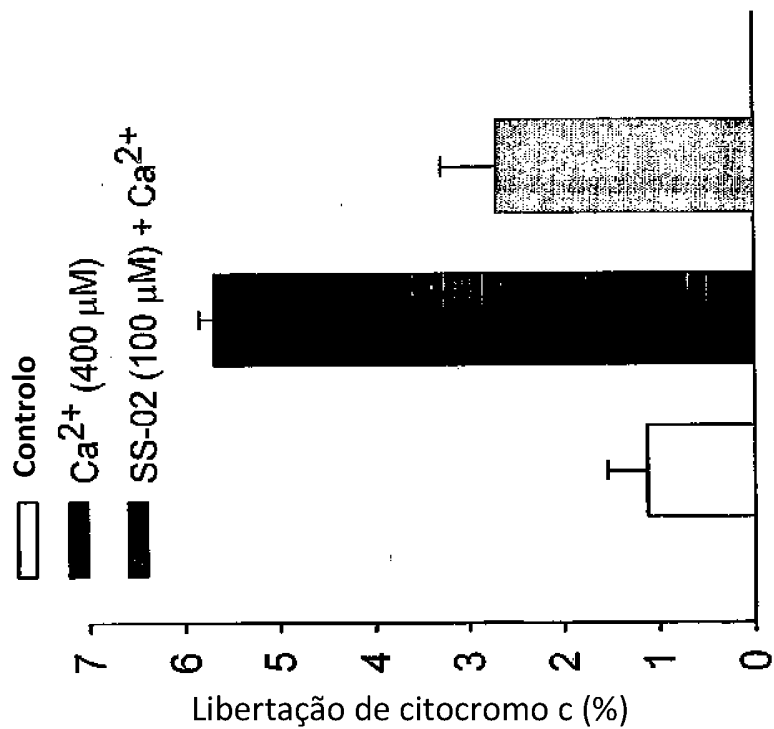


Figura 3B

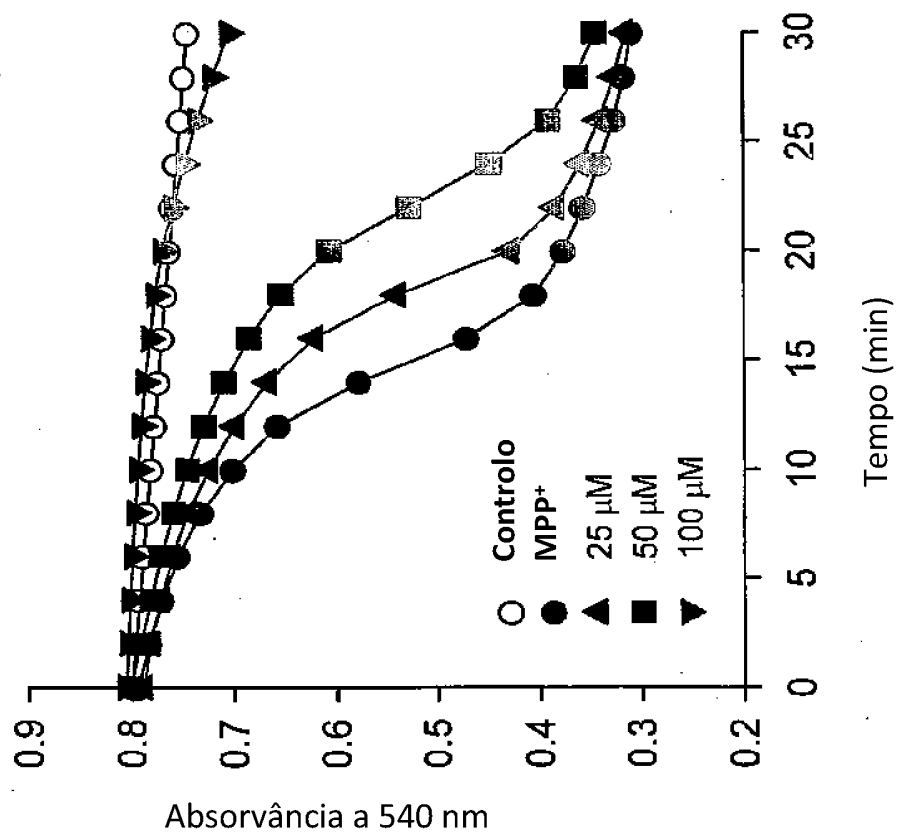


Figura 3C

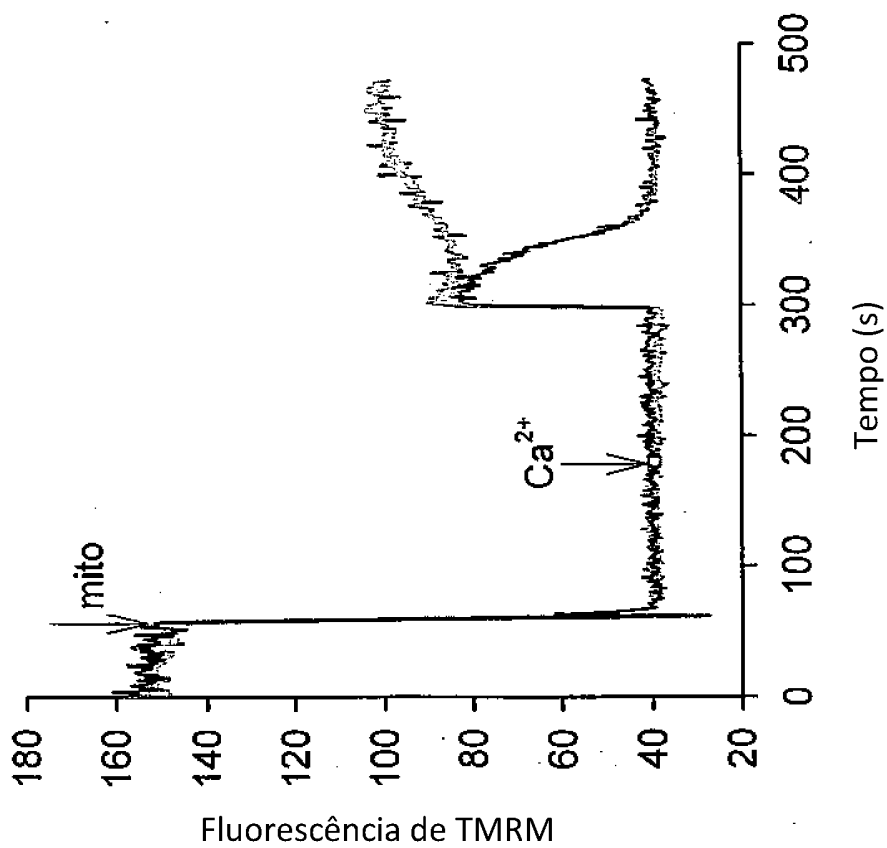


Figura 4A

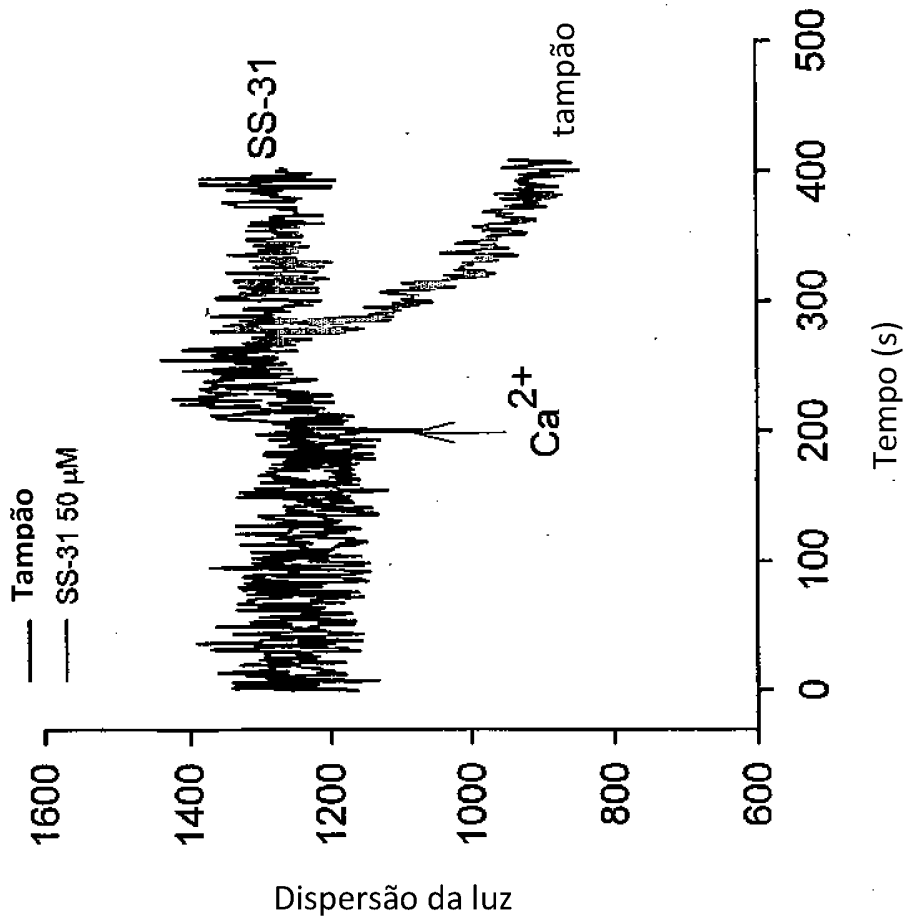
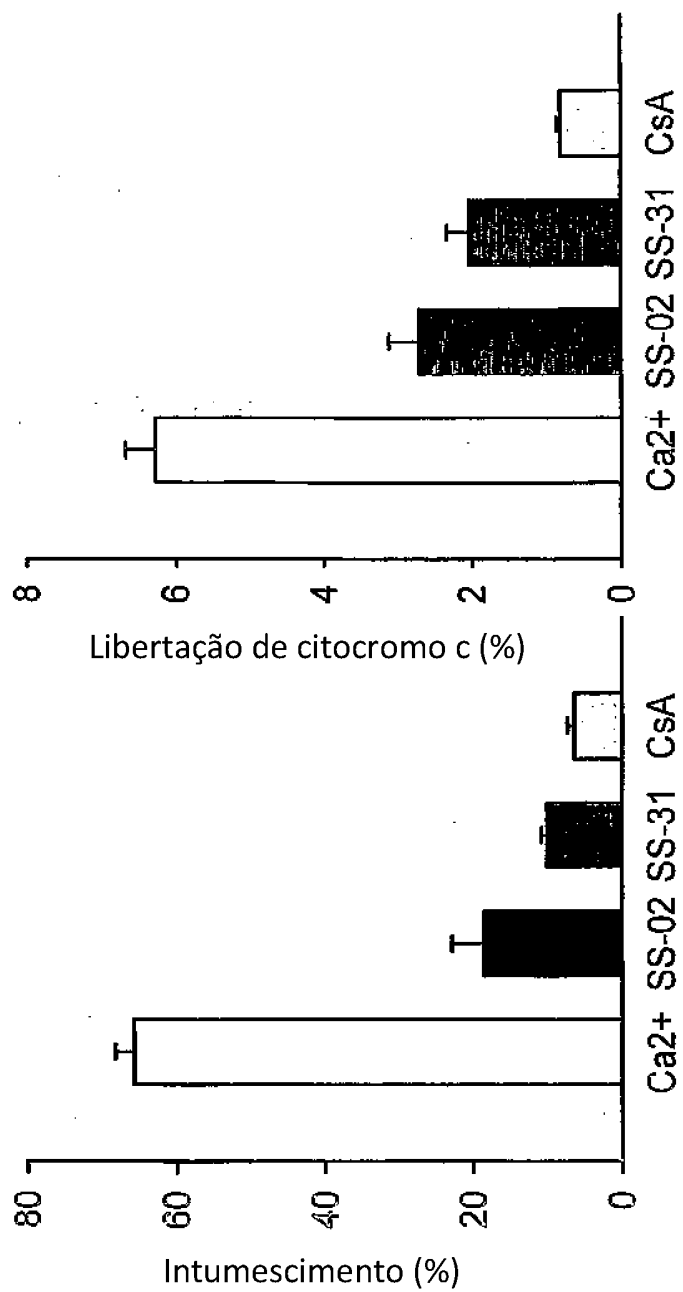


Figura 4B

Figura 4C



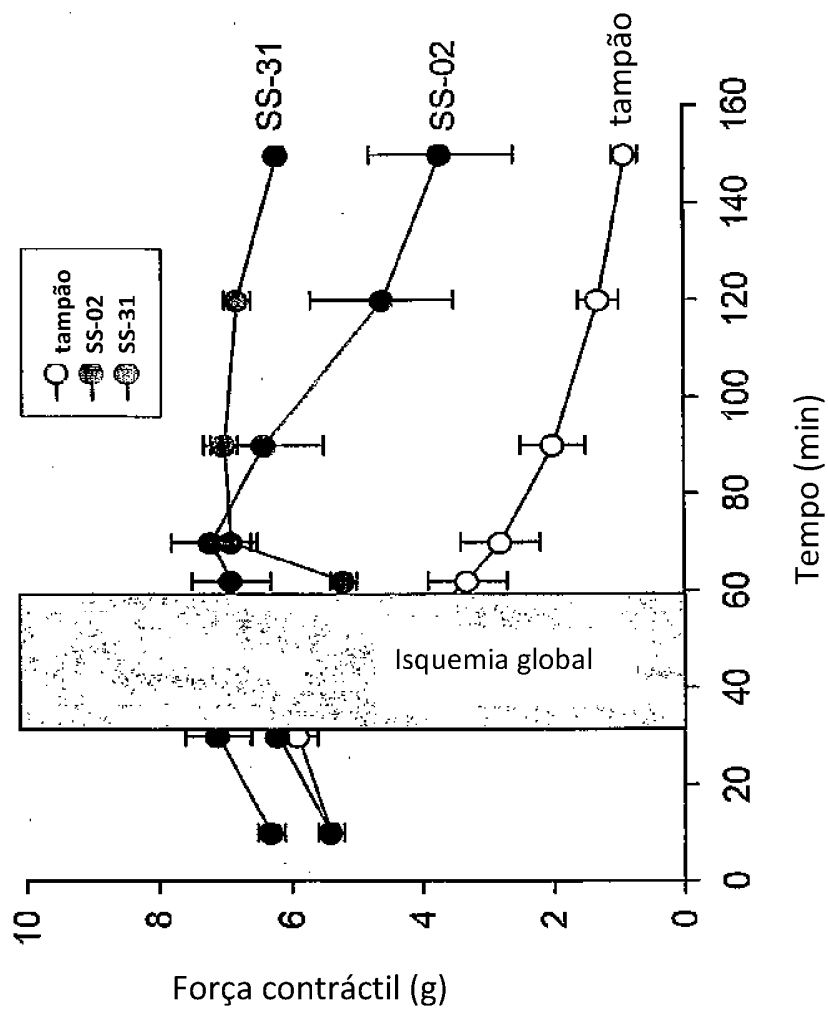


Figura 5

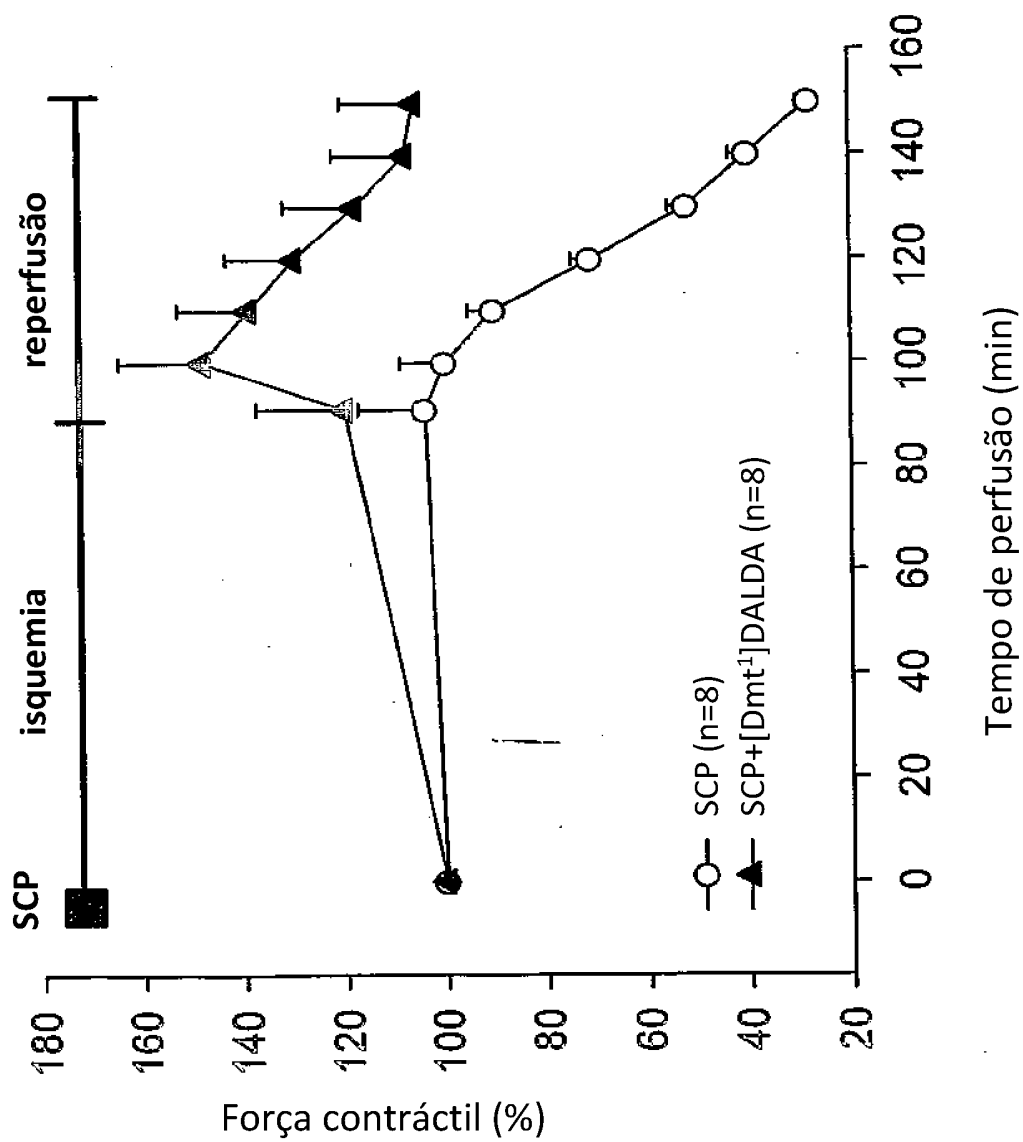


Figura 6