

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 481**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2015 PCT/US2015/046130**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16029027**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2015 E 15833335 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3182989**

54 Título: **Péptido D-Arg-2,6-Dmt-Lys-Phe-NH₂ para el tratamiento del síndrome de Alport**

30 Prioridad:

21.08.2014 US 201462040236 P

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

27.10.2021

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 2 870 481 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ para el tratamiento del síndrome de Alport

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reclama el beneficio y la prioridad de la solicitud estadounidense n.º 62/040.236, presentada el 21 de agosto de 2014.

Campo técnico

La presente tecnología se refiere al péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport y/o la reducción del riesgo de síndrome de Alport en un sujeto.

10 Antecedentes

La siguiente descripción se proporciona para ayudar a la comprensión del lector.

15 El síndrome de Alport o nefritis hereditaria es un trastorno genético caracterizado por glomerulonefritis, enfermedad renal terminal e hipoacusia. La orina con sangre (hematuria) y proteína en la orina (proteinuria) son características comunes de esta afección. El síndrome de Alport también puede afectar a los ojos provocando anomalías oculares incluyendo cataratas, lenticono, queratocono, así como manchas retinianas en la mácula y la periferia media.

20 El síndrome de Alport está provocado por mutaciones en los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, que participan en la biosíntesis de colágeno. Las mutaciones en cualquiera de estos genes impiden la producción o el ensamblaje apropiado de la red alfa3-4-5 de colágeno tipo IV, que es un componente estructural importante de las membranas basales del riñón, el oído interno y el ojo. Las membranas basales son estructuras delgadas en forma de lámina que separan y soportan las células en muchos tejidos. Cuando mutaciones perturban la formación de fibras de colágeno tipo IV, las membranas basales de los riñones son incapaces de filtrar los productos de desecho de la sangre y facilitar la producción normal de orina, lo que da como resultado de ese modo la liberación de sangre y proteínas en la orina. Las anomalías del colágeno tipo IV en las membranas basales de los riñones provocan una cicatrización gradual de los riñones, lo que conduce eventualmente a una enfermedad renal terminal (ERT). La progresión de la enfermedad conduce al engrosamiento de la membrana basal y le proporciona un aspecto de "esterilla" debido a la división de la membrana basal glomerular (MBG), específicamente la capa de lámina densa. La acumulación de matriz extracelular en la MBG y el mesangio en función de la progresión de la enfermedad renal es una característica compartida por una variedad de enfermedades glomerulares, incluyendo el síndrome de Alport.

30 Los pacientes con síndrome de Alport desarrollan con frecuencia hipoacusia/sordera neurosensorial, que está provocada por anomalías del oído interno, al final de la niñez o al comienzo de la adolescencia. Las personas afectadas también pueden tener cristalinios deformados en los ojos (lenticono anterior) y coloración anómala del tejido sensible a la luz de la retina. Estas anomalías oculares conducen rara vez a la pérdida de visión. La hipoacusia significativa, las anomalías oculares y la enfermedad renal progresiva son más frecuentes en los hombres con síndrome de Alport que en las mujeres afectadas.

35 Como no existe una cura conocida para la afección, los tratamientos se orientan principalmente a proporcionar un alivio sintomático. Hazel *et al.*, 2011 dan a conocer que el péptido dirigido a las mitocondrias acelera la recuperación de ATP y reduce la lesión renal isquémica (Journal of the American Society of Nephrology 22(6): 1041 - 1052). La proteinuria se trata a menudo con inhibidores de la ECA. Una vez que se ha desarrollado la insuficiencia renal, los pacientes intentan controlar su afección con diálisis o cirugía.

40 Sumario

La presente invención proporciona el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención del síndrome de Alport en un sujeto que lo necesite, o en la reducción del riesgo de síndrome de Alport en un sujeto. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable comprende sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.

45 En algunas realizaciones, los signos o síntomas del síndrome de Alport incluyen uno o más de hematuria, proteinuria, cilindruuria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensorial, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, queratocono y leiomiomatosis.

50 El sujeto puede presentar una expresión reducida de la cadena alfa-5 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión reducida de la cadena alfa-4 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión reducida de la cadena alfa-3 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión

5 reducida de las cadenas alfa-3 y alfa-4 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión reducida de las cadenas alfa-3 y alfa-5 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión reducida de las cadenas alfa-4 y alfa-5 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede presentar una expresión reducida de las cadenas alfa-3, alfa-4 y alfa-5 del colágeno tipo IV en comparación con un sujeto de control normal.

El sujeto puede mostrar una expresión persistente de isoformas alfa-1 y alfa-2 específicas del feto del colágeno tipo IV.

10 El sujeto puede presentar niveles y/o función aberrantes de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal. El tratamiento con péptidos puede restaurar los niveles y/o la función de dichas proteínas.

15 En algunas realizaciones, se le ha diagnosticado al sujeto que tiene síndrome de Alport. Al sujeto se le puede haber diagnosticado síndrome de Alport ligado al cromosoma X, síndrome de Alport autosómico dominante o síndrome de Alport autosómico recesivo. Al sujeto se le puede haber diagnosticado síndrome de Alport juvenil ligado al cromosoma X con sordera. Al sujeto se le puede haber diagnosticado síndrome de Alport adulto ligado al cromosoma X con sordera. Al sujeto se le puede haber diagnosticado síndrome de Alport adulto ligado al cromosoma X sin sordera u otros defectos no renales.

En determinadas realizaciones, el sujeto puede portar una mutación genética en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

20 En algunas realizaciones, el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por vía oral, de manera tópica, por vía intranasal, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa o por vía intramuscular.

25 El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 1 semana o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 2 semanas o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 3 semanas o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 4 semanas o más. En algunas realizaciones, el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra diariamente durante 6 semanas o más. En algunas realizaciones, el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra diariamente durante 12 semanas o más.

35 En algunas realizaciones, además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención comprende además administrar por separado, secuencial o simultáneamente uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto, en la que los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (inhibidores de la ECA), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARA), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolímús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopectidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β 1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPAP γ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y BAY-12-9566.

45 Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la ECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril, perindopril, ramipril, espirapril, randolapril y sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los inhibidores de la ECA con respecto a la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport.

55 Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más BRA (bloqueantes de receptores de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, telmisartán e irbesartán. Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los BRA con respecto a la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa (o estatinas) seleccionados del grupo que consiste en lovastatina (por ejemplo, ADVICOR[®] (niacina de liberación prolongada/lovastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), ALTOPREV[™] (lovastatina de liberación prolongada) (Shiongi, Inc., Atlanta, GA), MEVACOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ), atorvastatina (por ejemplo, CADUET[®] (amlodipino y atorvastatina) (Pfizer, Morrisville, PA), LIPITOR[®] (Pfizer, Morrisville, PA)), rosuvastatina y/o rosuvastatina cálcica (por ejemplo, CRESTOR[®] (AstraZeneca, Londres, Inglaterra)), simvastatina (por ejemplo, JUVISYNC[®] (sitagliptina/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ)), SIMCOR[®] (niacina de liberación prolongada/simvastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), VYTORIN[®] (ezetimiba/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ) y ZOCOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ)), fluvastatina y/o fluvastatina sódica (por ejemplo, LESCOL[®], LESCOL XL (fluvastatina de liberación prolongada) (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV)), pitavastatina (por ejemplo, LIVALO[®] (Kowa Pharmaceuticals, Montgomery, AL)), pravastatina y/o pravastatina sódica (por ejemplo, PRAVACHOL[®] (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY)). Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa con respecto a la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la aldosterona seleccionados del grupo que consiste en espironolactona (Aldactone[®]), eplerenona (Inspra[®]), canrenona (canrenoato de potasio), prorrrenona (prorrenoato de potasio) y mexrenona (mexrenoato de potasio). Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los inhibidores de la aldosterona con respecto a la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport.

En algunas realizaciones, además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la invención también incluye administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto el inhibidor de metaloproteinasas de la matriz BAY-12-9566. En algunas realizaciones, puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y BAY-12-9566 con respecto a la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport.

Adicional o alternativamente, en algunas realizaciones, el tratamiento con péptidos da como resultado una expresión y/o función de Mfn1 elevadas en comparación con un sujeto con síndrome de Alport no tratado.

La divulgación se refiere a un método para reducir la glomerulonefritis progresiva caracterizada por la expansión de la matriz mesangial e irregularidades de la MBG en un sujeto mamífero que tiene o se sospecha que tiene síndrome de Alport, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable comprende sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.

El sujeto mamífero puede tener una expresión disminuida de uno o más de COL4A3, COL4A4 o COL4A5 en comparación con un sujeto de control normal.

El sujeto mamífero puede tener una expresión aumentada de MMP-9 en células mesangiales en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto mamífero puede tener niveles en orina alterados de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2 y podocina en comparación con un sujeto de control normal.

Una combinación de tres biomarcadores de orina está alterada en el sujeto mamífero en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto mamífero puede tener niveles en orina alterados de fibronectina, miosina 10 y MMP-2 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto mamífero puede tener niveles en orina alterados de fibronectina, miosina 10 y MMP-9 en comparación con un sujeto de control normal.

Una combinación de dos biomarcadores de orina está alterada en el sujeto mamífero en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto mamífero puede tener niveles en orina alterados de miosina 10 y MMP-2 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto mamífero puede tener niveles en orina alterados de miosina 10 y MMP-9 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede ser humano.

Adicional o alternativamente, el tratamiento con péptidos da como resultado una expresión y/o función de Mfn1 elevadas en comparación con un sujeto con síndrome de Alport no tratado.

El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse por vía oral, de manera tópica, por vía intranasal, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa o por vía intramuscular.

El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 1 semana o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 2 semanas o más. El

péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 3 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 4 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 6 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 12 semanas o más.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la ECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril, perindopril, ramipril, espirapril, randolapril y sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. La combinación del péptido y el inhibidor de la ECA puede tener un efecto sinérgico en la reducción de la glomerulonefritis progresiva.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más BRA (bloqueantes de receptores de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, telmisartán e irbesartán. La combinación del péptido y el BRA puede tener un efecto sinérgico en la reducción de la glomerulonefritis progresiva.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa (o estatinas) seleccionados del grupo que consiste en lovastatina (por ejemplo, ADVICOR[®] (niacina de liberación prolongada/lovastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), ALTOPREV[™] (lovastatina de liberación prolongada) (Shiongi, Inc., Atlanta, GA), MEVACOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ), atorvastatina (por ejemplo, CADUET[®] (amlodipino y atorvastatina) (Pfizer, Morrisville, PA), LIPITOR[®] (Pfizer, Morrisville, PA)), rosuvastatina y/o rosuvastatina cálcica (por ejemplo, CRESTOR[®] (AstraZeneca, Londres, Inglaterra)), simvastatina (por ejemplo, JUVISYNC[®] (sitagliptina/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ)), SIMCOR[®] (niacina de liberación prolongada/simvastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), VYTORIN[®] (ezetimiba/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ) y ZOCOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ)), fluvastatina y/o fluvastatina sódica (por ejemplo, LESCOL[®], LESCOL XL (fluvastatina de liberación prolongada) (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV)), pitavastatina (por ejemplo, LIVALO[®] (Kowa Pharmaceuticals, Montgomery, AL)), pravastatina y/o pravastatina sódica (por ejemplo, PRAVACHOL[®] (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY)). La combinación del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa pueden tener un efecto sinérgico en la reducción de la glomerulonefritis progresiva.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también incluye administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la aldosterona seleccionados del grupo que consiste en espironolactona (Aldactone[®]), eplerenona (Inspra[®]), canrenona (canrenoato de potasio), prorretona (prorenoato de potasio) y mexrenona (mexrenoato de potasio). La combinación del péptido y el inhibidor de la aldosterona puede tener un efecto sinérgico en la reducción de la glomerulonefritis progresiva.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el método también incluye administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto el inhibidor de metaloproteinasas de la matriz BAY-12-9566. La combinación del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y BAY-12-9566 pueden tener un efecto sinérgico en la reducción de la glomerulonefritis progresiva.

La divulgación también se refiere a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport en un sujeto mamífero que tiene una expresión disminuida de COL4A3, COL4A4 o COL4A5 en comparación con un sujeto de control normal. La divulgación puede incluir administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dando como resultado de ese modo la prevención o el retraso de la aparición de uno o más riesgos, signos o síntomas del síndrome de Alport. La sal farmacéuticamente aceptable puede comprender una sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.

Los signos o síntomas del síndrome de Alport pueden incluir uno o más de hematuria, proteinuria, cilindria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticón anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis.

El sujeto puede portar una mutación genética en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5. El sujeto puede ser humano.

Adicional o alternativamente, el tratamiento con péptidos da como resultado una expresión y/o función de Mfn1 elevadas en comparación con un sujeto con síndrome de Alport no tratado.

El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse por vía oral, de manera tópica, por vía intranasal, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa o por vía intramuscular.

El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 1 semana o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 2 semanas o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 3 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 4 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 6 semanas o más. El péptido aromático-catiónico puede administrarse diariamente durante 12 semanas o más.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación comprende además administrar por separado, secuencial o simultáneamente uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto, en la que los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (inhibidores de la ECA), bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARA), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolímús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopeptidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β 1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPAR γ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y BAY-12-9566.

Además de la administración del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también incluye administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la ECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril, perindopril, ramipril, espirapril, randolapril y sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido aromático-catiónico y los inhibidores de la ECA con respecto a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport.

Además de la administración de péptidos aromático-catiónicos, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más BRA (bloqueantes de receptores de angiotensina II) seleccionados del grupo que consiste en losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, telmisartán e irbesartán. Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido aromático-catiónico y los BRA con respecto a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también incluye administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa (o estatinas) seleccionados del grupo que consiste en lovastatina (por ejemplo, ADVICOR[®] (niacina de liberación prolongada/lovastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), ALTOPREV[™] (lovastatina de liberación prolongada) (Shiongi, Inc., Atlanta, GA), MEVACOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ), atorvastatina (por ejemplo, CADUET[®] (amlodipino y atorvastatina) (Pfizer, Morrisville, PA), LIPITOR[®] (Pfizer, Morrisville, PA)), rosuvastatina y/o rosuvastatina cálcica (por ejemplo, CRESTOR[®] (AstraZeneca, Londres, Inglaterra)), simvastatina (por ejemplo, JUVISYNC[®] (sitagliptina/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ)), SIMCOR[®] (niacina de liberación prolongada/simvastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), VYTORIN[®] (ezetímiba/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ) y ZOCOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ)), fluvastatina y/o fluvastatina sódica (por ejemplo, LESCOL[®], LESCOL XL (fluvastatina de liberación prolongada) (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV)), pitavastatina (por ejemplo, LIVALO[®] (Kowa Pharmaceuticals, Montgomery, AL)), pravastatina y/o pravastatina sódica (por ejemplo, PRAVACHOL[®] (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY)). Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa con respecto a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport.

Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto uno o más inhibidores de la aldosterona seleccionados del grupo que consiste en espirolactona (Aldactone[®]), eplerenona (Inspra[®]), canrenona (canrenoato de potasio), prorrenona (prorenoato de potasio) y mexrenona (mexrenoato de potasio). Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo y los inhibidores de la aldosterona con respecto a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport.

5 Además de la administración del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la divulgación también puede incluir administrar por separado, secuencial o simultáneamente al sujeto el inhibidor de metaloproteinasas de la matriz BAY-12-9566. Puede haber un efecto sinérgico entre el péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y BAY-12-9566 con respecto a la reducción del riesgo, los signos o síntomas del síndrome de Alport.

10 La divulgación se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 en un sujeto que lo necesita, que comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La sal farmacéuticamente aceptable puede comprender sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.

15 La enfermedad o afección puede caracterizarse por una reducción de la función en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5 en comparación con un sujeto de control normal. La enfermedad o afección puede caracterizarse por una deficiencia en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5. La enfermedad o afección puede caracterizarse por niveles de expresión disminuidos de uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5 en comparación con un sujeto de control normal.

20 El sujeto puede tener una expresión aumentada de MMP-9 en células mesangiales en comparación con un sujeto de control normal. Adicional o alternativamente, el sujeto puede tener niveles en orina alterados de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2 y podocina en comparación con un sujeto de control normal.

Una combinación de tres biomarcadores de orina puede estar alterada en el sujeto en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede tener niveles en orina alterados de fibronectina, miosina 10 y MMP-2 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede tener niveles en orina alterados de fibronectina, miosina 10 y MMP-9 en comparación con un sujeto de control normal.

25 Una combinación de dos biomarcadores de orina puede estar alterada en el sujeto en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede tener niveles en orina alterados de miosina 10 y MMP-2 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede tener niveles en orina alterados de miosina 10 y MMP-9 en comparación con un sujeto de control normal. El sujeto puede ser humano.

30 Adicional o alternativamente, el tratamiento con péptidos puede resultar en una expresión y/o función de Mfn1 elevadas en comparación con un sujeto no tratado que tiene la enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

35 El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse por vía oral, de manera tópica, por vía intranasal, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa o por vía intramuscular.

40 El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 1 semana o más. El péptido puede administrarse diariamente durante 2 semanas o más. El péptido puede administrarse diariamente durante 3 semanas o más. El péptido puede administrarse diariamente durante 4 semanas o más. El péptido puede administrarse diariamente durante 6 semanas o más. El péptido puede administrarse diariamente durante 12 semanas o más.

45 Adicional o alternativamente, los métodos comprenden además administrar por separado, secuencial o simultáneamente uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto. La combinación del péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un agente terapéutico adicional pueden tener un efecto sinérgico en la prevención o el tratamiento de la enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes de COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

50 Los agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (inhibidores de la ECA), bloqueantes de receptores de angiotensina II (BRA), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopeptidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β 1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPAP γ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y BAY-12-9566.

La divulgación se refiere al tratamiento o la prevención del síndrome de Alport en un sujeto mamífero, que comprende administrar a dicho sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El sujeto mamífero puede ser un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 muestra los 5 estadios de la nefropatía de Alport, adaptada de Kashtan *et al.*, *Pediatr. Nephrol.* 28: 5-11 (2013).

La figura 2 muestra el diseño del estudio global para la evaluación de la administración de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en la disfunción renal en un modelo de ratón nulo para Col4a3.

10 La figura 3A muestra las curvas de supervivencia de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.

La figura 3B muestra los niveles de BUN de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ entre las 7 semanas y las 15 semanas de edad.

15 La figura 3C muestra los niveles de BUN de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

La figura 4A muestra las puntuaciones de patología tubular (indicativas de daño tubular) de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

20 La figura 4B muestra las puntuaciones de inflamación intersticial de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

La figura 4C muestra las puntuaciones de fibrosis intersticial de ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

25 La figura 5A muestra los niveles de expresión de proteína de Mfn1, Opal, Drp1 y Txn2 en ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

30 La figura 5B muestra la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína MFN1 en relación con los niveles de GADPH de control en ratones nulos para Col4a3 tratados con agua y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

La figura 5C muestra la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína TXN2 en relación con los niveles de GADPH de control en ratones nulos para Col4a3 tratados con agua y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

35 La figura 6A muestra los niveles de expresión de ARNm de SOD1 en ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

La figura 6B muestra los niveles de expresión de ARNm de SOD2 en ratones nulos para Col4a3 tratados con agua, 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ y 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad en relación con ratones silvestres.

40 La figura 7 muestra los niveles plasmáticos de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en ratones nulos para Col4a3 tratados con (a) 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 6 semanas de edad (grupo (5)), (b) 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad, y (c) 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad. Se evaluaron los niveles plasmáticos de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 30 minutos después de la última inyección.

45 Descripción detallada

Las definiciones de ciertos términos que se usan en esta memoria descriptiva se proporcionan a continuación. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta tecnología.

50 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un(o)", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente otra cosa. 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 introducción o suministro a un sujeto de un compuesto para realizar su función pretendida. La administración puede llevarse a cabo por cualquier vía adecuada, incluyendo por vía oral, por vía intranasal, por vía parenteral (por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía subcutánea), de manera sistémica, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa, por vía intramuscular o de manera tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por terceros.

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 aminoácidos y miméticos de aminoácidos 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. Los análogos de aminoácidos 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, metionina-sulfóxido, metionina-metilsulfonio. 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 miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido que se produce de manera natural. Puede hacerse referencia a los aminoácidos en el presente documento o bien mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica 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 y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que da como resultado la restauración total o parcial de la integridad estructural y la función de las membranas basales en el riñón, el oído interno y el ojo en un sujeto que lo necesite, o que da como resultado una mejora parcial o total de uno o más síntomas del síndrome de Alport. En el contexto de aplicaciones terapéuticas o profilácticas, en algunas realizaciones, la cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo, grado y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, edad, el sexo, peso corporal y la tolerancia a fármacos. El experto en la técnica podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las composiciones también pueden administrarse en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, puede administrarse a un sujeto que tiene uno o más signos, síntomas o factores de riesgo del síndrome de Alport, incluyendo, pero sin limitarse a, hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensorial, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de los péptidos aromático-catiónicos incluye niveles en los que se reducen o eliminan la presencia, frecuencia o intensidad de uno o más signos, síntomas o factores de riesgo del síndrome de Alport. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede reducir o mejorar los efectos fisiológicos del síndrome de Alport y/o los factores de riesgo del síndrome de Alport y/o la probabilidad de desarrollar el síndrome de Alport.

Tal como se usa en el presente documento, polipéptido o péptido “aislado” o “purificado” se refiere a un polipéptido o péptido que está sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se deriva el agente, o sustancialmente libre de precursores químicos. u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Por ejemplo, un péptido aromático-catiónico aislado estaría libre de materiales que interferirían en 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 indistintamente en el presente documento para significar un polímero que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, denominadas habitualmente péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, denominadas generalmente 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 postraducciona, o bien mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “sujeto”, “individuo” o “paciente” pueden ser un organismo individual, un vertebrado, un mamífero o un ser humano.

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 “por separado” se refiere a una administración de al menos dos principios activos al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo por diferentes vías.

5 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 tratamiento simultáneo.

10 Un “efecto terapéutico sinérgico” se refiere a un efecto terapéutico mayor que el aditivo que se produce mediante una combinación de al menos dos agentes terapéuticos, y que supera el que de otro modo resultaría de la administración individual de los agentes. Por ejemplo, pueden usarse menores dosis de uno o más agentes terapéuticos para tratar el síndrome de Alport, lo que da como resultado una mayor eficacia terapéutica y una disminución de los efectos secundarios.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren a un tratamiento terapéutico, en el que el objeto es reducir, aliviar o ralentizar la progresión o el avance de, y/o revertir la progresión del estado patológico o trastorno seleccionado como diana. Un sujeto se “trata” con éxito para el síndrome de Alport si, después de recibir una cantidad terapéutica del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, según la presente divulgación, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible de o la ausencia de uno o más signos y síntomas del síndrome de Alport, tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a, hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis.

25 Tal como se usa en el presente documento, “prevención” o “prevenir” de un trastorno o una afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o la afección en la muestra tratada en relación con una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición de uno o más síntomas del trastorno o la afección en relación con la muestra de control no tratada. Tal como se usa en el presente documento, prevenir el síndrome de Alport incluye prevenir o retrasar el inicio del síndrome de Alport. Tal como se usa en el presente documento, la prevención del síndrome de Alport también incluye prevenir una recurrencia de uno o más signos o síntomas del síndrome de Alport.

30 También debe apreciarse que los diversos modos de tratamiento o prevención de afecciones médicas tal como se describen en el presente documento pretenden significar “sustancial”, que incluye el tratamiento o la prevención total pero también menor que el total, y en el que se logra algún resultado biológica o médicamente relevante.

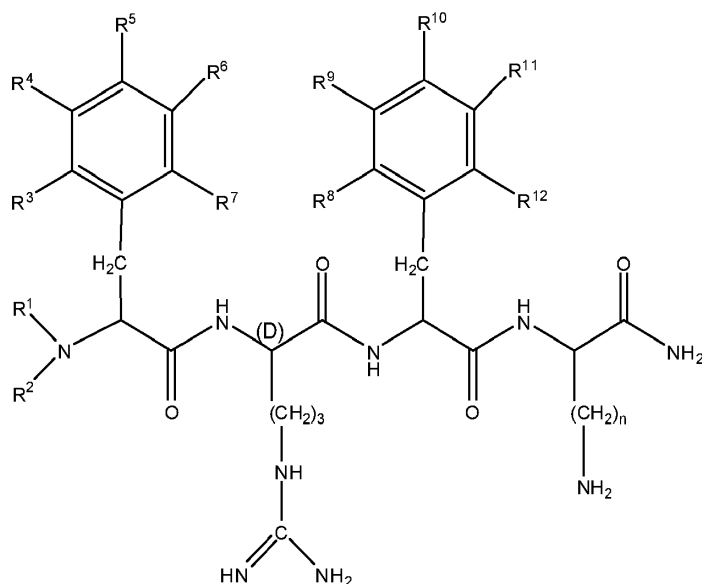
35 Los péptidos dados en los siguientes párrafos de la descripción detallada forman parte de la divulgación pero no son una realización de la invención reivindicada, a menos que estén limitados al péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención del síndrome de Alport en un sujeto que lo necesite o en la reducción del riesgo de síndrome de Alport en un sujeto.

40 Péptidos aromático-catiónicos

La divulgación se refiere a prevenir o tratar el síndrome de Alport en un sujeto que lo necesita y/o para prevenir, mejorar o reducir la intensidad de uno o más signos o síntomas asociados con una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en genes que son componentes de la red alfa3-4-5 de colágeno tipo IV. Se espera que la administración de péptidos aromático-catiónicos no sólo sea eficaz para el tratamiento o la prevención del síndrome de Alport y/o para prevenir, mejorar o reducir la intensidad de uno o más signos, o síntomas asociados con una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en genes que son componentes de la red de colágeno alfa3-4-5 de tipo IV, pero que la administración de los péptidos en combinación con agentes terapéuticos adicionales tendrá efectos sinérgicos en el tratamiento o la prevención de la enfermedad. Por ejemplo, la administración de los péptidos en combinación con agentes convencionales o recientemente desarrollados para el tratamiento del síndrome de Alport tendrá efectos mayores que los aditivos en la prevención o el tratamiento de la enfermedad.

55 El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede prevenir uno o más signos o síntomas del síndrome de Alport en un sujeto y/o prevenir, mejorar o reducir la intensidad de uno o más signos o síntomas asociados con una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en genes que son componentes de la red de alfa3-4-5 de colágeno tipo IV. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede reducir la probabilidad de que un sujeto con factores de riesgo para el síndrome de Alport desarrolle uno o más signos o síntomas del síndrome de Alport. Los factores de riesgo a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, mutaciones en COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

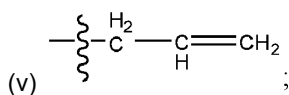
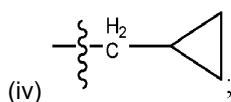
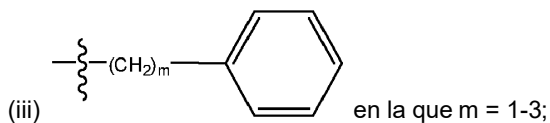
El péptido puede definirse mediante la fórmula I:



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

- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;

5



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

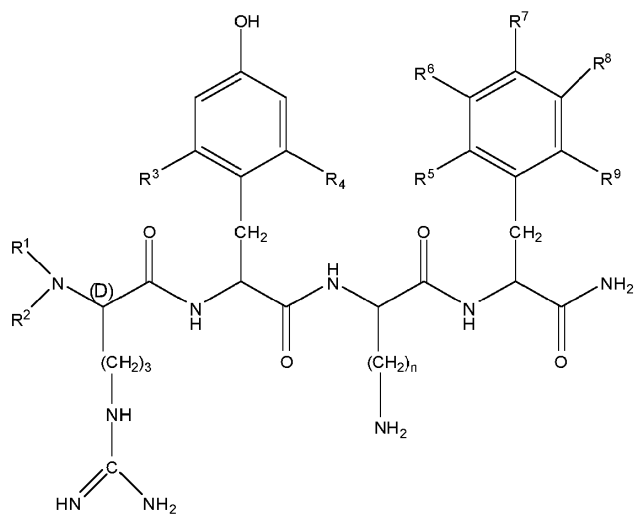
- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;
- (iii) alcoxilo C₁-C₆ ;
- (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;
- (vi) dialquilamino C₁-C₄;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;
- (ix) halógeno, en el que "halógeno" incluye cloro, flúor, bromo y yodo; y

15

n es un número entero de 1 a 5.

- 20 R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² todos pueden ser hidrógeno; y n es 4. R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ y R¹¹ todos pueden ser hidrógeno; R⁸ y R¹² son metilo; R¹⁰ es hidroxilo; y n es 4.

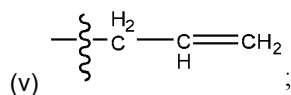
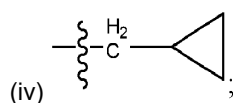
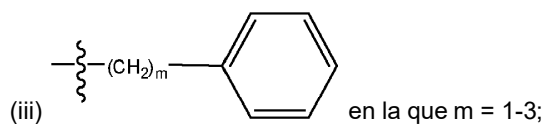
El péptido puede definirse mediante la fórmula II:



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

- (i) hidrógeno;
- (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;

5



R³ y R⁴ se seleccionan cada uno independientemente de

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

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

- (i) hidrógeno;
- 20 (ii) alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado;
- (iii) alcoxilo C₁-C₆;
- (iv) amino;
- (v) alquilamino C₁-C₄;

(vi) dialquilamino C₁-C₄;

(vii) nitro;

(viii) hidroxilo;

(ix) halógeno, en el que "halógeno" incluye cloro, flúor, bromo y yodo; y

5 n es un número entero de 1 a 5.

R¹ y R² puede ser hidrógeno; R³ y R⁴ son metilo; R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ son todos hidrógeno; y n es 4.

Los péptidos aromático-catiónicos de la presente divulgación tienen un motivo estructural central de aminoácidos aromáticos y catiónicos alternados. Por ejemplo, el péptido puede ser un tetrapéptido definido por cualquiera de las fórmulas A F que se establecen a continuación:

10 Aromático - catiónico - aromático - catiónico (fórmula A)

Catiónico - aromático - catiónico - aromático (fórmula B)

Aromático - aromático - catiónico - catiónico (fórmula C)

Catiónico - catiónico - aromático - aromático (fórmula D)

Aromático - catiónico - catiónico - aromático (fórmula E)

15 Catiónico - aromático - aromático - catiónico (fórmula F)

en la que aromático es un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W). El residuo aromático puede sustituirse por un análogo saturado de un residuo aromático, por ejemplo, ciclohexilalanina (Cha). Catiónico puede ser un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Arg (R), Lys (K) e His (H).

20 Los péptidos aromático-catiónicos son solubles en agua y muy polares. A pesar de estas propiedades, los péptidos pueden penetrar fácilmente en las membranas celulares. Los péptidos aromático-catiónicos incluyen normalmente un mínimo de tres aminoácidos o un mínimo de cuatro aminoácidos, unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El número máximo de aminoácidos presentes en los péptidos aromático-catiónicos es de veinte aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El número total de aminoácidos puede ser de doce, nueve o seis.

25 Los aminoácidos de los péptidos aromático-catiónicos pueden ser cualquier aminoácido. Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se usa para referirse 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 que se encuentran normalmente en las 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 los mamíferos durante la producción de urea. Otro ejemplo de un aminoácido que se produce de manera natural incluye hidroxiprolina (Hyp).

35 Los péptidos contienen opcionalmente uno o más aminoácidos que no se producen de manera natural. De manera óptima, el péptido no tiene aminoácidos que se produzcan 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 aquellos aminoácidos que normalmente no se sintetizan en los procesos metabólicos normales en los organismos vivos y no se encuentran de manera natural en las proteínas. Además, los aminoácidos que no se producen de manera natural de manera adecuada tampoco son reconocidos por las proteasas comunes. El aminoácido que no se produce de manera natural puede estar presente en cualquier posición del 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.

45 Los aminoácidos que no se producen de manera natural pueden comprender, por ejemplo, grupos alquilo, arilo o alquilarilo que no se encuentran en los aminoácidos naturales. Algunos ejemplos de alquilaminoácidos no naturales incluyen ácido α -aminobutírico, ácido β -aminobutírico, ácido γ -aminobutírico, ácido δ -aminovalérico y ácido ϵ -aminocaproico. Algunos ejemplos de arilaminoácidos que no naturales incluyen los ácidos orto, meta y para-aminobenzoico. Algunos ejemplos de alquilarilaminoácidos no naturales incluyen los ácidos orto, meta y para-aminofenilacético y el 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 al 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 la posición 4', 5', 6' o 7' del anillo benzo de un residuo de triptófano. El grupo puede ser cualquier grupo químico que pueda 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, alcoxilo), amino, alquilamino C₁-C₄ y dialquilamino C₁-C₄ (por ejemplo, metilamino, dimetilamino), nitro, hidroxilo, halo (es decir, flúor, 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 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 con, por ejemplo, alcohol metílico o etílico. Otra de tales modificaciones incluye la derivatización de un grupo amino de un residuo de lisina, arginina o histidina. Por ejemplo, dichos grupos amino pueden acilarse. Algunos grupos acilo adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo benzóilo o un grupo alcanóilo que comprende cualquiera de los grupos alquilo C₁-C₄ mencionados anteriormente, tales como un grupo acetilo o propionilo.

Los aminoácidos que no se producen de manera natural son adecuadamente resistentes o insensibles a las proteasas comunes. Los ejemplos de aminoácidos que no se producen de manera natural que son resistentes o insensibles a las proteasas incluyen la forma dextrógira (D) de cualquiera de los L-aminoácidos que se producen de manera natural mencionados anteriormente, así como L y/o D-aminoácidos que no se producen de manera natural. Los D-aminoácidos no se encuentran normalmente en las proteínas, aunque se encuentran en ciertos antibióticos peptídicos que se sintetizan por medios distintos de la maquinaria sintética 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.

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

Los péptidos aromático-catiónicos deben tener un número mínimo de cargas positivas netas a pH fisiológico en comparación con el número total de residuos de aminoácidos 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 aminoácidos en el péptido se denominará a continuación (r). El número mínimo de cargas positivas netas que se analizan 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 mamífero. Por ejemplo, el pH fisiológico de un ser humano es normalmente de 7,4, pero el pH fisiológico normal en los mamíferos puede ser cualquier pH desde 7,0 hasta 7,8.

"Carga neta", tal como se usa en el presente documento, se refiere al equilibrio 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 están cargados positivamente a pH fisiológico incluyen L-lisina, L-arginina y L-histidina. Los aminoácidos que se producen de manera natural que están cargados negativamente a pH fisiológico incluyen ácido L-aspártico y ácido L-glutámico.

Normalmente, un péptido tiene un grupo amino N-terminal cargado positivamente y un grupo carboxilo C-terminal cargado negativamente. Las cargas se anulan 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 cargado negativamente (es decir, Glu) y cuatro aminoácidos cargados positivamente (es decir, dos residuos de Arg, uno de Lys y uno de His). Por tanto, el péptido anterior tiene una carga positiva neta de tres.

Los péptidos aromático-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 aminoácidos (r) en la que $3p_m$ es el mayor número 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 aminoácidos (r) puede ser de la siguiente manera:

TABLA 2. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($3p_m \leq p+1$)

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

Los péptidos aromático-catiónicos pueden tener una relación entre el número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) en la que $2p_m$ es el mayor número 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 aminoácidos (r) puede ser de la siguiente manera:

5

TABLA 3. Número de aminoácidos y cargas positivas netas ($2p_m \leq p+1$)

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

El número mínimo de cargas positivas netas (p_m) y el número total de residuos de aminoácidos (r) son iguales. Los péptidos tienen tres o cuatro residuos de aminoácidos y un mínimo de una carga positiva neta, adecuadamente, un mínimo de dos cargas positivas netas o tres cargas positivas netas.

10

También es importante que los péptidos aromático-catiónicos tengan un número mínimo de grupos aromáticos en comparación con el número total de cargas positivas netas (p_t). El número mínimo de grupos aromáticos 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 (a la que contribuyen los residuos de lisina y arginina) y tres grupos aromáticos (a los que contribuyen los residuos de tirosina, fenilalanina y triptófano).

15

Los péptidos aromático-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_t) en la que $3a$ es el mayor número que es menor que o igual a p_t+1 , excepto que cuando p_t 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_t) puede ser de la siguiente manera:

20

TABLA 4. 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 aromático-catiónicos tienen una relación entre el número mínimo de grupos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) en la que $2a$ puede ser el mayor número que es menor que o igual a p_t+1 . La relación entre el número mínimo de residuos de aminoácidos aromáticos (a) y el número total de cargas positivas netas (p_t) puede ser de la siguiente manera:

25

TABLA 5. 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.

30

Los grupos carboxilo, especialmente el grupo carboxilo terminal de un aminoácido C-terminal, se amidan adecuadamente con, por ejemplo, amoniaco para formar la amida C-terminal. Alternativamente, el grupo carboxilo terminal del aminoácido C-terminal puede amidarse con cualquier amina primaria o secundaria. La amina primaria o secundaria puede ser, por ejemplo, una alquil, especialmente una alquil C₁-C₄ ramificado o no ramificado o una arilamina. 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. Los grupos carboxilato libres de los residuos de asparagina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico que no se encuentran en el extremo C-terminal de los péptidos aromático-catiónicos también pueden amidarse dondequiera que se encuentren dentro del péptido. La amidación en estas posiciones internas puede ser con amoniaco o cualquiera de las aminas primarias o secundarias descritas anteriormente.

35

40

El péptido aromático-catiónico puede ser un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y al menos un aminoácido aromático. El péptido aromático-catiónico puede ser un tripéptido que tiene dos cargas positivas netas y dos aminoácidos aromáticos.

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

TABLA 6: 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

El péptido puede tener actividad agonista del receptor opioide mu (es decir, activan el receptor mu-opioide). Los péptidos, que tienen actividad agonista del receptor opioide mu, son normalmente aquellos péptidos que tienen un residuo de tirosina o un derivado de tirosina en el extremo N-terminal (es decir, la posición del primer aminoácido).
 5 Los derivados de tirosina adecuados 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 del receptor opioide mu puede tener la fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ tiene una carga positiva neta de tres, a la que contribuyen los aminoácidos tirosina, arginina y lisina y tiene dos grupos aromáticos a los que contribuyen 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 la fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. 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. 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ penetra fácilmente en la membrana plasmática de varios tipos de células de mamíferos de manera independiente de la energía (Zhao *et al.*, J. Pharmacol Exp Ther., 304: 425-432, 2003).
 10

Alternativamente, en otros casos, el péptido aromático-catiónico no tiene actividad agonista del receptor opioide mu. Por ejemplo, durante un tratamiento a largo plazo, tal como en un estado o una afección de enfermedad crónica, el uso de un péptido aromático-catiónico que activa el receptor opioide mu puede estar contraindicado. En estos casos, los efectos potencialmente adversos o adictivos del péptido aromático-catiónico pueden excluir 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 active el receptor opioide mu puede ser un tratamiento apropiado. Los péptidos que no tienen actividad agonista del 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 no se produce de manera natural distinto de la tirosina. El aminoácido en el extremo N-terminal puede ser 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).
 15
 20
 25

Un ejemplo de un péptido aromático-catiónico que no tiene actividad agonista del 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). Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ que contiene 2',6'-dimetilfenilalanina en la posición de aminoácido 1 tiene la fórmula 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. La secuencia de aminoácidos de 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ puede reorganizarse de manera que Dmt no esté en el extremo N-terminal. Un ejemplo de un péptido aromático-catiónico que no tiene actividad agonista del receptor opioide mu tiene la fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.
 30

Las variantes de sustitución adecuadas de los péptidos enumerados en el presente documento incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas. Los aminoácidos pueden agruparse según sus características fisicoquímicas de la siguiente manera:

- (a) Aminoácidos apolares: Ala (A) Ser (S) Thr (T) Pro (P) Gly (G) Cys (C);
- (b) aminoácidos ácidos: Asn (N) Asp (D) Glu (E) Gln (Q);
- 40 (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 del mismo grupo se denominan sustitución conservativa y pueden preservar las características fisicoquímicas del péptido original. Por el contrario, las

sustituciones de un aminoácido en un péptido por otro aminoácido en un grupo diferente generalmente tienen más probabilidades de alterar las características del péptido original.

Los ejemplos de péptidos que activan los receptores de opioides mu incluyen, pero no se limitan a, los péptidos aromático-catiónicos que se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7. Análogos de péptidos con actividad opioide Mu

Posición aminoácido 1	de	Posición aminoácido 2	de	Posición aminoácido 3	de	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 aminoheptanoico) 2-	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

ES 2 870 481 T3

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
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

ES 2 870 481 T3

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
 Dmt = dimetiltirosina
 Mmt = 2'-metiltirosina
 Tmt = N,2',6'-trimetiltirosina
 Hmt = 2'-hidroxi,6'-metiltirosina
 dnsDap = ácido β-dansil-L-α,β-diaminopropiónico
 atnDap = ácido β-antraniloil-L-α,β-diaminopropiónico
 Bio = biotina

Los ejemplos de péptidos que no activan los receptores de opioides mu incluyen, pero no se limitan a, los péptidos aromático-catiónicos que se muestran en la tabla 8.

TABLA 8. Análogos de péptidos que carecen de actividad opioide mu

Posición-aminoácido-1 μ	Posición-aminoácido-2 μ	Posición-aminoácido-3 μ	Posición-aminoácido-4 μ	Modificación-terminal μ	C-
D-Arg μ	Dmt μ	Lys μ	Phe μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Dmt μ	Phe μ	Lys μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Phe μ	Lys μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Phe μ	Dmt μ	Lys μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Lys μ	Dmt μ	Phe μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Lys μ	Phe μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	Lys μ	Dmt μ	D-Arg μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	Lys μ	D-Arg μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	D-Arg μ	Phe μ	Lys μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	D-Arg μ	Dmt μ	Lys μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	D-Arg μ	Lys μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	Dmt μ	D-Arg μ	Lys μ	NH ₂ μ	μ
Phe μ	Dmt μ	Lys μ	D-Arg μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	Phe μ	D-Arg μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	Phe μ	Dmt μ	D-Arg μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	Dmt μ	D-Arg μ	Phe μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	Dmt μ	Phe μ	D-Arg μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	D-Arg μ	Phe μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ
Lys μ	D-Arg μ	Dmt μ	Phe μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Dmt μ	D-Arg μ	Phe μ	NH ₂ μ	μ
D-Arg μ	Dmt μ	D-Arg μ	Dmt μ	NH ₂ μ	μ

D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Dmt	Lys	NH ₂
D-Arg	Tyr	Lys	Phe	NH ₂
D-Arg	Tyr	Phe	Lys	NH ₂
D-Arg	Tyr	Lys	Dmt	NH ₂
D-Arg	Tyr	Dmt	Lys	NH ₂
D-Arg	Lys	Tyr	Phe	NH ₂
D-Arg	Lys	Tyr	Dmt	NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂

Cha = ciclohexilalanina

Los aminoácidos de los péptidos mostrados en las tablas 5 y 6 pueden estar o bien en la configuración L o bien en la D.

- 5 Los péptidos pueden sintetizarse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para sintetizar químicamente 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).

Síndrome de Alport

- 10 El síndrome de Alport es una afección genética caracterizada por enfermedad renal, hipoacusia y anomalías oculares y aparece en aproximadamente 1 de cada 50.000 recién nacidos.

- 15 Mutaciones en los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 provocan el síndrome de Alport. Cada uno de estos genes proporciona instrucciones para producir un componente de una proteína llamada colágeno tipo IV. Esta proteína desempeña un papel importante en los riñones, específicamente en unas estructuras llamadas glomérulos. Los glomérulos son agrupaciones de vasos sanguíneos especializados que retiran agua y productos de desecho de la sangre y producen orina. Las mutaciones en estos genes dan como resultado anomalías del colágeno tipo IV en los glomérulos, lo que impide que los riñones filtren correctamente la sangre y permite que pasen sangre y proteínas a la orina. Se produce una cicatrización gradual de los riñones, que conduce eventualmente a una pérdida progresiva de la función renal y a una enfermedad renal terminal en muchas personas con síndrome de Alport.

- 20 El colágeno tipo IV también es un componente importante de las estructuras del oído interno, particularmente el órgano de Corti, que transforman las ondas sonoras en impulsos nerviosos para el cerebro. Las alteraciones en el colágeno tipo IV a menudo dan como resultado una función anómala del oído interno al final de la niñez o al comienzo de la adolescencia, lo que puede conducir a sordera neurosensorial. En el ojo, el colágeno tipo IV es importante para mantener la forma del cristalino y el color normal de la retina. Las mutaciones que alteran el colágeno tipo IV pueden provocar cristalinos deformados (lenticón anterior) y una retina de color anómalo. La hipoacusia significativa, las anomalías oculares y la enfermedad renal progresiva son más frecuentes en los hombres con síndrome de Alport que en las mujeres afectadas.

Patrones hereditarios del síndrome de Alport

El síndrome de Alport puede tener diferentes patrones hereditarios que dependen de la mutación genética.

- 30 Aproximadamente el 80 por ciento de los casos están provocados por mutaciones en el gen COL4A5 y se heredan con un patrón ligado al cromosoma X. Este gen se encuentra en el cromosoma X, que es uno de los dos cromosomas sexuales. En los hombres (que tienen sólo un cromosoma X), una copia alterada del gen COL4A5 en cada célula es suficiente para provocar insuficiencia renal y otros síntomas graves del trastorno. Los niños con síndrome de Alport ligado al cromosoma X desarrollan insuficiencia renal en la adolescencia o al comienzo de la edad adulta, pero la aparición de la insuficiencia renal puede retrasarse hasta los 40 a 50 años en algunos pacientes. En las mujeres (que

tienen dos cromosomas X), una mutación en una copia del gen COL4A5 generalmente sólo produce hematuria, pero algunas mujeres experimentan síntomas más graves. A medida que las mujeres con síndrome de Alport ligado al cromosoma X envejecen, aumenta el riesgo de insuficiencia renal.

5 En aproximadamente el 15 por ciento de los casos, el síndrome de Alport es el resultado de mutaciones en ambas copias de los genes COL4A3 o COL4A4 (que están ubicadas en el cromosoma 2) y se hereda con un patrón autosómico recesivo. Los padres de un individuo con la forma autosómica recesiva de esta afección tienen cada uno una copia del gen mutado y se denominan portadores. Algunos portadores no se ven afectados y otros desarrollan una afección menos grave llamada nefropatía de la membrana basal delgada, que se caracteriza por hematuria. Los
10 pacientes con la forma autosómica recesiva del síndrome de Alport desarrollarán insuficiencia renal en la adolescencia o al principio de la edad adulta.

El síndrome de Alport tiene una herencia autosómica dominante en aproximadamente el 5 por ciento de los casos. Las personas con esta forma de síndrome de Alport tienen una mutación en el gen o bien COL4A3 o bien COL4A4 en cada célula. Las características clínicas del síndrome de Alport autosómico dominante son similares a las de la enfermedad ligada al cromosoma X. Sin embargo, el deterioro de la función renal tiende a producirse más lentamente.
15 No está claro por qué algunos individuos con una mutación en el gen COL4A3 o COL4A4 tienen síndrome de Alport autosómico dominante y otros tienen nefropatía de membrana basal delgada. Los pacientes con síndrome de Alport autosómico dominante suelen adentrarse bastante en la mediana edad antes de que se desarrolle insuficiencia renal.

Manifestaciones clínicas

20 En general, el síndrome de Alport se caracteriza por una disfunción determinada genéticamente del filtro glomerular, provocada principalmente por mutaciones en los colágenos que ensamblan la MBG. Los ratones que carecen de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV (Col4a3 $^{-/-}$) desarrollan daño glomerular progresivo. Se cree que los podocitos no logran sintetizar la MBG normal, dejando la red de colágeno IV inestable y fácilmente degradable. Los podocitos son células epiteliales glomerulares altamente diferenciadas que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función glomerulares. Los podocitos son partes integradas de la barrera glomerular y desempeñan un
25 papel clave en la prevención de la fuga de moléculas grandes. La lesión de los podocitos conduce a proteinuria.

El primer signo de disfunción del filtro de MBG es la hematuria seguida de albuminuria y la consiguiente proteinuria no selectiva de magnitud creciente. La orina de los pacientes con síndrome de Alport muestra a menudo cilindruuria y leucocituria. En última instancia, no el daño de la MBG *per se*, sino las consecuencias proinflamatorias y profibróticas tanto en el tubulointersticio como en los glomérulos que resultan de la proteinuria progresiva, conducen eventualmente
30 al desarrollo de enfermedad renal terminal.

La proteinuria manifiesta suele estar ausente en los lactantes varones con síndrome de Alport ligado al cromosoma X (SALX). La edad en la identificación de la proteinuria manifiesta muestra variabilidad interfamiliar y varía entre el comienzo de la infancia y la adolescencia. En perros con SALX, un periodo de microalbuminuria precede al desarrollo de proteinuria manifiesta y aumentos cuantitativos del volumen intersticial debido a atrofia tubular y fibrosis. Los perros
35 con SALX presentan un aumento de la captación de albúmina de las células epiteliales tubulares proximales, un proceso que se ha relacionado con lesión celular. Los datos preliminares del Registro de tratamientos y resultados del síndrome de Alport (ASTOR) indican que los chicos con síndrome de Alport también presentan una etapa de transición de microalbuminuria antes de que se establezca la proteinuria manifiesta.

Las mediciones de los volúmenes intersticiales corticales en varones con síndrome de Alport han demostrado que la fibrosis intersticial es inusual antes de los 10 años. Los volúmenes intersticiales corticales se vuelven anómalos en muchos varones con síndrome de Alport durante la segunda década de vida y se correlacionan inversamente con las tasas de filtración glomerular. Estas observaciones sugieren que, al igual que en otras glomerulopatías crónicas, la fibrosis intersticial es un factor contribuyente significativo de la pérdida de función renal, y la prevención de la fibrosis intersticial en los varones con síndrome de Alport puede requerir una intervención durante la infancia.
40

Los capilares glomerulares normales filtran el plasma a través de una membrana basal rica en las cadenas alfa-3, alfa-4 y alfa-5 del colágeno tipo IV. Estas 3 isoformas están ausentes bioquímicamente de los glomérulos de pacientes con SALX. En cambio, sus MBG conservan una distribución fetal de las isoformas alfa-1 y alfa-2 del colágeno tipo IV porque no logran cambiar su uso de cadena alfa en el desarrollo. La persistencia anómala de estas isoformas fetales en la MBG confiere un aumento de la susceptibilidad al ataque proteolítico por colagenasas y catepsinas. Por tanto,
45 la incorporación de las cadenas alfa-3, alfa-4 y alfa-5 ricas en cisteína en membranas basales especializadas como la MBG puede haber evolucionado para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica en el sitio de filtración glomerular. La ausencia de estas isoformas de colágeno IV potencialmente protectoras en la MBG de pacientes con SALX puede explicar la división progresiva de la membrana basal y el aumento del daño a medida que los riñones se deterioran en estos pacientes.
50

55 La hipertensión suele detectarse en la segunda década de la vida y se manifiesta normalmente en varones con SALX, así como en pacientes con síndrome de Alport autosómico recesivo y autosómico dominante. El edema y el síndrome nefrótico están presentes en el 30-40% de los adultos jóvenes con síndrome de Alport; no son frecuentes en el comienzo de la infancia, pero su incidencia aumenta progresivamente con la edad. Con la aparición de la insuficiencia

renal, pueden resultar evidentes síntomas de anemia crónica y osteodistrofia.

Varias anomalías oculares específicas pueden producirse en pacientes con síndrome de Alport, incluyendo lenticono anterior, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y retinopatía en punto y mancha. Algunos pacientes con lenticono anterior desarrollan errores de refracción al final de la adolescencia o en la edad adulta; puede ser necesaria la extracción de cataratas en algunos pacientes adultos.

Otras manifestaciones clínicas también incluyen glomeruloesclerosis progresiva variable individualmente, uremia, macrotrombocitopenia, glomerulonefritis, sordera neurosensible bilateral, anomalías ultraestructurales de la MBG (por ejemplo, acumulación de matriz glomerular, niveles de MMP-9 elevados en células mesangiales) y leiomiomatosis difusa del esófago o los genitales femeninos.

Patogenia

La figura 1 muestra los 5 estadios de la nefropatía de Alport. El estadio 1 de la nefropatía de Alport comienza al nacer y se asocia con MBG predominantemente delgadas y presumiblemente frágiles. La transición del estadio 1 al estadio 2 ocurre con la aparición de microalbuminuria, definida arbitrariamente como un cociente microalbúmina-creatinina mayor de 30 mg/g. La tira reactiva de orina permanece normalmente negativa para albúmina hasta que el cociente microalbúmina-creatinina aumenta hasta 200 mg/g de creatinina. Una vez que hay una proteinuria manifiesta, definida como una lectura de la tira reactiva en orina para proteína de 1+ o mayor, o un cociente proteína-creatinina en orina mayor de 0,2 mg/mg, el paciente ha pasado al estadio 3. Las correlaciones histológicas de los estadios 2 y 3 incluyen engrosamiento y laminación de la MBG asociados con la desaparición de los procesos basales de células epiteliales viscerales (podocitos). La tasa de filtración glomerular comienza a disminuir en el estadio 4. La tasa de filtración glomerular, estimada mediante el aclaramiento de creatinina, se correlaciona inversamente con la fracción de volumen intersticial cortical, una medida de fibrosis del intersticio renal. El aclaramiento de creatinina se mantiene en el intervalo normal hasta que la fibrosis intersticial cortical aumenta por encima del límite superior del intervalo normal, lo que sugiere que la supresión de la fibrosis intersticial renal protegerá la función renal en pacientes con Alport. En los niños con síndrome de Alport, la fracción de volumen intersticial cortical suele ser normal durante los primeros 10 años de vida, pero luego comienza a aumentar.

De manera global, alrededor del 50% de los varones con SALX alcanzan la enfermedad renal terminal de estadio 5 a los 25 años de edad, el 90% a los 40 años de edad y casi el 100% a los 60 años de edad. El momento del estadio 5 en los hombres con SALX está influido fuertemente por el genotipo de COL4A5: aquellos con delecciones y mutaciones sin sentido progresan a través de los estadios anteriores con relativa rapidez, mientras que aquellos con mutaciones de cambio de sentido a menudo progresan a un ritmo más lento. Aproximadamente el 30% de las mujeres con síndrome de Alport ligado al cromosoma X alcanzan la enfermedad renal terminal a los 80 años.

Diagnóstico

El diagnóstico precoz y preciso es un requisito previo para la intervención precoz en el síndrome de Alport. El enfoque de diagnóstico en sujetos con hematuria se basa en una evaluación cuidadosa de las características clínicas y los antecedentes familiares, complementada con biopsia de tejido y análisis genético molecular. La hematuria está presente en el síndrome de Alport mucho antes de que puedan detectarse la hipoacusia y las anomalías oculares. Por tanto, aunque la presencia de sordera neurosensible o cambios oculares característicos en un sujeto con hematuria aumenta la sospecha de síndrome de Alport, los exámenes de audición y oculares normales no sirven para descartar el síndrome de Alport. Un diagnóstico de sospecha de síndrome de Alport puede confirmarse mediante una biopsia de riñón o piel. La evaluación completa del material de la biopsia renal requiere microscopía óptica, de inmunofluorescencia y electrónica.

El diagnóstico del síndrome de Alport se realiza basándose en cambios patognomónicos en la ultraestructura de la MBG y anomalías de la expresión desde la membrana basal renal de las cadenas de colágeno tipo IV. Las cadenas alfa3, alfa4 y alfa5 del colágeno tipo IV están presentes en la MBG de individuos normales. En sujetos con SALX, sin embargo, la presencia de la cadena alfa5 disfuncional hace que falle el ensamblaje de todo el complejo de colágeno IV, y ninguna de estas tres cadenas es detectable ni en la membrana basal glomerular ni tubular renal. El SALX también puede diagnosticarse mediante inmunotinción de muestras de biopsia de piel para detectar colágeno tipo IV. Específicamente, sólo se expresa normalmente alfa5 en la piel, por lo que el sello distintivo de SALX en una biopsia de piel es la ausencia de tinción de alfa5.

Por tanto, las pruebas de diagnóstico convencionales incluyen una combinación de análisis de orina (para detectar hematuria y proteinuria), estudios hematológicos (para evaluar la insuficiencia renal), biopsia de riñón o piel (para evaluar anomalías ultraestructurales), pruebas genéticas (para detectar mutaciones en COL4A3, COL4A4 o COL4A5), audiometría (para detectar sordera neurosensible), examen oftálmico (para detectar y controlar lenticono anterior, queratocono, cataratas, distrofia corneal polimorfa posterior, manchas retinianas y otras lesiones oculares) y ecografía renal. Gregory *et al.*, *Contrib Nephrol*, 117: 1-28 (1996) proporcionan los siguientes 10 criterios, de los cuales deben cumplirse 4 para el diagnóstico del síndrome de Alport:

Antecedentes familiares de nefritis de hematuria no filiada en un pariente de primer grado del probando inicial o

en un pariente masculino relacionado a través de cualquier número de mujeres;

Hematuria persistente sin evidencia de otra nefropatía posiblemente heredada, tal como enfermedad de la membrana basal glomerular delgada, enfermedad renal poliquística o nefropatía por IgA;

5 Sordera neurosensible bilateral en el intervalo de 2000 a 8000 Hz. La hipoacusia se desarrolla gradualmente, no está presente en la primera infancia y se presenta habitualmente antes de los 30 años;

Una mutación en COL4A3, COL4A4 o COL4A5;

Evidencia inmunohistoquímica de falta total o parcial del epítipo de Alport en las membranas basales glomerulares o epidérmicas, o ambas;

Anomalías ultraestructurales generalizadas de la MBG, en particular engrosamiento, adelgazamiento y división;

10 Lesiones oculares incluyendo lenticono anterior, queratocono, catarata subcapsular posterior, distrofia polimorfa posterior y manchas retinianas;

Progresión gradual a enfermedad renal terminal en el probando inicial de al menos dos miembros de la familia;

Macrotrombocitopenia o inclusiones granulocíticas, similar a la anomalía de May-Hegglin; y

Leiomiomatosis difusa de esófago o genitales femeninos, o ambos.

15 Los pacientes con síndrome de Alport también muestran niveles en orina aberrantes de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal. Además, los niveles de diversas combinaciones de biomarcadores en orina son significativamente diferentes entre pacientes con síndrome de Alport y sujetos sanos. Por ejemplo, varias combinaciones de tres parámetros (fibronectina, miosina 10 y MMP-2 o MMP-9) y dos (miosina 10 y MMP-2 o MMP-9) discriminan significativamente entre controles sanos y pacientes con síndrome de Alport, lo que permite el diagnóstico precoz del síndrome de Alport.

Tratamientos actuales

25 Los inhibidores de la ECA o BRA se administran generalmente a pacientes con síndrome de Alport que tienen proteinuria con o sin hipertensión. Ambas clases de fármacos ayudan aparentemente a reducir la proteinuria al disminuir la presión intraglomerular. Además, al inhibir la angiotensina II, un factor de crecimiento implicado en la esclerosis glomerular, estos fármacos tienen un papel potencial en la ralentización de la progresión esclerótica. Los BRA que se han usado para tratar pacientes con síndrome de Alport incluyen, pero no se limitan a, losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, telmisartán e irbesartán. Los ejemplos de inhibidores de la ECA incluyen captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril, perindopril, ramipril y randolapril. Los inhibidores de la ECA generalmente no se recetan a pacientes embarazadas porque pueden provocar defectos congénitos. Los efectos secundarios más frecuentes son tos, niveles elevados de potasio en sangre, hipotensión arterial, mareos, dolor de cabeza, somnolencia, debilidad, sabor anómalo (sabor metálico o salado) y sarpullido. Los efectos secundarios más graves, pero raros, de los inhibidores de la ECA son insuficiencia renal, reacciones alérgicas, disminución de los glóbulos blancos e inflamación de los tejidos (angioedema).

35 La intervención terapéutica en la insuficiencia renal también puede lograrse mediante la administración de inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolímús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopectidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β 1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPAR γ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxoleano-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) e inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (por ejemplo, BAY-12-9566).

45 Los ejemplos de inhibidores de la HMG-CoA reductasa incluyen, pero no se limitan a, lovastatina (por ejemplo, ADVICOR[®] (niacina de liberación prolongada/lovastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), ALTOPREV[™] (lovastatina de liberación prolongada) (Shiongi, Inc., Atlanta, GA), MEVACOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ), atorvastatina (por ejemplo, CADUET[®] (amlodipino y atorvastatina) (Pfizer, Morrisville, PA), LIPITOR[®] (Pfizer, Morrisville, PA)), rosuvastatina y/o rosuvastatina cálcica (por ejemplo, CRESTOR[®] (AstraZeneca, Londres, Inglaterra)), simvastatina (por ejemplo, JUVISYNC[®] (sitagliptina/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ)), SIMCOR[®] (niacina de liberación prolongada/simvastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), VYTORIN[®] (ezetimiba/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ) y ZOCOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ)), fluvastatina y/o fluvastatina sódica (por ejemplo, LESCOL[®], LESCOL XL (fluvastatina de liberación prolongada) (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV)), pitavastatina (por ejemplo, LIVALO[®] (Kowa Pharmaceuticals, Montgomery, AL)), pravastatina y/o pravastatina sódica (por ejemplo, PRAVACHOL[®] (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY)).

Los inhibidores de la aldosterona incluyen espironolactona (Aldactone®), eplerenona (Inspra®), canrenona (canrenoato de potasio), prorrenona (prorenoato de potasio) y mexrenona (mexrenoato de potasio).

5 El trasplante de riñón generalmente se ofrece a pacientes con síndrome de Alport que desarrollan enfermedad renal terminal (ERT). No se produce enfermedad recurrente en el riñón trasplantado y la tasa de supervivencia del aloinjerto en estos pacientes es similar a la de los pacientes con otras enfermedades renales. Sin embargo, se desarrolla nefritis anti-membrana basal glomerular (anti-MBG) en un pequeño porcentaje de pacientes trasplantados con síndrome de Alport.

Terapia

El siguiente análisis se presenta a modo de ejemplo únicamente y no pretende ser limitativo.

10 La divulgación se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5. La divulgación también se refiere al tratamiento del síndrome de Alport. Al sujeto se le puede haber diagnosticado que tiene, se sospecha que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4
15 y COL4A5. Adicional o alternativamente, en algunas realizaciones, al sujeto se le diagnostica que tiene síndrome de Alport. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos que comprenden el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, a un sujeto que se sospecha o que ya padece tal enfermedad o afección (tal como, por ejemplo, sujetos que presentan niveles y/o función aberrantes de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal y/o un sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o un sujeto al que se le ha diagnosticado síndrome de Alport), en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la
20 enfermedad.

Los sujetos que padecen una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 y/o sujetos que padecen el síndrome de Alport pueden identificarse mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. Por ejemplo, los síntomas típicos del síndrome de Alport incluyen, entre otros,
30 hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensitiva, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, pérdida de visión, fotofobia, queratocono y leiomiomatosis.

El sujeto puede presentar niveles o función aberrantes de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal, lo que puede medirse usando técnicas conocidas en la técnica. El sujeto puede presentar una o más mutaciones en COL4A3, COL4A4 y COL4A5, que están implicadas en la producción o el ensamblaje de fibras de colágeno de tipo IV y pueden detectarse usando técnicas conocidas en la técnica.
40

Los sujetos con una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o sujetos que padecen el síndrome de Alport que se tratan con el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden mostrar una mejora o eliminación de uno o más de los siguientes
45 síntomas: hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensitiva, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de
50 visión, queratocono y leiomiomatosis. Los sujetos con una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o síndrome de Alport que se tratan con el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden mostrar la normalización de uno o más de los niveles en orina de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en al menos un 10% en comparación con los sujetos con síndrome de Alport no tratados. Los sujetos con una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 y/o un sujeto que padece el síndrome de Alport que se tratan con el péptido aromático-catiónico pueden mostrar niveles de expresión de MMP-9 en células mesangiales que son similares a los observados en un sujeto de control normal.
55

Tratamiento profiláctico

La divulgación se refiere a prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5. La divulgación también se refiere a prevenir o retrasar la aparición del síndrome de Alport.

5 Los sujetos con riesgo de niveles y/o función aberrantes de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal, incluyen aquellos en riesgo o susceptibles a una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o un sujeto en riesgo o susceptible al síndrome de Alport. Tales sujetos pueden identificarse mediante, por ejemplo, cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos de un péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, a un sujeto susceptible o en riesgo de padecer una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o un sujeto susceptible a o en riesgo de otro modo de padecer el síndrome de Alport, en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. La administración del péptido aromático-catiónico profiláctico puede producirse antes de la manifestación de síntomas característicos de la enfermedad o el trastorno, de tal manera que la enfermedad o el trastorno se previene o, alternativamente, se retrasa en su progresión.

Los sujetos con riesgo de niveles y/o función aberrantes de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en comparación con un sujeto de control normal, pueden estar en riesgo de o ser susceptibles a una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o sujetos en riesgo o susceptibles al síndrome de Alport.

Para aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas, se administra al sujeto una composición que comprende un péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato. La composición de péptidos puede administrarse una, dos, tres, cuatro o cinco veces al día. La composición de péptidos puede administrarse más de cinco veces al día. Adicional o alternativamente, la composición de péptidos puede administrarse todos los días, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días o cada seis días. La composición de péptidos puede administrarse semanalmente, quincenalmente, trisemanalmente o mensualmente. La composición de péptidos puede administrarse durante un periodo de una, dos, tres, cuatro o cinco semanas. El péptido puede administrarse durante seis semanas o más. El péptido puede administrarse durante doce semanas o más. El péptido puede administrarse durante un periodo de menos de un año. El péptido puede administrarse durante un periodo de más de un año. El péptido puede administrarse a lo largo de toda la vida del sujeto.

El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 1 semana o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 2 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 3 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 4 semanas o más, el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 6 semanas o más. El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente durante 12 semanas o más. El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse a lo largo de toda la vida del sujeto.

El tratamiento con el péptido aromático-catiónico puede prevenir o retrasar la aparición de uno o más de los siguientes síntomas: hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensorial, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis. Los niveles en orina de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en sujetos con una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o en sujetos que tienen síndrome de Alport. Los signos y síntomas de los sujetos tratados con el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden parecerse a los observados en controles sanos. Los sujetos con una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o síndrome de Alport que se tratan con el péptido aromático-catiónico pueden mostrar una expresión de MMP-9 en

células mesangiales que es similar a la observada en un sujeto de control normal.

Determinación del efecto biológico del agente terapéutico basado en péptido aromático-catiónico

- Pueden realizarse ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de un agente terapéutico específico basado en péptido aromático-catiónico y si su administración está indicada para el tratamiento. Pueden realizarse ensayos *in vitro* con modelos animales representativos, para determinar si un agente terapéutico basado en péptido aromático-catiónico dado ejerce el efecto deseado sobre la reducción o eliminación de signos y/o síntomas de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, y/o tener síndrome de Alport. Los compuestos para uso en terapia pueden someterse a prueba en sistemas de modelos animales adecuados incluyendo, pero sin limitarse a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos y similares, antes de las pruebas en sujetos humanos. De manera similar, para pruebas *in vivo*, puede usarse cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos. Las pruebas *in vitro* o *in vivo* están dirigidas a la función biológica de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.
- Pueden generarse modelos animales del síndrome de Alport usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, la generación de mutaciones al azar o dirigidas en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5. Por ejemplo, se han generado modelos murinos del síndrome de Alport ligado al cromosoma X y del síndrome de Alport autosómico recesivo mediante la alteración dirigida del gen Col4a5 de ratón y el gen Col4a3 de ratón, respectivamente. Véase Rheault *et al.*, J Am Soc Nephrol. 15(6): 1466-74 (2004)); Cosgrove *et al.*, Genes Dev. 10 (23): 2981-92 (1996)).
- Tales modelos pueden usarse para demostrar el efecto biológico del péptido aromático-catiónico de la presente tecnología, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, en la prevención y el tratamiento de afecciones que surgen de la alteración de un gen particular, y para determinar qué comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido en un contexto dado.

Modos de administración y dosificaciones eficaces

- Cualquier método conocido por los expertos en la técnica para poner en contacto una célula, un órgano o tejido con el péptido aromático-catiónico de la presente tecnología, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato. 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, adecuadamente un ser humano. Cuando se usa *in vivo* para terapia, se administran los péptidos aromático-catiónicos, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, 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 infección en el sujeto, las características del péptido aromático-catiónico particular usado, por ejemplo, su índice terapéutico, el sujeto y los antecedentes del sujeto.
- La cantidad eficaz puede determinarse durante los ensayos preclínicos y los ensayos clínicos mediante métodos con los que están familiarizados médicos y clínicos. Puede administrarse una cantidad eficaz de un péptido útil en los métodos a un mamífero que lo necesite 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 la administración a un paciente, tal como un mamífero (por ejemplo, sales que tienen una seguridad aceptable para mamíferos para un régimen de dosificación dado). Sin embargo, se entiende que no se requiere que las sales sean farmacéuticamente aceptables, tales como sales de compuestos intermedios que no están destinados a la administración a un paciente. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden derivarse de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables y de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Además, cuando un péptido contiene tanto un resto básico, tal como una amina, piridina o un imidazol, como un resto ácido, tal como un ácido carboxílico o tetrazol, pueden formarse zwitteriones y están incluidos dentro del término "sal" tal como se usa en el presente documento. Las sales derivadas de bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, de litio, magnesio, mangánicas, manganosas, de potasio, sodio y zinc, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, incluidas aminas sustituidas, aminas cíclicas, aminas que se producen de manera natural y similares, tales 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, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de ácidos bórico, carbónico, hidrácido halogenado (bromhídrico, clorhídrico, fluorhídrico o yodhídrico), nítrico, fosfórico, sulfámico y sulfúrico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables incluyen sales de hidroxiaácidos alifáticos (por ejemplo, ácidos cítrico, glucónico, glicólico, láctico, lactobiónico, málico y tartárico), ácidos monocarboxílicos alifáticos (por ejemplo, ácidos 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), hidroxiaácidos aromáticos (por ejemplo, ácidos o-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzoico, 1-hidroxinaftaleno-2-carboxílico y 3-hidroxinaftaleno-2-carboxílico), ascórbico, ácidos dicarboxílicos (por ejemplo, ácidos fumárico, maleico, oxálico y succínico), glucurónico, mandélico, múxico, nicotínico, orótico, pamoico, pantoténico, sulfónico (por ejemplo, ácidos bencenosulfónico, canforsulfónico, edisílico, etanosulfónico, isetiónico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, naftaleno-2,6-disulfónico y p-toluenosulfónico), xinafoico y similares. La sal puede ser una sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.

El péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, puede incorporarse en composiciones farmacéuticas para su administración, individualmente o en combinación, a un sujeto para el tratamiento o la prevención de un trastorno 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 de retardo 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 que sean compatibles con su vía de administración pretendida. 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 etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples compuestos por vidrio o plástico. Por conveniencia del paciente o del médico responsable, la formulación de dosificación puede proporcionarse en un kit que contiene todo el equipo necesario (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 uso inyectable pueden incluir disoluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones 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 en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las composiciones de péptidos aromático-catiónicos 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. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede impedirse la acción de los microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomerasol y similares. Pueden incluirse glutatión y otros antioxidantes para impedir la oxidación. En muchos casos, será ventajoso incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede conseguirse una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase 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 los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados 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, que pueden producir un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Con el propósito 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 materiales adyuvantes y/o agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, cápsulas, los trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes o compuestos de 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 saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

5 Para la administración por inhalación, los compuestos pueden administrarse en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado, que contiene un propulsor 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.

10 La administración sistémica de un compuesto terapéutico tal como se describe en el presente documento también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica. La administración transdérmica puede realizarse mediante iontoforesis.

15 Puede formularse una proteína o un péptido terapéutico en un sistema portador. El portador puede ser un sistema coloidal. El sistema coloidal puede ser un liposoma, un vehículo de bicapa de fosfolípidos. El péptido terapéutico puede encapsularse en un liposoma mientras se mantiene la integridad del péptido. Un experto en la técnica apreciará que existe una variedad de métodos para preparar liposomas. (véase, Lichtenberg *et al.*, *Methods Biochem. Anal.*, 33: 337-462 (1988).; Anselem, *et al.*, *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). Las formulaciones liposomales pueden retrasar el aclaramiento y aumentar la captación celular (véase, Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8): 915-923 (2000)).
20 También puede cargarse un agente activo en una partícula preparada a partir de componentes farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero sin limitarse a, polímeros o liposomas 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.

25 El portador también puede ser un polímero, por ejemplo, una matriz de polímero biodegradable y biocompatible. El péptido terapéutico puede incrustarse en la matriz de polímero, mientras se mantiene la integridad de la 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. El polímero es poli(ácido láctico) (PLA) o copoli(ácido láctico/glicólico) (PGLA). Las matrices poliméricas pueden prepararse y aislar en una variedad de formas y tamaños, incluyendo microesferas y nanoesferas. Las formulaciones poliméricas pueden conducir a una duración prolongada del efecto terapéutico. (véase, Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8): 915-923 (2000)). En ensayos clínicos se ha usado una formulación de polímero para la hormona del crecimiento humana (hGH). (véase, Kozarich y Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552 (1998)).

35 Se describen ejemplos de formulaciones de liberación sostenida de microesferas poliméricas en la publicación PCT WO 99/15154 (Tracy, *et al.*), las patentes estadounidenses n.ºs 5.674.534 y 5.716.644 (ambas concedidas a Zale, *et al.*), la publicación PCT WO 96/40073 (Zale, *et al.*), y la 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 se estabilizan frente a la agregación con una sal.

40 Los compuestos terapéuticos se preparan con portadores que protegerán a los compuestos terapéuticos frente a la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhidridos, 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 liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células específicas con anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de células) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos 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.

50 Los compuestos terapéuticos también pueden formularse para potenciar la administración intracelular. Por ejemplo, se conocen en la técnica sistemas de administración liposomales, véanse, 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), describe el uso de liposomas fusogénicos para administrar una proteína a las células tanto *in vivo* como *in vitro*.

La dosificación, la toxicidad y la eficacia terapéutica de cualquier agente terapéutico 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 los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Son ventajosos los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Aunque pueden usarse compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y los estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos puede estar 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 la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Normalmente, una cantidad eficaz del péptido aromático-catiónico, suficiente para lograr un efecto terapéutico o profiláctico, oscila entre 0,000001 mg por kilogramo de peso corporal al día y 10.000 mg por kilogramo de peso corporal al día. De manera adecuada, los intervalos de dosificación son desde 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal al día hasta 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. Una dosificación única de péptido puede oscilar entre 0,001 y 10.000 microgramos por kg de peso corporal. Las concentraciones de péptido aromático-catiónico en un portador pueden oscilar entre 0,2 y 2000 microgramos por mililitro administrado. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez al día o una vez a la semana. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, o hasta que el sujeto muestra una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede definirse como una concentración de péptido en el tejido diana de 10⁻¹² a 10⁻⁶ molar, por ejemplo, 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 programa de dosis se optimizaría para mantener la concentración terapéutica en el tejido diana, por ejemplo, mediante una única administración diaria o semanal, pero también incluyendo la administración continua (por ejemplo, infusión parenteral o aplicación transdérmica).

El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el momento requeridos para tratar eficazmente a un sujeto incluyendo, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la 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 la presente divulgación, incluyendo la invención, 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. El mamífero puede ser un ser humano.

Terapia de combinación con péptidos aromático-catiónicos

El péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, puede combinarse con una o más terapias adicionales para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5. El péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, puede combinarse con una o más terapias adicionales para la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la ECA, BRA, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopeptidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPARγ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y BAY-12-9566.

Los inhibidores de la ECA pueden seleccionarse del grupo que consiste en captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril,

perindopril, ramipril, espirapril, randolapril y sales aceptables de tales compuestos.

Los BRA pueden seleccionarse del grupo que consiste en losartán, candesartán, valsartán, eprosartán, telmisartán e irbesartán.

- 5 Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (o estatinas) se seleccionan del grupo que consiste en lovastatina (por ejemplo, ADVICOR[®] (niacina de liberación prolongada/lovastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), ALTOPREV[™] (lovastatina de liberación prolongada) (Shiongi, Inc., Atlanta, GA), MEVACOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ), atorvastatina (por ejemplo, CADUET[®] (amlodipino y atorvastatina) (Pfizer, Morrisville, PA), LIPITOR[®] (Pfizer, Morrisville, PA)), rosuvastatina y/o rosuvastatina cálcica (por ejemplo, CRESTOR[®] (AstraZeneca, Londres, Inglaterra)), simvastatina (por ejemplo, JUVISYNC[®] (sitagliptina/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ)),
- 10 SIMCOR[®] (niacina de liberación prolongada/simvastatina) (AbbVie Pharmaceuticals, Chicago, Illinois), VYTORIN[®] (ezetimiba/simvastatina) (Merck, Whitehouse Station, NJ) y ZOCOR[®] (Merck, Whitehouse Station, NJ)), fluvastatina y/o fluvastatina sódica (por ejemplo, LESCOL[®], LESCOL XL (fluvastatina de liberación prolongada) (Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, WV)), pitavastatina (por ejemplo, LIVALO[®] (Kowa Pharmaceuticals, Montgomery, AL)), pravastatina y pravastatina sódica (por ejemplo, PRAVACHOL[®] (Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY)).
- 15 Los inhibidores de la aldosterona se seleccionan del grupo que consiste en espironolactona (Aldactone[®]), eplerenona (Inspra[®]), canrenona (canrenoato de potasio), prorretona (prorretonato de potasio) y mexrenona (mexrenoato de potasio).

Puede administrarse un agente terapéutico adicional a un sujeto en combinación con el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de modo que se produzca un efecto terapéutico sinérgico. Por ejemplo, la administración del péptido con uno o más agentes terapéuticos adicionales para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 tendrá efectos mayores que los aditivos en la prevención o el tratamiento de la enfermedad. Adicional o alternativamente, la administración del péptido con uno o más agentes terapéuticos adicionales para la prevención o el tratamiento del síndrome de Alport tendrá efectos mayores que los aditivos en la prevención o el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, pueden usarse menores dosis de uno o más agentes terapéuticos para tratar o prevenir una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 dando como resultado una mayor eficacia terapéutica y una disminución de los efectos secundarios. Adicional o alternativamente, pueden usarse menores dosis de uno o más de los agentes terapéuticos para tratar o prevenir el síndrome de Alport, dando como resultado una mayor eficacia terapéutica y una disminución de los efectos secundarios. El péptido puede administrarse en combinación con uno o más inhibidores de la ECA, BRA, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolimús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentan, tezotentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopeptidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPARγ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y/o BAY-12-9566, de tal manera que pueda resultar un efecto sinérgico en la prevención o el tratamiento.

20

25

30

35

40

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

45

Ejemplos

La presente tecnología se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos en modo alguno.

50

Ejemplo 1 - Uso de péptidos aromático-catiónicos en el tratamiento del síndrome de Alport en seres humanos

Este ejemplo demuestra el uso del péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, en el tratamiento del síndrome de Alport.

55 Métodos

Los sujetos con sospecha o diagnóstico de síndrome de Alport reciben administraciones diarias de una disolución al 1%, el 5% o el 10% de péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento o la prevención del síndrome de Alport. Los péptidos y/o agentes terapéuticos adicionales se administran por vía oral, de manera tópica, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía intramuscular según métodos conocidos en la técnica. Se evaluará a los sujetos semanalmente para determinar la presencia y/o la intensidad de los signos y síntomas asociados con el síndrome de Alport incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis. Los tratamientos se mantienen hasta el momento en que se mejoran o eliminan uno o más signos o síntomas del síndrome de Alport.

Resultados

Se predice que los sujetos con sospecha de tener o diagnóstico de que tienen síndrome de Alport y que reciben cantidades terapéuticamente eficaces del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, mostrará una intensidad reducida o la eliminación de los síntomas asociados con el síndrome de Alport. También se espera que los sujetos con síndrome de Alport tratados con el péptido aromático-catiónico muestren una normalización de uno o más de los niveles en orina de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en al menos un 10% en comparación con los controles del síndrome de Alport no tratados. Además, se espera que la administración de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales tendrá efectos sinérgicos a este respecto en comparación con los observados en sujetos tratados con los péptidos aromático-catiónicos o los agentes terapéuticos adicionales solos.

Estos resultados mostrarán que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en el tratamiento del síndrome de Alport. Estos resultados mostrarán que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en la mejora de uno o más de los siguientes síntomas: hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis. Por consiguiente, el péptido puede administrarse a un sujeto que lo necesite para el tratamiento del síndrome de Alport.

Ejemplo 2 - Uso de péptidos aromático-catiónicos en la prevención del síndrome de Alport en seres humanos

Este ejemplo demuestra el uso del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, en la prevención del síndrome de Alport.

Métodos

Los sujetos con riesgo de tener síndrome de Alport reciben administraciones diarias de una disolución al 1%, el 5% o el 10% del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento o la prevención del síndrome de Alport. Los péptidos y/o agentes terapéuticos adicionales se administran por vía oral, de manera tópica, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía intramuscular según métodos conocidos en la técnica. Se evaluará a los sujetos semanalmente para determinar la presencia y/o la intensidad de los signos y síntomas asociados con el síndrome de Alport incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis.

Resultados

Se predice que los sujetos en riesgo de tener o con diagnóstico de que tienen el síndrome de Alport y que reciben cantidades terapéuticamente efectivas del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, presentarán una aparición retardada del síndrome de Alport, o la prevención de la aparición del síndrome de Alport. También se espera que los niveles en orina de uno o más de ADAM8, fibronectina, miosina 10, MMP-2, MMP-9 y podocina en sujetos con

síndrome de Alport tratados con el péptido aromático-catiónico se asemejen a los de controles sanos. Además, se espera que la administración de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales tendrá efectos sinérgicos a este respecto en comparación con los observados en sujetos tratados con péptidos aromático-catiónicos o los agentes terapéuticos adicionales solos.

- 5 Estos resultados mostrarán que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en la prevención del síndrome de Alport. Estos resultados mostrarán que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato son útiles para prevenir o retrasar la aparición de uno o más de los siguientes síntomas: hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensorial, lenticón anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis.
- 10
- 15 Por consiguiente, los péptidos pueden administrarse a un sujeto que lo necesite para la prevención del síndrome de Alport.

Ejemplo 3 - Uso de péptidos aromático-catiónicos en el tratamiento del síndrome de Alport en un modelo de ratón

- Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, en el tratamiento del síndrome de Alport en un modelo de ratón.
- 20

Métodos

En este estudio se usaron ratones nulos para Col4a3 homocigotos macho y compañeros de camada silvestres. Se dividieron los sujetos en los siguientes grupos:

- (1) Controles silvestres sanos
- 25 (2) Ratones nulos para Col4a3 tratados con agua
- (3) Ratones nulos para Col4a3 tratados con 1 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂
- (4) Ratones nulos para Col4a3 tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂
- (5) Ratones nulos para Col4a3 tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (grupo de farmacocinética)

- La figura 2 ilustra el protocolo general para el estudio del síndrome de Alport. Se formuló D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en agua y se administró una vez al día mediante inyección subcutánea en bolo o bien a 1 o bien a 5 mg/kg a partir de las 5 semanas de edad. Los grupos (1) - (4) consistieron en 16 ratones, de los cuales 10 se usaron para estudios de tasa de supervivencia y 6 para análisis de anatomía patológica y ARN/proteínas. El grupo (5) consistió en 6 ratones, 3 de los cuales fueron sacrificados a los 30 minutos después de la 7ª inyección (edad, 6 semanas) y 3 a las 24 horas después de la 7ª inyección (edad, 6 semanas).
- 30

- 35 Se recogieron muestras de orina y sangre (suero) cada 2 semanas en las semanas 5, 7, 9, 11, 13 y 15.

Se sacrificaron seis animales de los grupos experimentales (1) - (4) para la recogida de tejido en la semana 15. Se extrajo un riñón de cada animal para análisis de proteína/ARN y se recogió el segundo riñón para secciones en parafina para análisis a través de microscopía. Se recopilaron datos de supervivencia para los 10 animales restantes en los grupos (1) - (4).

- 40 **Histología renal:** Para la microscopía óptica, se fijó un subconjunto de riñones de cada grupo (n = 3) en paraformaldehído al 4%, se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones. Se tiñeron secciones de tres micrómetros con tinción de hematoxilina y eosina (tinción H&E) o reactivo de Schiff-ácido peryódico para evaluar las puntuaciones patológicas globales con respecto al daño de los glomérulos, daño tubular, inflamación intersticial y fibrosis intersticial.

- 45 **Función renal:** Se evaluó la función renal midiendo el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el cociente albúmina/creatinina en orina (ACR).

- Análisis de rutas mitocondriales:** Se extirparon los riñones, se sumergieron en OCT y se congelaron rápidamente en vapor de nitrógeno líquido. Se colocaron secciones de criostato de cinco micrómetros en portaobjetos y se fijaron posteriormente en acetona. Se sometieron los tejidos a inmunotinción con anticuerpos contra las proteínas Drp1, Mfn1, OPA1 y Txn2 usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Además, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de SOD1 y SOD2 a través de q-RT-PCR.
- 50

Resultados

5 Tal como se muestra en la figura 3A, el tratamiento con 1 mg/kg o 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ no afectó a la tasa de supervivencia de los ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport); la administración de péptidos no fue dañina. Los niveles de BUN de ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) aumentaron progresivamente entre las 7 semanas de edad y las 15 semanas de edad en comparación con los ratones silvestres (figura 3B). El tratamiento con 1 mg/kg o 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ no afectó a los niveles de BUN en ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) a las 15 semanas de edad. Véanse las figuras 3B y 3C.

10 Tal como se muestra en las figuras 4A-4C, los ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) presentaron daño tubular, inflamación intersticial y fibrosis intersticial en comparación con controles silvestres. Las figuras 4A-4C demuestran que los ratones nulos para Col4a3 que recibieron 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ mostraron una reducción de la intensidad del daño tubular, la inflamación intersticial y fibrosis intersticial. Por ejemplo, el 66% (4/6) de los ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) presentaron una puntuación de patología tubular de 3 o más, mientras que sólo el 33% (2/6) de los ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ presentó las mismas puntuaciones. Véase la figura 4A. Según la figura 4B, el 66% (4/6) de los ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) presentaron una puntuación de intensidad de inflamación intersticial de 3. En cambio, ninguno de los ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ presentó la misma intensidad de inflamación intersticial (0/6 tenía una puntuación de intensidad de inflamación intersticial de 3). La figura 4C muestra que el 66% (4/6) de los ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) presentaron una puntuación de intensidad de fibrosis intersticial de 3, mientras que sólo el 17% (1/6) de los ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ presentaron la misma puntuación de intensidad para la fibrosis intersticial.

Las figuras 5A-5C demuestran que el tratamiento con 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eleva significativamente la expresión de Mfn1 y Txn2 en ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) en comparación con ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport).

25 Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, los ratones nulos para Col4a3 no tratados (ratones Alport) presentan una reducción significativa de la expresión de ARNm de SOD1 y SOD2 en comparación con controles silvestres. El tratamiento con 1 mg/kg o 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ no logró rescatar los niveles reducidos de expresión de ARNm de SOD1 y SOD2 observados en ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport). Véanse las figuras 6A y 6B.

30 La figura 7 muestra los niveles plasmáticos de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) tratados con (a) 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 6 semanas de edad, (b) 1 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad, y (c) 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad. Se evaluaron los niveles plasmáticos de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 30 minutos después de la última inyección. Los ratones nulos para Col4a3 (ratones Alport) que recibieron inyecciones diarias de 5 mg/kg de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ a las 15 semanas de edad mostraron los mayores niveles plasmáticos de D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂. Véase la figura 7.

40 Estos resultados muestran que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en el tratamiento del síndrome de Alport. Estos resultados también demuestran que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en la mejora de la intensidad del daño tubular, la inflamación intersticial y la fibrosis intersticial en sujetos que tienen riesgo de desarrollar el síndrome de Alport.

Por consiguiente, el péptido puede administrarse a un sujeto que lo necesite para el tratamiento del síndrome de Alport.

45 Ejemplo 4 - Uso de péptidos aromático-catiónicos en el tratamiento de una afección caracterizada por la expresión disminuida de Col4a4 y Col4a5

Este ejemplo demostrará la eficacia *in vivo* del péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, en el tratamiento de la deficiencia en la expresión de COL4A4 y COL4A5 en modelos de ratón.

50 Métodos

En este estudio se usarán ratones homocigotos macho que tienen una expresión disminuida de Col4a4 o Col4a5 y compañeros de camada silvestres. Se dividirán los sujetos en los siguientes grupos:

- (1) Controles silvestres sanos
- (2) Ratones deficientes en Col4a4 y Col4a5 tratados con agua

- (3) Ratones deficientes en Col4a4 y Col4a5 tratados con 1 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂
- (4) Ratones deficientes en Col4a4 y Col4a5 tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂
- (5) Ratones deficientes en Col4a4 y Col4a5 tratados con 5 mg/kg de D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (grupo de farmacocinética)
- 5 Se formulará D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ en agua y se administrará una vez al día mediante inyección subcutánea en bolo o bien a 1 o bien a 5 mg/kg a partir de las 5 semanas de edad. Los grupos (1) - (4) incluirán 16 ratones, de los cuales 10 se usarán para estudios de tasa de supervivencia y 6 para análisis de anatomía patológica y ARN/proteínas. El grupo (5) incluirá 6 ratones, 3 de los cuales se sacrificarán a los 30 minutos después de la 7ª inyección (edad, 6 semanas) y 3 a las 24 horas después de la 7ª inyección (edad, 6 semanas).
- 10 Se recogerán muestras de orina y sangre (suero) cada 2 semanas en las semanas 5, 7, 9, 11, 13 y 15.
- Se sacrificarán seis animales de los grupos experimentales (1) - (4) para la recogida de tejido en la semana 15. Se extraerá un riñón de cada animal para análisis de proteína/ARN y se recogerá el segundo riñón para secciones en parafina para análisis a través de microscopía. Se recopilarán datos de supervivencia para los 10 animales restantes en los grupos (1) - (4).
- 15 *Histología renal:* Para la microscopía óptica, se fijará un subconjunto de riñones de cada grupo (n = 3) en paraformaldehído al 4%, se incrustarán en parafina y se cortarán en secciones. Se teñirán secciones de tres micras con tinción de hematoxilina y eosina (tinción H&E) o reactivo de ácido periódico-Schiff para evaluar las puntuaciones patológicas generales con respecto al daño de los glomérulos, daño tubular, inflamación intersticial y fibrosis intersticial.
- 20 *Función renal:* Se evaluará la función renal midiendo el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y el cociente albúmina/creatinina en orina (ACR).
- Análisis de rutas mitocondriales:* Se extirparán los riñones, se sumergirán en OCT y se congelarán rápidamente en vapor de nitrógeno líquido. Se colocarán secciones de criostato de cinco micrómetros en portaobjetos y se fijarán posteriormente en acetona. Se someterán los tejidos a inmunotinción con anticuerpos contra las proteínas Drpl, Mfn1, OPA1 y Txn2 usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Adicionalmente, se analizarán los niveles de expresión de ARNm de SOD1 y SOD2 a través de q-RT-PCR.

Resultados

- Se prevé que estos resultados mostrarán que el péptido aromático-catiónico D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en el tratamiento de una enfermedad o afección de uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5. Estos resultados también demostrarán que el péptido aromático-catiónico, D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato, son útiles en la mejora de la intensidad de una o más deformaciones y/o irregularidades del colágeno, daño tubular, inflamación intersticial y/o fibrosis intersticial en sujetos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

Por consiguiente, el péptido puede administrarse a un sujeto que lo necesite para el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por una reducción de la función, un nivel de expresión disminuido de y/o una deficiencia en uno o más de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

REIVINDICACIONES

1. Péptido D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en (i) tratar o prevenir el síndrome de Alport en un sujeto que lo necesite, o (ii) reducir el riesgo de síndrome de Alport en un sujeto.
- 5 2. Péptido para el uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto alberga una mutación en uno o más de COL4A3, COL4A4 y COL4A5.
3. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el péptido está destinado a administrarse diariamente durante 6 semanas o más.
- 10 4. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el péptido se administra diariamente durante 12 semanas o más.
5. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se ha diagnosticado que el sujeto tiene síndrome de Alport.
- 15 6. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que los signos o síntomas del síndrome de Alport comprenden uno o más de hematuria, proteinuria, cilindruria, leucocituria, hipertensión, edema, microalbuminuria, disminución de la tasa de filtración glomerular, fibrosis intersticial, inflamación intersticial, daño tubular, anomalías ultraestructurales de la MBG, síndrome nefrótico, glomerulonefritis, enfermedad renal terminal, anemia crónica, macrotrombocitopenia, osteodistrofia, sordera neurosensible, lenticono anterior, retinopatía en punto y mancha, distrofia corneal polimorfa posterior, erosión corneal recurrente, adelgazamiento macular temporal, cataratas, lagrimeo, fotofobia, pérdida de visión, queratocono y leiomiomatosis.
- 20 7. Péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es humano.
8. Péptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido está destinado a administrarse por vía oral, de manera tópica, por vía intranasal, de manera sistémica, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía intraocular, de manera iontoforética, por vía transmucosa o por vía intramuscular.
- 25 9. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el péptido está destinado a administrarse por separado, secuencial o simultáneamente a uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 30 10. Péptido para el uso según la reivindicación 9, en el que los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II (inhibidores de la ECA), bloqueantes de receptores de angiotensina II (BRA), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la aldosterona, aliskireno, inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina A, tacrolímús), antagonistas de receptores de endotelina (por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán (LETAIRIS), atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán (TRACLEER), macitentán, tezosentán, BQ-788 y A192621), sulodexida, inhibidores de vasopeptidasas (por ejemplo, AVE7688), anticuerpo anti-factor de crecimiento transformante β 1, bloqueantes de receptores de quimiocinas 1, proteína morfogenética ósea-7, agonistas de PPAR γ (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, MRL24, Fmoc-L-Leu, SR1664, SR1824, GW0072, MCC555, CLX-0921, PAT5A, L-764406, nTZDpa, CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico), ragaglitazar, ácidos O-arilmandélicos y AINE) y BAY-12-9566.
- 35 11. Péptido para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal farmacéuticamente aceptable comprende sal de acetato, tartrato o trifluoroacetato.
- 40 12. Péptido para el uso según la reivindicación 11, en el que el tratamiento con péptidos da como resultado una expresión y/o función de Mfn1 elevadas en comparación con un sujeto con síndrome de Alport no tratado.

FIG. 1

Estadios de la nefropatía de Alport

Estadio 1 Hematuria

Estadio 2 Microalbuminuria

Estadio 3 Proteinuria

Estadio 4 Disminucion de
TFG

Estadio 5 ERT

Abreviaturas: TFG, tasa de filtración glomerular; ERT, enfermedad renal terminal

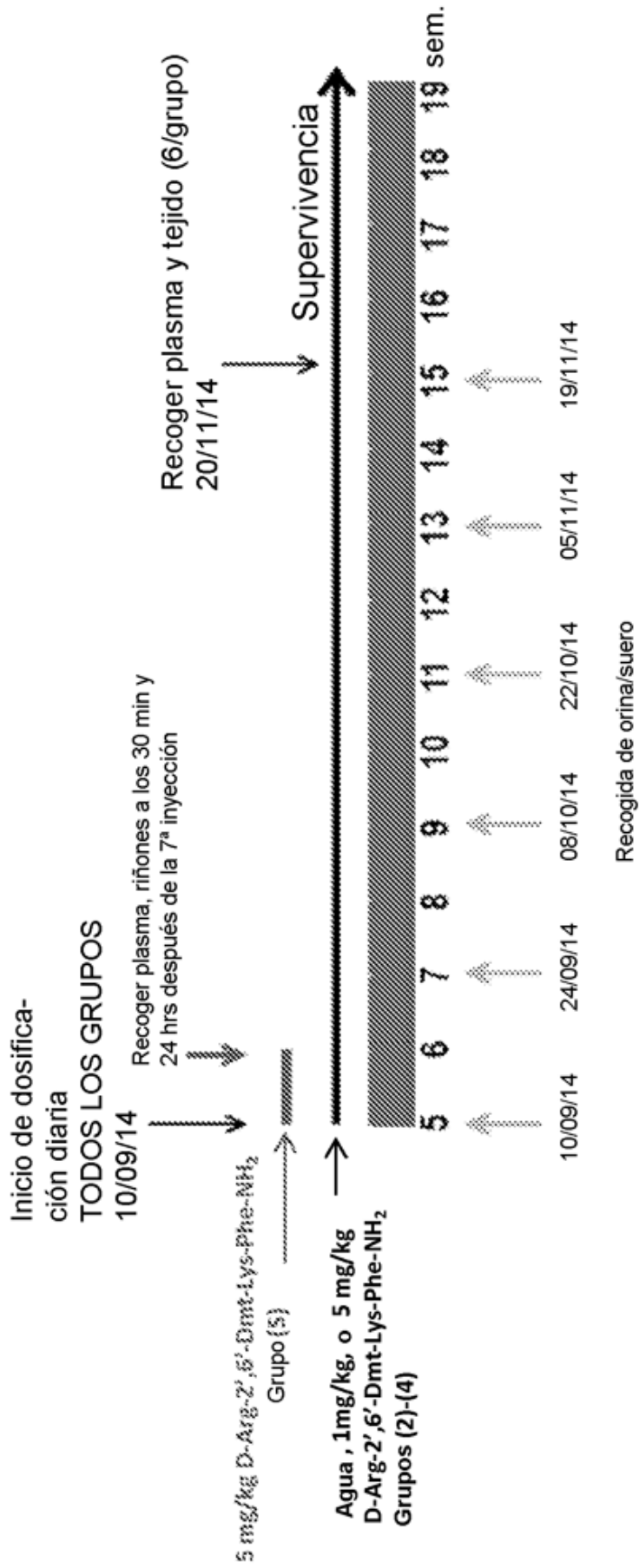


FIG. 2

FIG. 3A

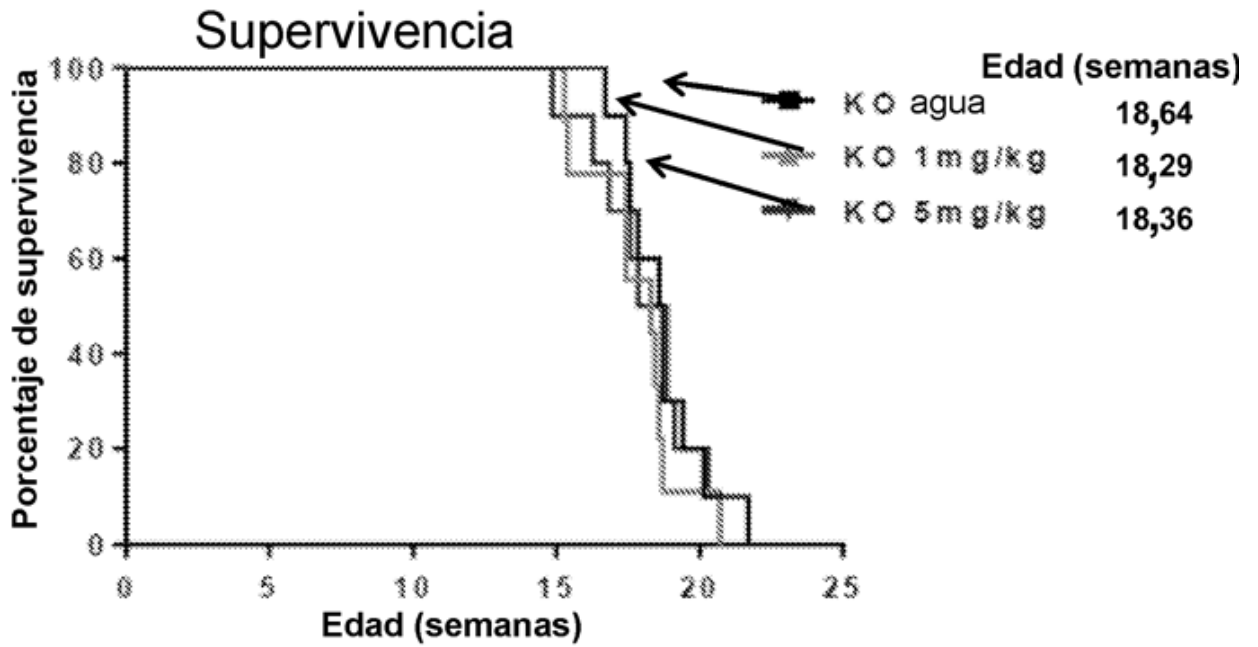


FIG. 3B

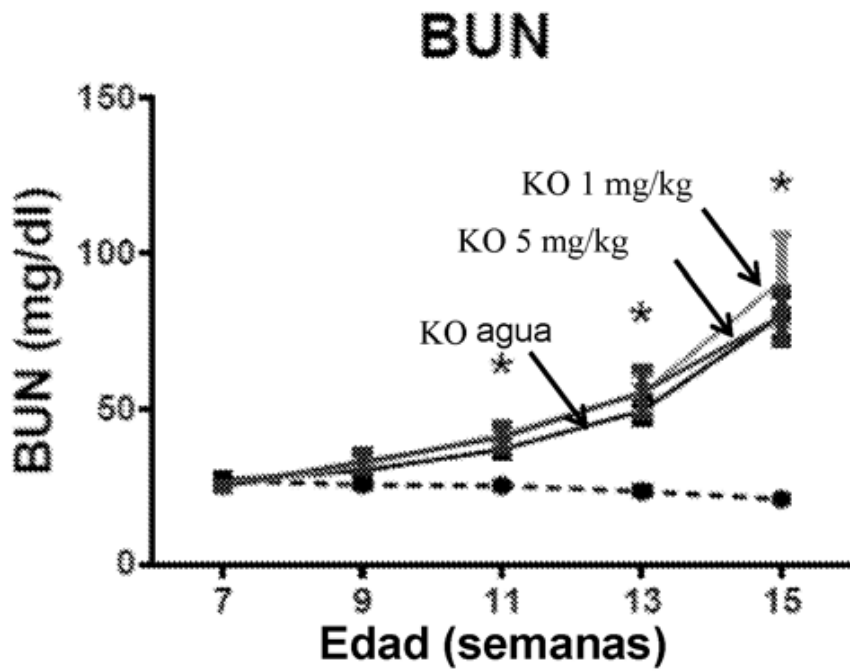


FIG. 3C

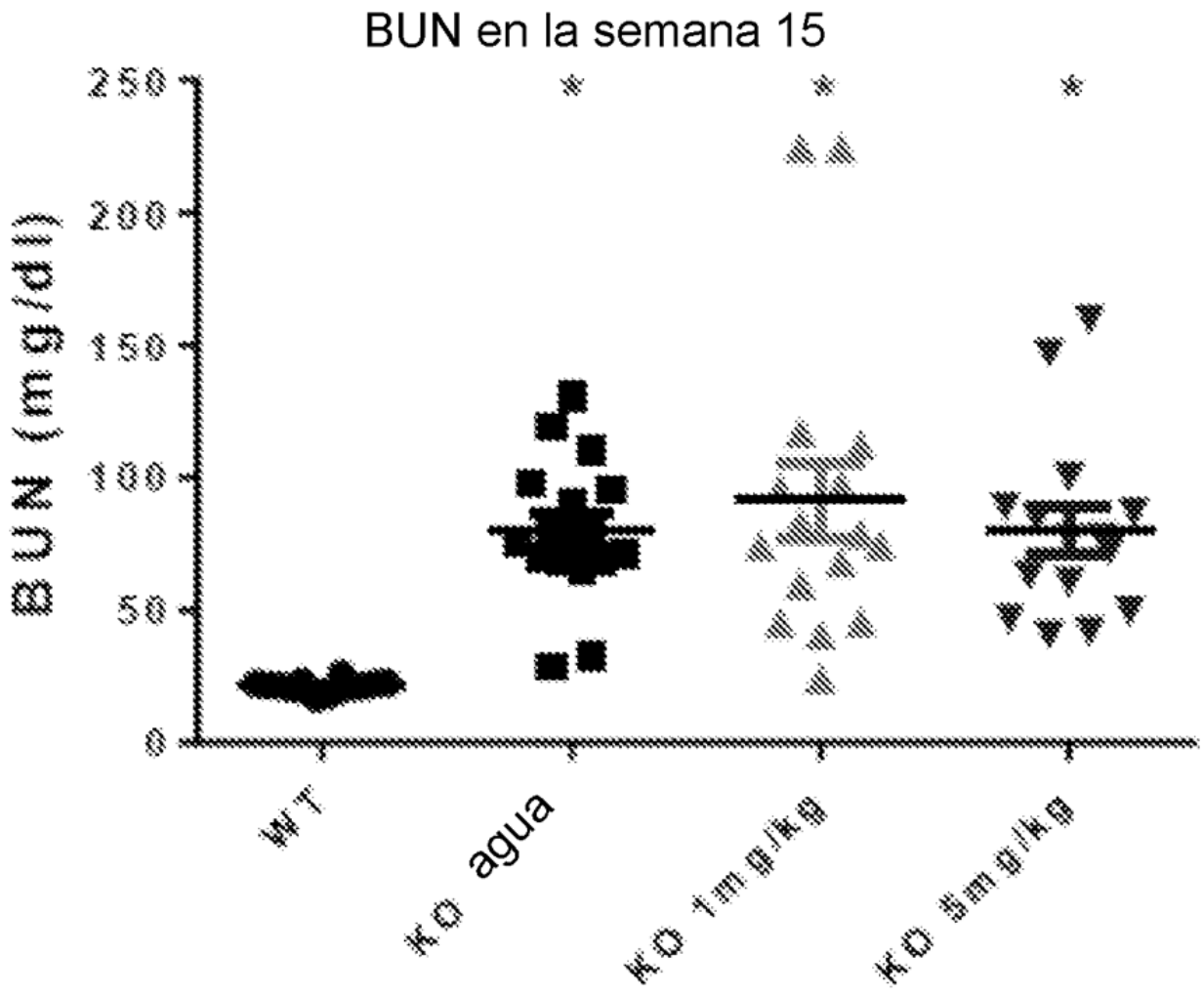


FIG. 4A

Patología tubular

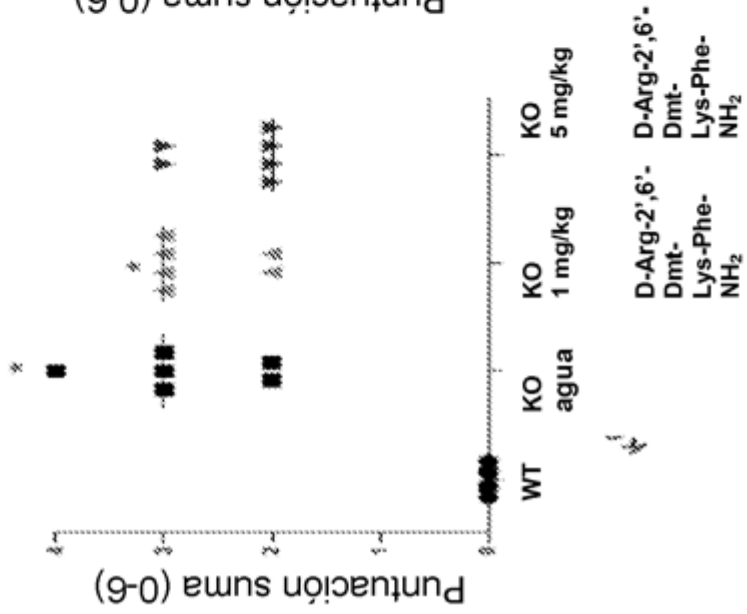


FIG. 4B

Inflamación intersticial

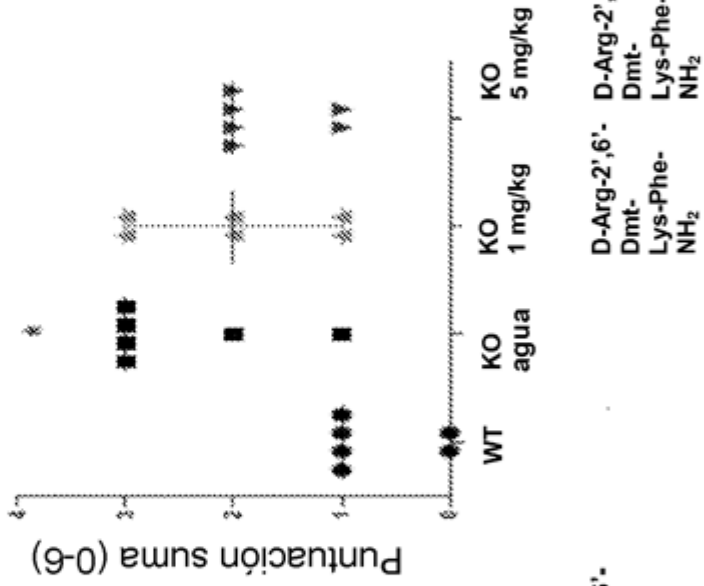


FIG. 4C

Fibrosis intersticial

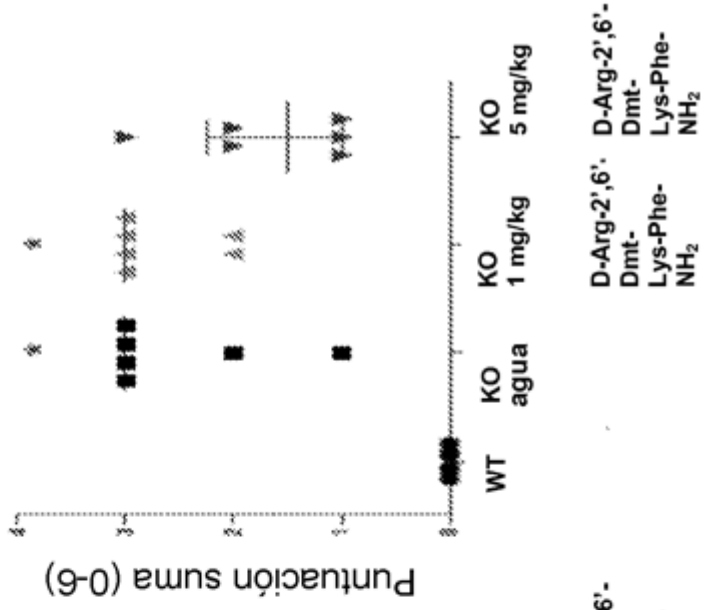


FIG. 5A

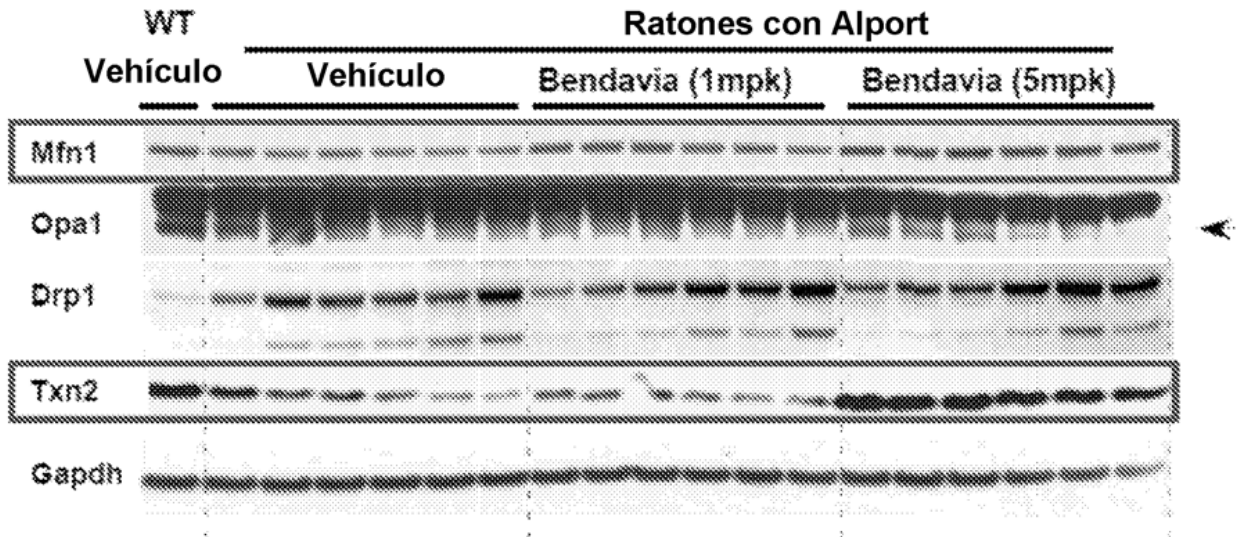


FIG. 5B

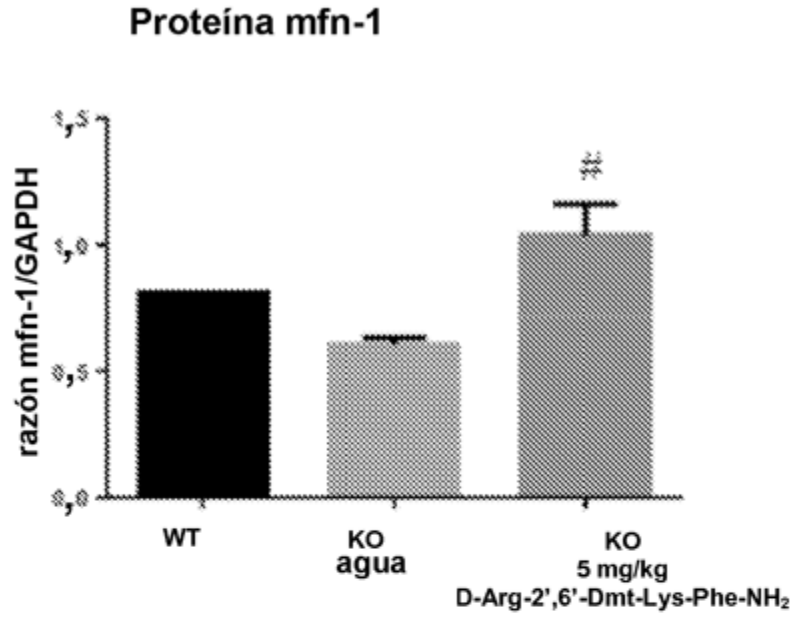


FIG. 5C

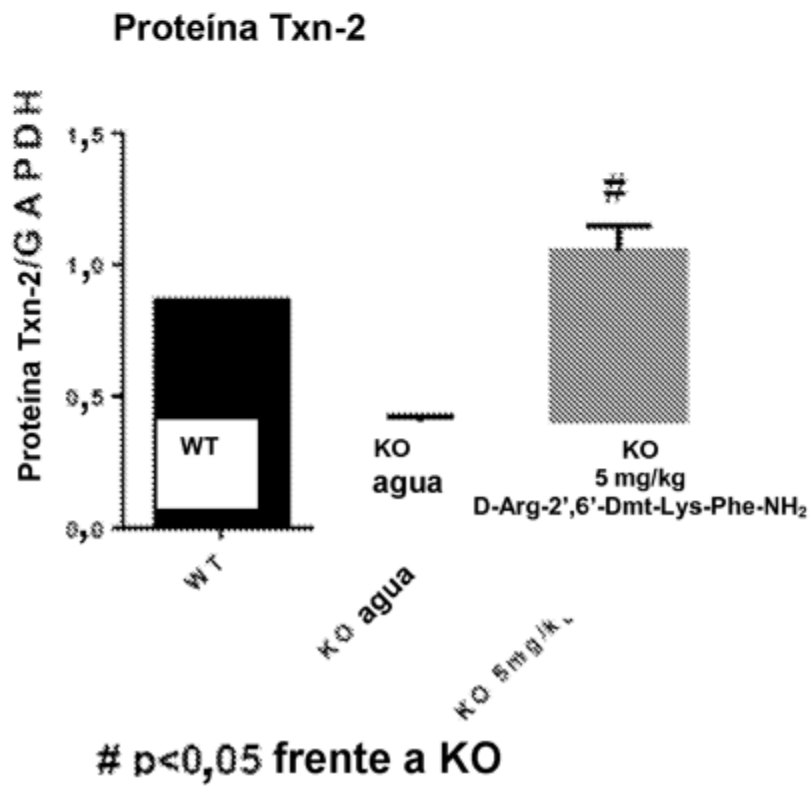
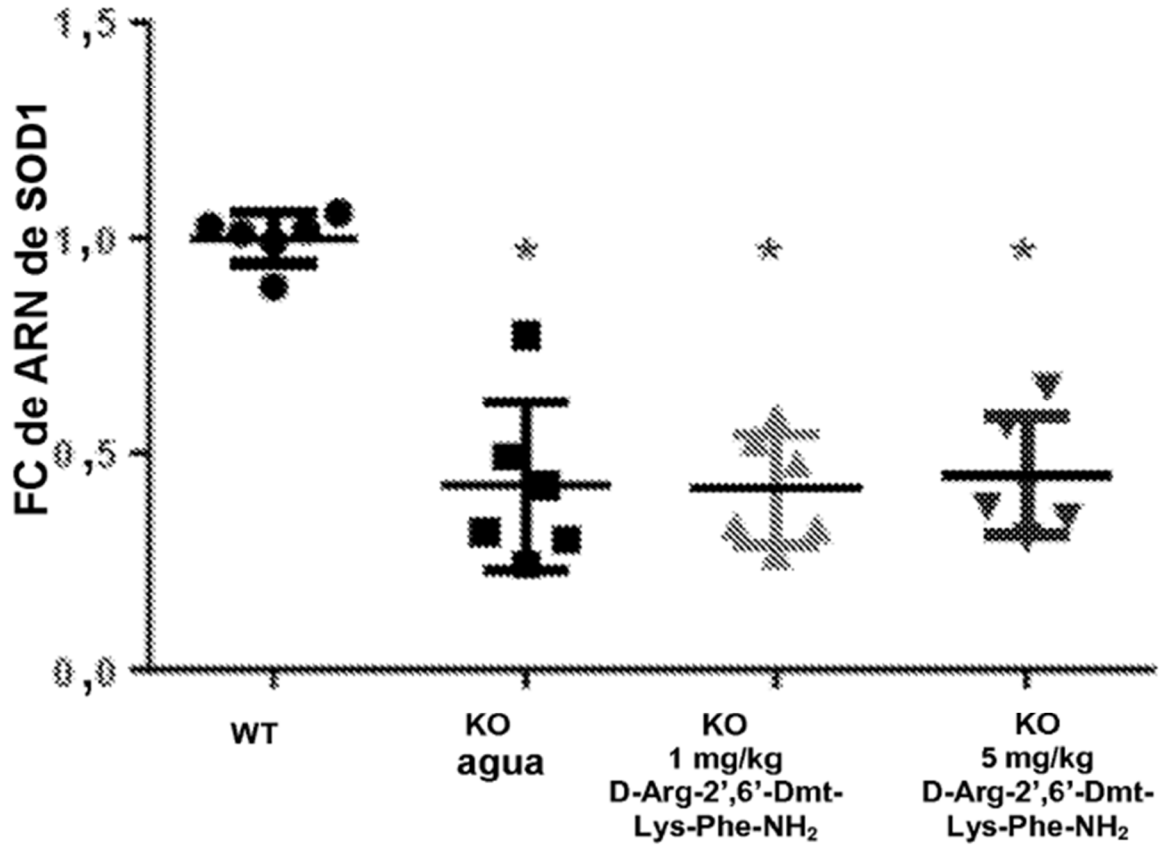
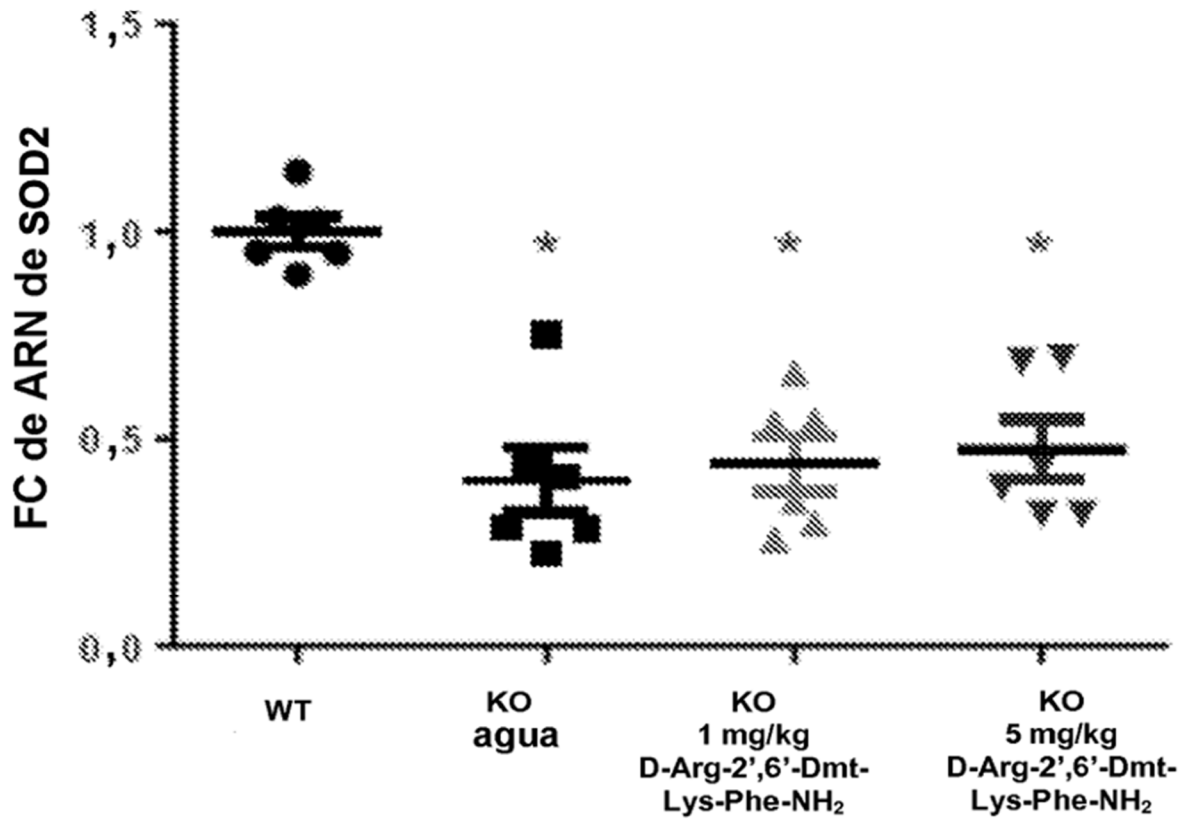


FIG. 6A



* $p < 0,05$ frente a WT

FIG. 6B



* $p < 0,05$ frente a WT

FIG. 7

30 min tras la última inyección

