

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

(22) Data de pedido: <b>2010.08.23</b>	(73) Titular(es): <b>STEALTH PEPTIDES INTERNATIONAL, INC.</b> <b>2ND FLOOR LE PRINCE DE GALLES 3-5</b> <b>AVENUE DES CITRONNIERS 98000 MONACO</b> <b>MC</b>
(30) Prioridade(s): <b>2009.08.24 US 236440 P</b> <b>2009.08.28 US 237745 P</b> <b>2010.05.26 US 348470 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2012.07.04</b>	(72) Inventor(es): <b>LIPING LIU</b> <b>US</b> <b>SHIBO TANG</b> <b>CN</b> <b>XIAOLING LIANG</b> <b>CN</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.05.07</b> <b>112/2014</b>	(74) Mandatário: <b>NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO</b> <b>RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS OFTÁLMICAS**

(57) Resumo:

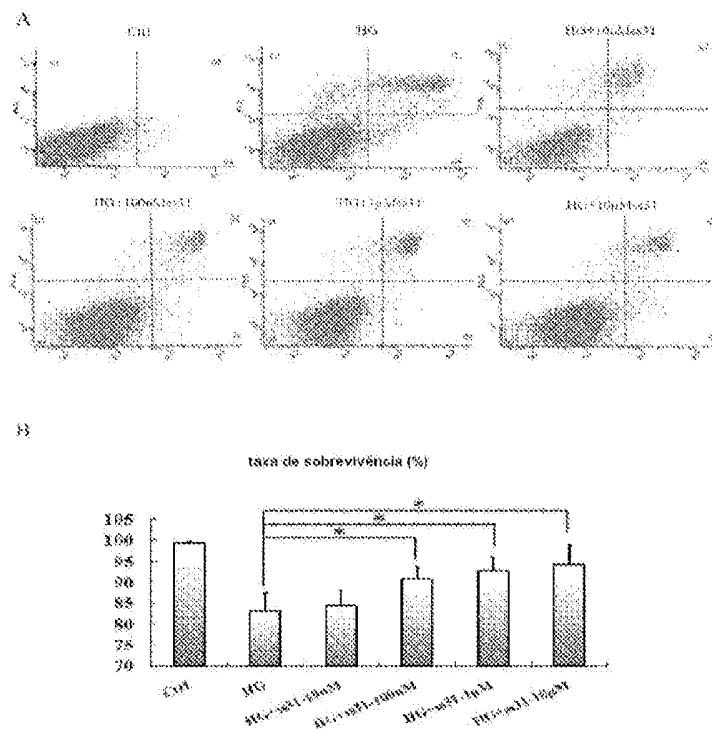
A PRESENTE INVENÇÃO DISPONIBILIZA MÉTODOS DE PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES OFTÁLMICAS NUM INDIVÍDUO MAMÍFERO, COMPREENDENDO ADMINISTRAR AO INDIVÍDUO UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE UM PÉPTIDO AROMÁTICO-CATIÓNICO REPRESENTADO PELA FÓRMULA D-ARG-2',6'-DMT-LYS-PHE-NH<sub>2</sub> (SS-31) OU PHE-D-ARG-PHE-LYS-NH<sub>2</sub> (SS-20). A PRESENTE INVENÇÃO DISPONIBILIZA MÉTODOS DE PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES OFTÁLMICAS TAIS COMO RETINOPATIA DIABÉTICA, CATARATAS, RETINITE PIGMENTOSA, GLAUCOMA, DEGENERAÇÃO MACULAR, NEOVASCULARIZAÇÃO COROIDAL, DEGENERAÇÃO DA RETINA, E RETINOPATIA INDUZIDA POR OXIGÉNIO.

## RESUMO

### **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS OFTÁLMICAS"**

A presente invenção disponibiliza métodos de prevenção ou tratamento de doenças ou condições oftálmicas num indivíduo mamífero, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um péptido aromático-catiónico representado pela fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (SS-31) ou Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (SS-20). A presente invenção disponibiliza métodos de prevenção ou tratamento de doenças ou condições oftálmicas tais como retinopatia diabética, cataratas, retinite pigmentosa, glaucoma, degeneração macular, neovascularização coroidal, degeneração da retina, e retinopatia induzida por oxigénio.

**FIG. 1**



## **DESCRIÇÃO**

### **"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS OFTÁLMICAS"**

#### REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório U.S. No. 61/236,440, registado a 24 de agosto, 2009; Pedido Provisório U.S. No. 61/237,745, registado a 28 de agosto, 2009; e Pedido Provisório U.S. No. 61/348,470, registado a 26 de maio, 2010.

#### ÂMBITO TÉCNICO

A presente tecnologia relaciona-se geralmente com composições e métodos de prevenção ou tratamento de doenças ou condições oftálmicas. Em particular, a presente tecnologia relaciona-se com a administração de péptidos aromático-catiónicos em quantidades eficazes para prevenir ou tratar doenças ou condições oftálmicas, por exemplo, retinopatia diabética, cataratas, retinite pigmentosa, glaucoma, neovascularização coroidal, e retinopatia induzida por oxigénio, em indivíduos mamíferos.

#### ANTECEDENTES

A descrição a seguir é fornecida para auxiliar a compreensão do leitor. Nenhuma da informação fornecida ou referências citadas é admitida como sendo técnica anterior para a presente invenção.

Doenças e condições degenerativas do nervo ótico e retina são as principais causas de cegueira no mundo. Uma condição degenerativa significativa da retina é a degeneração macular relacionada com a idade (ARMD). A ARMD é a causa

mais comum de cegueira em pessoas com mais de 50 nos EUA e a sua prevalência aumenta com a idade. A ARMD é classificada como sendo húmida (neovascular) ou seca (não neovascular); a forma seca da doença é mais comum. A degeneração macular ocorre quando a retina central se torna distorcida e mais fina normalmente associada com a idade mas caracterizada também por inflamação intra-ocular e angiogénese (somente na ARMD húmida) e/ou infeção intraocular. A formação subsequente de radicais livres, resultando em danos oxidativos do tecido, inflamação local e produção de fatores de crescimento (tais como VEGF e FGF) e mediadores inflamatórios, conduz a neovascularização inapropriada em comum com a forma húmida de ARMD.

A retinopatia é a principal causa de cegueira na diabetes tipo I, e é também comum na diabetes tipo II. O grau da retinopatia depende da duração da diabetes, e geralmente tem início dez ou mais anos após o aparecimento da diabetes. A retinopatia diabética pode ser classificada como não proliferativa, em que a retinopatia é caracterizada por um aumento da permeabilidade capilar, edema e exsudados, ou proliferativa, em que a retinopatia é caracterizada por neovascularização estendendo-se desde a retina até ao vítreo, cicatrizes, depósito de tecido fibroso e potencial para descolamento da retina. Acredita-se que a retinopatia diabética é causada pelo desenvolvimento de proteínas glicosiladas devido a glicose elevada no sangue. Muitas outras retinopatias menos comuns incluem a membrana neovascular coroidal (CNVM), edema macular cistóide (CME), membrana epirretiniana (ERM) e buraco macular.

O glaucoma é composto por uma coleção de doenças oculares que causam perda de visão por lesão do nervo ótico. A pressão intra-ocular elevada (IOP) devida a drenagem ocular

inadequada é a causa principal de glaucoma. O glaucoma frequentemente desenvolve-se à medida que o olho envelhece, ou pode ocorrer em resultado de uma lesão do olho, inflamação, tumor ou em casos avançados de catarata ou diabetes. Pode também ser causado pelo aumento da IOP causada por tratamento com esteróides. Terapias medicamentosas que provaram ser eficazes na redução do glaucoma reduzem a IOP por diminuição da produção de humor vítreo ou por facilitar a drenagem ocular. Esses agentes são frequentemente vasodilatadores e como tal atuam no sistema nervoso simpático e incluem antagonistas adrenérgicos.

#### RESUMO

A presente tecnologia relaciona-se geralmente com o tratamento ou prevenção de doenças ou condições oftálmicas em mamíferos através da administração de quantidades terapêuticamente eficazes de péptidos aromático-catiónicos a indivíduos com necessidade disso.

A invenção é definida nas reivindicações e é dirigida a um péptido representado pela fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>, para uso no tratamento ou prevenção de uma doença oftalmológica em que a doença oftalmológica é selecionada a partir do grupo que consiste em: retinite pigmentosa, neovascularização coroidal e retinopatia induzida por oxigénio. É descrito um método para tratamento ou prevenção de uma doença oftálmica num indivíduo mamífero que necessita disso, método esse compreendendo administrar a um sujeito uma quantidade terapêuticamente eficaz do péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>. A doença oftálmica pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em: retinopatia diabética, cataratas, retinite pigmentosa, glaucoma,

degeneração macular, neovascularização coroidal, degeneração da retina, e retinopatia induzida por oxigénio.

É também descrito um método de tratamento ou prevenção de condições oftálmicas num indivíduo mamífero, compreendendo administrar ao referido indivíduo mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um péptido aromático-catiónico. Em algumas formas de realização, o péptido aromático-catiónico é um péptido com:

pelo menos uma carga total positiva;

um mínimo de quatro aminoácidos;

um máximo de cerca de vinte aminoácidos;

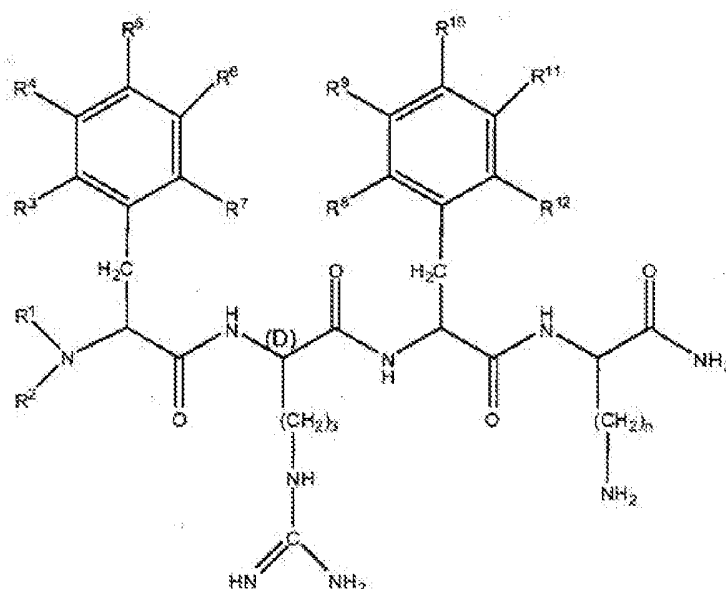
uma relação entre o número mínimo de cargas positivas totais ( $p_m$ ) e o número total de resíduos de aminoácidos ( $r$ ) em que  $3p_m$  é o maior número que é inferior ou igual a  $r + 1$ ; e uma relação entre o número mínimo de grupos aromáticos ( $a$ ) e o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ) em que  $2a$  é o maior número que é inferior ou igual a  $p_t + 1$ , exceto que quando  $a$  é 1,  $p_t$  pode também ser 1. Em formas de realização particulares, o indivíduo mamífero é um humano.

$2p_m$  pode ser o maior número que é inferior ou igual a  $r+1$ , e pode ser igual a  $p_t$ . O péptido aromático-catiónico pode ser um péptido solúvel em água com um mínimo de dois ou um mínimo de três cargas positivas.

O péptido aqui descrito pode compreender um ou mais aminoácidos que não ocorrem naturalmente, por exemplo, um ou mais D-aminoácidos. Em algumas formas de realização, o grupo carboxilo C-terminal do aminoácido no C-terminal é amidado. Em certas formas de realização, o péptido tem um mínimo de quatro aminoácidos. O péptido pode ter um máximo de cerca de 6, um máximo de cerca de 9, ou um máximo de cerca de 12 aminoácidos.

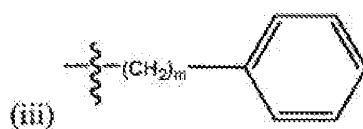
Numa forma de realização aqui descrita, o péptido pode ter a fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (SS-20) ou 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>. Numa forma de realização particular, o péptido aromático-catiónico tem a fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (referido indistintamente como SS-31, MTP-131, ou Bendavia<sup>TM</sup>).

Numa forma de realização aqui descrita, o péptido é definido pela fórmula I:

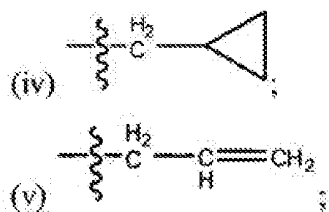


em que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são cada um seleccionados independentemente a partir de

- (i) hidrogénio;
- (ii) C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo linear ou ramificado;



em que m = 1-3;



$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  e  $R^{12}$  são cada um selecionados independentemente a partir de

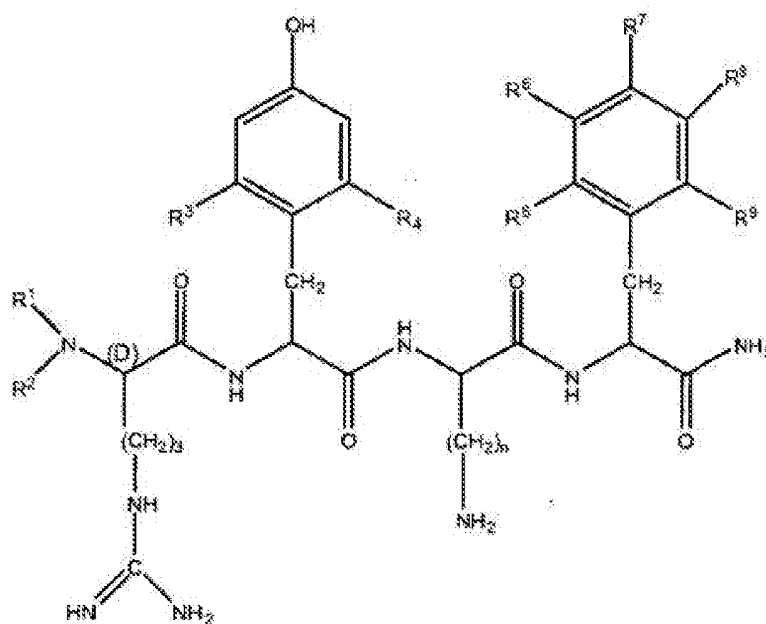
- (i) hidrogénio;
- (ii)  $C_1$ - $C_6$  alquilo linear ou ramificado;
- (iii)  $C_1$ - $C_6$  alcoxi;
- (iv) amina;
- (v)  $C_1$ - $C_4$  alquilamina;
- (vi)  $C_1$ - $C_4$  dialquilamina;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;

(ix) halogénio, em que "halogénio" engloba cloro, flúor, bromo, e iodo; e  $n$  é um número inteiro de 1 até 5.

Numa forma de realização particular,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , e  $R^{12}$  são todos hidrogénio; e  $n$  é 4. Noutra forma de realização,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ , e  $R^{11}$  são todos hidrogénio;  $R^8$  e  $R^{12}$  são metilo;  $R^{10}$  é hidroxilo; e  $n$  é 4.

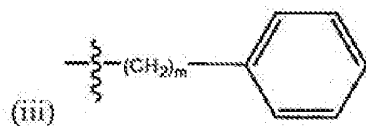
Numa forma de realização aqui descrita, o péptido é definido pela fórmula II:



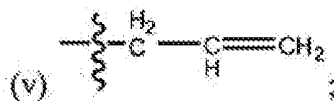
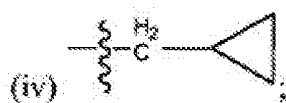


em que  $R^1$  e  $R^2$  são cada um selecionados independentemente a partir de

- (i) hidrogénio;
- (ii)  $C_1$ - $C_6$  alquilo linear ou ramificado;



em que  $m = 1-3$ ;



$R^3$  e  $R^4$  são cada um selecionados independentemente a partir de

- (i) hidrogénio;
- (ii)  $C_1$ - $C_6$  alquilo linear ou ramificado;
- (iii)  $C_1$ - $C_6$  alcoxi;
- (iv) amina;
- (v)  $C_1$ - $C_4$  alquilamina;

- (vi) C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> dialquilamina;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;
- (ix) halogénio, em que "halogénio" engloba cloro, flúor, bromo, e iodo;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, e R<sup>9</sup> são cada um selecionados independentemente a partir de

- (i) hidrogénio;
- (ii) C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo linear ou ramificado;
- (iii) C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alcoxi;
- (iv) amina;
- (v) C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilamina;
- (vi) C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> dialquilamina;
- (vii) nitro;
- (viii) hidroxilo;
- (ix) halogénio, em que "halogénio" engloba cloro, flúor, bromo, e iodo; e n é um número inteiro de 1 até 5.

Os péptidos aromático-catiónicos podem ser administrados de vários modos. Em algumas formas de realização, os péptidos podem ser administrados por via intraocular, oral, tópica, intranasal, intravenosa, subcutânea, ou transdérmica (por exemplo, por iontoforese).

Num aspeto, a presente divulgação fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> formulado para administração tópica, iontoforética, ou intraocular.

Num aspeto, a presente divulgação fornece uma formulação oftálmica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do péptido D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou Phe-D-Arg-

Phe-Lys-NH<sub>2</sub>. Numa forma de realização, a formulação é solúvel na córnea, humor aquoso e lente do olho. Numa forma de realização, a formulação compreende ainda um conservante. Numa forma de realização, o conservante está presente numa concentração inferior a 1%.

Numa forma de realização, a formulação compreende ainda um agente ativo selecionado a partir do grupo que consiste em: um antioxidante, um complexo de metal, um fármaco anti-inflamatório, um antibiótico, e um anti-histamínico. Numa forma de realização, o antioxidante é vitamina A, vitamina C, vitamina E, licopeno, selénio, ácido  $\alpha$ -lipóico, coenzima Q, glutatona, ou um carotenóide. Numa forma de realização, a formulação compreende ainda um agente ativo selecionado a partir do grupo que consiste em: aceclidina, acetazolamida, anecortave, apraclonidina, atropina, azapentaceno, azelastina, bacitracina, befunolol, betametasona, betaxolol, bimatoprost, brimonidina, brinzolamida, carbacol, carteolol, celecoxib, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, cromoglicato, cromolina, ciclopentolato, ciclosporina, dapiprazole, demecário, dexametasona, diclofenac, diclorfenamida, dipivefrina, dorzolamida, ecotiofato, emedastina, epinastina, epinefrina, eritromicina, etoxzolamida, eucatropina, fludrocortisona, fluorometolona, flurbiprofeno, fomivirseno, framacetina, ganciclovir, gatifloxacina, gentamicina, homatropina, hidro cortisona, idoxuridina, indometacina, isoflurofato, cetorolac, cetotifeno, latanoprost, levobetaxolol, levobunolol, levocabastina, levofloxacina, lodoxamida, loteprednol, medrisona, metazolamida, metipranolol, moxifloxacina, nafazolina, natamicina, nedocromil, neomicina, norfloxacina, ofloxacina, olopatadina, oximetazolina, pemirolast, pegaptanib, fenilefrina, fisostigmina, pilocarpina,

pindolol, pirenoxina, polimixina B, prednisolona, proparacaína, ranibizumab, rimexolona, escopolamina, sezolamida, esqualamina, sulfacetamida, suprofeno, tetracaína, tetraciclina, tetrahidrozolina, tetrizolina, timolol, tobramicina, travoprost, triamcinulona, trifluormetazolamida, trifluridina, trimetoprim, tropicamida, unoprostona, vidarbina, xilometazolina, seus sais farmaceuticamente aceitáveis, e combinações dos mesmos.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

As Figs. 1A e 1B mostram os efeitos de diferentes concentrações de SS-31 (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M e 10  $\mu$ M) usadas como co-tratamento com 30 mM de glucose (HG). A Fig. 1A mostra análise de apoptose, avaliado por citometria de fluxo após coloração com Anexina V/PI, que mostrou que as taxas de sobrevivência para HRECs (Q3) foram 99,3%, 83,2%, 84,3%, 90,7%, 92,8%, e 94,3%, respectivamente 24 horas após tratamento. A Fig. 1B é uma representação gráfica da taxa de sobrevivência para HRECs. Os dados das concentrações de SS-31 de 100nM, 1  $\mu$ M, e 10  $\mu$ M foram significativamente superiores às observadas com células expostas a glucose elevada na ausência de co-tratamento com SS31. \*  $p < 0,05$  vs. 30 mM do grupo tratado com glicose elevada.

As Figs. 2A-2F são uma série de micrografias que mostram que o co-tratamento com SS-31 reduziu espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) em HRECs expostos a 30 mM de glucose durante 24 h e 48 h. As ROS intracelulares foram medidas usando dihidroetídio. 2A, 2D meio de cultura normal; 2B, 2E 30 mM de glucose; e 2C, 2F 30 mM de glucose + SS-31 (100 nM) a 24 e 48 h, respectivamente.

As Figs. 3A e 3B mostram que o SS-31 previne a potencial perda mitocondrial de HRECs tratados com glucose elevada. Fig. 3A. O  $\Delta\Psi_m$  das HRECs foi medido por citometria de fluxo após coloração com sonda fluorescente JC-1. O tratamento com glucose elevada (30 mM) resultou numa perda rápida de potencial de membrana mitocondrial das HRECs cultivadas às 24 e 48 horas. Em contraste, a análise de fluxo citométrico mostrou que os 30mM de glucose em co-tratamento com SS-31 aumentaram  $\Delta\Psi_m$  em comparação com o grupo só com glucose elevada. Fig. 3B. Análise quantitativa de  $\Delta\Psi_m$  em HRECs em glucose elevada co-tratadas com SS-31 durante 24 e 48 horas, apenas glicose elevada afetou adversamente  $\Delta\Psi_m$ . Em contraste, o SS-31 recuperou  $\Delta\Psi_m$  até aos níveis de controlo. Os valores representam a média  $\pm$  SD de seis experiências separadas realizadas em triplicado. \* $P < 0,05$ .

As Figs. 4A e 4D são imagens de microscopia confocal que mostram que as HRECs no grupo de glicose normal e no grupo co-tratado com SS-31 têm coloração com citocromo c e coloração HSP60 com sobreposição mais exata às 24 e 48 horas, indicando que a co-localização do citocromo c e mitocôndria. Vinte e quatro e 48 horas após tratamento, o citocromo c estava obviamente aumentado no citoplasma de HRECs tratadas com 30 mM de glucose. As Figs. 4B e 4E mostram o conteúdo do citocromo c na mitocôndria e citoplasma conforme determinado por Western blot. As Figs. 4C e 4F mostram a análise quantitativa da percentagem de conteúdo de citocromo c na mitocôndria e no citoplasma das HRECs co-tratadas com glucose elevada e SS-31 durante 24 e 48 h.

A Fig. 5 A e a Fig. 5B mostram que a expressão aumentada de caspase-3 nas HRECs tratadas com glucose elevada (HG) foi

reduzida pelo co-tratamento com SS-31 conforme detetado por western blot. A expressão de caspase-3 foi normalizada para a expressão da  $\beta$ -actina. As Figs. 5C-E mostram que o SS-31 aumenta a expressão de Trx2 nas HRECs tratadas com glucose elevada. A Fig. 5C mostra o nível de mRNA da Trx2 nas HRECs expostas a 30 mM de glucose tratada com SS-31 durante 24 h e 48 h. A Fig. 5D mostra o nível de expressão da proteína Trx2 medido por Western blot. A Fig. 5E mostra a análise quantitativa do nível de proteína de Trx2 nas HRECs 24 e 48 horas após glucose elevada com ou sem co-tratamento com SS-31.

A Fig. 6 é uma fotografia dos efeitos de SS-31 nas lentes de ratos diabéticos. Linha de cima: lentes obtidas de ratos diabéticos; linha de baixo: lentes obtidas de ratos diabéticos tratados com SS-31 ou SS-20.

A Fig. 7 é uma série de fotografias que mostram os efeitos de SS-31 e SS-20 nas lentes de ratos diabéticos. A diabetes foi induzida por dieta com gordura elevada e estreptozotocina (HFD/STZ) (linha de cima) ou estreptozotocina (STZ) sozinha (linha de baixo).

A Fig. 8 é uma série de micrografias que mostram o epitélio de lentes de ratos normais, ratos diabéticos, e ratos diabéticos tratados com SS-31. A diabetes foi induzida por STZ.

A Fig. 9 é uma série de micrografias que mostram o epitélio de lentes de ratos normais, ratos diabéticos, e ratos diabéticos tratados com SS-31. A diabetes foi induzida por HFD/STZ.

A Fig. 10 é uma série de gráficos que mostram a integridade da barreira hematoretiniana de ratos normais (NRC), ratos diabéticos, e ratos diabéticos tratados com SS-20 ou SS-31, como analisado por extravasamento de azul de Evans. (A) diabetes induzida por STZ; (B) diabetes induzida por HFD/STZ.

A Fig. 11 é uma série de micrografias que mostram microvasos da retina de ratos normais (NRC), ratos diabéticos (HFD/STZ), e ratos diabéticos tratados com SS-31.

A Fig. 12 é uma série de micrografias que mostram os microvasos da retina de ratos normais, ratos diabéticos (STZ), e ratos diabéticos tratados com SS-31.

As FIGS. 13A-13D são uma série de micrografias que mostram a distribuição da proteína de junção apertada claudina-5 em microvasos da retina em ratos normais (A), ratos STZ (B), ratos tratados com STZ/SS-20 (C), ou ratos tratados com STZ/SS-31 (D).

A Fig. 14 é um gráfico que mostra a falta de citotoxicidade de SS-31 em células da rede trabecular de indivíduos não-doentes (HTM) e células da rede trabecular de doentes com glaucoma (GTM) aos quais se administrou SS-31.

A Fig. 15 é uma série de micrografias confocais que mostram que o co-tratamento com SS-31 dependente da dose inibiu a redução no potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) obtido com 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  em células da rede trabecular de doentes com glaucoma (GTM).

A Fig. 16 é uma série de gráficos que mostram que o co-tratamento com SS-31 inibiu o decréscimo no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), conforme medido por TMRM e citometria de fluxo, em células da rede trabecular de doentes com glaucoma (GTM) induzido por 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A Fig. 17 é um gráfico que compara o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células GTM e HTM.

A Fig. 18 é uma série de micrografias que mostram as alterações morfológicas nas células GTM como resposta ao tratamento com SS-31 como visualizado usando microscopia de contraste de fase invertida.

A Fig. 19 é uma série de micrografias que mostram que o co-tratamento com SS-31 reduziu a perda de potencial de membrana mitocondrial em células GTM causado por 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  num modo dependente de dose como visualizado usando microscopia confocal.

A Fig. 20 é uma série de micrografias que mostram que o co-tratamento com SS-31 reduziu a perda de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células GTM causado por 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  como visualizado por TMRM e microscopia confocal (ampliação de 200X).

A Fig. 21 é uma série de micrografias que mostram as alterações morfológicas nas células GTM como resposta ao tratamento com SS-31 como visualizado usando microscopia de contraste de fase invertida.

A Fig. 22 é um gráfico que mostra que SS-31 não teve nenhum efeito na viabilidade das células epiteliais do pigmento



retinal (RPE) humanas primárias (conforme medido pelo ensaio MTT).

A Fig. 23A é um gráfico que mostra o efeito de diferentes concentrações de tBHP na viabilidade (conforme medido por um ensaio MTT) das células RPE. A Fig. 23B é um gráfico que mostra os efeitos de diferentes concentrações de SS-31 na viabilidade de células quando expostas a concentrações crescentes de tBHP.

A Fig. 24A-24C é uma série de micrografias que ilustram os efeitos patológicos num modelo de rato de neovascularização coroidal (CNV). A Fig. 24D é um gráfico que mostra a área de CNV em grupos tratados e controlo.

A Fig. 25 é uma série de micrografias que ilustram diferentes alterações patológicas num modelo de rato de retinopatia induzida por oxigénio (OIR). É de notar as áreas de avascularização e nova vascularização num rato P17 OIR em comparação com um rato normal P17.

A Fig. 26A-26D é uma série de micrografias que mostram os efeitos da administração de SS-31 num modelo de rato OIR. A Fig. 26E é um gráfico que mostra a área neovascular dos grupos controlo e tratados. SS-31 reduziu a área avascular.

A Fig. 27A é um gráfico que mostra o efeito de diferentes doses de tBHP na viabilidade de células de uma linha de células de cones 661W derivada de um tumor da retina de rato. A Fig. 27B é um gráfico que mostra o efeito de 1  $\mu$ M de SS-31 na redução de morte celular de 661W induzida por tBHP.

A Fig. 28 é uma série de micrografias que mostram a espessura da camada nuclear externa da retina (ONL) num modelo de rato de degeneração da retina em ratos controle e tratados com SS-31.

A Fig. 29 é uma série de micrografias que mostram a densidade de células dos cones em montagens planas da retina coradas com aglutinina de amendoim (PNA), que cora seletivamente os segmentos internos e externos dos cones em ratos controle e tratados com SS-31.

A Fig. 30 é uma série de micrografias que mostram coloração para acoleína, um marcador de lesões lipídicas oxidativas num modelo de rato de degeneração da retina.

A Fig. 31 é uma série de gráficos que mostram a intensidade de fluorescência de produção de ROS intracelular em três grupos de células RPE usando análise de FACS. A Fig. 31A mostra a produção de ROS em células RPE de controle; A Fig. 31B mostra a produção de ROS em células RPE tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h; A Fig. 31C mostra a produção de ROS em células RPE tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h e 1  $\mu\text{M}$  de SS-31.

A Fig. 32 é uma série de gráficos que mostram análise de MMP marcada com JC-1 num ensaio de FACS. Foram analisadas três concentrações diferentes dos grupos SS-31.

As Figs. 33A-33C são uma série de gráficos que mostram o efeito de 1  $\mu\text{M}$  de SS-31 no declínio de MMP induzido por tBHP. Fig. 33A: grupo de controle; Fig. 33B: grupo 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h; Fig. 33C: grupo 1  $\mu\text{M}$  de SS-31 durante 4 h + 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h. A Fig. 33D é um gráfico

que compara a taxa de fluorescência para os diferentes grupos. \*P<0,01, C vs. B.

As Figs. 34A-34C são uma série de gráficos que mostram o efeito de SS-31 na apoptose celular induzida por 250  $\mu$ M de tBHP durante 24 h. Fig. 34A: grupo de controlo; Fig. 34B: grupo 250  $\mu$ M de tBHP durante 24 h; Fig. 34C: grupo 1  $\mu$ M de SS-31 durante 4 h + 250  $\mu$ M de tBHP durante 24 h. A Fig. 34D é um gráfico que compara a taxa de fluorescência para os diferentes grupos. \*P<0,05 C vs. B.

A Fig. 35 é um gráfico que mostra o nível de MDA induzida por tBHP em 3 grupos de células RPE. \*P<0,05, grupo 1  $\mu$ M de SS-31 durante 4 h+250  $\mu$ M de tBHP durante 24 h vs 250  $\mu$ M de tBHP durante 24 h.

A Fig. 36 é um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência de TMRM de células GTM e HTM em grupos controlo e tratados com SS-31, conforme medido usando análise de FACS.

A Fig. 37 é um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência de ROS de células GTM e HTM nos grupos controlo e tratados com SS-31, conforme medido usando análise de FACS.

A Fig. 38 é uma série de gráficos que mostram apoptose celular dos grupos controlo e tratados com SS-31 quantificada pela percentagem de células no quadrante Q2+Q4.

A Fig. 39 é uma série de gráficos que mostram que o SS-31 reduziu a produção de ROS intracelular em células GTM3 e iHTM tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Fig. 40 é uma série de gráficos que mostram que o SS-31 protegeu contra a despolarização mitocondrial induzida por  $H_2O_2$  das células GTM3 e iHTM.

### DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

É para ser entendido que certos aspetos, modos, formas de realização, variações e características da invenção são descritos abaixo em vários níveis de pormenor com vista a fornecer uma compreensão substancial da presente invenção.

Na prática da presente invenção, são usadas muitas técnicas convencionais em biologia molecular, bioquímica de proteínas, biologia celular, imunologia, microbiologia e ADN recombinante. Estas técnicas são bem conhecidas e são explicadas em, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I e II, Glover, Ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, Ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, Eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, Eds. (1984); *Animal Cell Culture*, Freshney, Ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal *A Practical Guide to Molecular Cloning*; as séries, *Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); e *Meth. Enzymol*, Vols. 154 e 155, Wu & Grossman, e Wu, Eds., respetivamente.

As definições de certos termos conforme usado na presente especificação são fornecidas a seguir. A menos que definido

de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm geralmente o mesmo significado comumente conhecido por um comum especialista na técnica a que esta invenção pertence.

Conforme usado na presente especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma" e "o" incluem as referências no plural a menos que o conteúdo claramente determine de outro modo. Por exemplo, a referência a "uma célula" inclui uma combinação de duas ou mais células, e semelhantes.

Conforme aqui usado, "cerca de" será entendido por pessoas com especialização comum na técnica e vai variar de alguma forma dependendo do contexto no qual é usado. Se houver usos do termo que não são claros para as pessoas com conhecimentos comuns na técnica, dado o contexto em que é utilizado, "cerca de" vai significar até mais ou menos 10% do valor enumerado.

Conforme aqui usado, a "administração" de um agente, fármaco, ou péptido a um indivíduo inclui qualquer via de introdução ou aplicação a um indivíduo de um composto para desempenhar a sua função pretendida. A administração pode ser realizada por qualquer via adequada, incluindo por via oral, intraocular, intranasal, parentérica (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, ou subcutânea), ou tópica. A administração inclui autoadministração e a administração por outrem.

Conforme aqui usado, o termo "aminoácido" inclui aminoácidos que ocorrem naturalmente e aminoácidos sintéticos, assim como análogos de aminoácidos e aminoácidos miméticos que funcionam de modo semelhante aos aminoácidos que ocorrem naturalmente. Aminoácidos que

ocorrem naturalmente são aqueles codificados pelo código genético, assim como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos referem-se a compostos que têm a mesma estrutura química básica que um aminoácido que ocorre naturalmente, isto é, um  $\alpha$ -carbono que está ligado a um hidrogénio, um grupo carboxilo, um grupo amina, e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfónio de metionina. Esses análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou estruturas peptídicas modificadas, mas mantêm a mesma estrutura química básica como um aminoácido que ocorre naturalmente. Miméticos de aminoácidos referem-se a compostos químicos que têm uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funcionam de modo semelhante a um aminoácido que ocorre naturalmente. Os aminoácidos que podem ser aqui referidos pelos seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Conforme aqui usado, o termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade suficiente para conseguir um efeito profilático ou terapêutico desejado, por exemplo, uma quantidade que resulta na prevenção de, ou num decréscimo dos, sintomas associados a uma condição oftálmica. A quantidade de composição administrada ao indivíduo vai depender do tipo e gravidade da doença e das características do indivíduo, tais como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância a fármacos. Também vai depender do grau, gravidade e tipo de doença. O especialista na técnica será capaz de determinar as dosagens adequadas dependendo destes e de outros factores.

As composições também podem ser administradas em combinação com um ou mais compostos terapêuticos adicionais. Nos métodos aqui descritos, os péptidos aromático-catiónicos podem ser administrados a um indivíduo com um ou mais sinais ou sintomas de uma condição oftálmica. Por exemplo, uma "quantidade terapêuticamente eficaz" dos péptidos aromático-catiónicos significa níveis aos quais os efeitos fisiológicos numa condição oftálmica são, no mínimo, melhorados.

Um polipéptido ou péptido "isolado" ou "purificado" é substancialmente livre de material celular ou de outros polipéptidos contaminantes da fonte celular ou tecidual do qual o agente deriva, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos quando quimicamente sintetizados. Por exemplo, um péptido aromático-catiónico isolado deve estar livre de materiais que possam interferir com os usos diagnósticos ou terapêuticos do agente. Esses materiais de interferência podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteicos e não proteicos.

Conforme aqui usado, os termos "polipéptido", "péptido" e "proteína" são aqui usados indiferentemente para significar um polímero compreendendo dois ou mais aminoácidos ligados um ao outro por ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, isto é, péptidos isoésteres. Polipéptido refere-se tanto às cadeias curtas, comumente referida como péptidos, glicopéptidos ou oligómeros, como às cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipéptidos podem conter outros aminoácidos para além dos 20 aminoácidos codificados por genes. Os polipéptidos incluem sequências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tais como técnicas de processamento pós-translacional, ou por técnicas de modificação química que são bem conhecidas na técnica.

Conforme aqui usado, o termo uso terapêutico "simultâneo" refere-se à administração de pelo menos dois componentes ativos pela mesma via e ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo.

Conforme aqui usado, o termo uso terapêutico "separado" refere-se a uma administração de pelo menos dois componentes ativos ao mesmo tempo ou substancialmente ao mesmo tempo por vias diferentes.

Como aqui usado, o termo uso terapêutico "sequencial" refere-se à administração de pelo menos dois componentes ativos em tempos diferentes, a via de administração sendo idêntica ou diferente. Mais particularmente, o uso sequencial refere-se ao conjunto da administração de um dos componentes ativos antes que a administração do outro ou outros comece. É assim possível administrar um dos componentes ativos durante vários minutos, horas, ou dias antes de administrar o outro componente ativo ou componentes. Não há tratamento simultâneo neste caso.

Conforme aqui usados, os termos "tratar" ou "tratamento" ou "alívio" refere-se tanto ao tratamento terapêutico e profilático ou medidas preventivas, em que o objetivo é prevenir ou retardar (diminuir) a doença ou condição patológica específica. Um indivíduo é "tratado" com sucesso para uma condição oftálmica se, após receber uma quantidade terapêutica de péptidos aromático-catiônicos de acordo com os métodos aqui descritos, o indivíduo apresentar uma redução observável e/ou mensurável ou apresentar ausência de um ou mais sinais e sintomas de uma condição oftálmica. Deve também ser apreciado que os vários modos de tratamento ou prevenção de condições médicas conforme descritos se pretende que signifiquem "substancial", que inclui o



tratamento ou prevenção total mas também tratamento ou prevenção que não são totais, e em que é atingido algum resultado relevante em termos biológicos ou médicos.

Conforme aqui usado, "prevenção" ou "prevenir" uma doença ou condição refere-se a um composto que, numa amostra estatística, reduz a ocorrência da doença ou condição na amostra tratada em relação a uma amostra de controlo não tratada, ou atrasa o aparecimento ou reduz a gravidade de um ou mais sintomas da doença ou condição em relação à amostra de controlo não tratada.

### **Péptidos aromático-catiónicos**

A presente tecnologia relaciona-se com o tratamento ou prevenção de uma doença oftálmica por administração de certos péptidos aromático-catiónicos. Sem pretender ser limitado pela teoria, os péptidos aromático-catiónicos podem tratar ou prevenir doenças ou condições oftálmicas por reduzirem a gravidade ou ocorrência de lesões oxidativas no olho. Os péptidos aromático-catiónicos são solúveis em água e altamente polares. Apesar destas propriedades, os péptidos pode facilmente penetrar nas membranas celulares. Os péptidos aromático-catiónicos incluem tipicamente um mínimo de três aminoácidos ou um mínimo de quatro aminoácidos, ligados covalentemente através de ligações peptídicas. O número máximo de aminoácidos presentes nos péptidos aromático-catiónicos é cerca de vinte aminoácidos ligados covalentemente através de ligações peptídicas. Adequadamente, o número máximo de aminoácidos é cerca de vinte, mais preferencialmente cerca de nove, e o mais preferencialmente cerca de seis.

Os aminoácidos dos péptidos aromático-catiónicos podem ser qualquer aminoácido. Conforme aqui usado, o termo

"aminoácido" é usado para se referir a qualquer molécula orgânica que contém pelo menos um grupo amina e pelo menos um grupo carboxilo. Tipicamente, pelo menos um grupo amina está na posição  $\alpha$  em relação a um grupo carboxilo. Os aminoácidos podem ocorrer naturalmente. Aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem, por exemplo, os vinte aminoácidos levogiros (L) mais comuns normalmente encontrados em proteínas de mamífero, isto é, alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), glutamina (Gln), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptofano, (Trp), tirosina (Tyr), e valina (Val). Outros aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem, por exemplo, aminoácidos que são sintetizados em processos metabólicos não associados à síntese de proteína. Por exemplo, os aminoácidos ornitina e citrulina são sintetizados no metabolismo de mamífero durante a produção de ureia. Outro exemplo de um aminoácido que ocorre naturalmente inclui a hidroxiprolina (Hyp).

Os péptidos contêm opcionalmente um ou mais aminoácido que não ocorre naturalmente. Adequadamente, o péptido não tem aminoácidos que ocorrem naturalmente. Os aminoácidos que não ocorrem naturalmente podem ser levogiros (L-), dextrogiros (D-), ou misturas destes. Aminoácidos que não ocorrem naturalmente são aqueles aminoácidos que tipicamente não são sintetizados nos processos metabólicos normais em organismos vivos, e que não ocorrem naturalmente em proteínas. Adicionalmente, os aminoácidos que não ocorrem naturalmente não são também adequadamente reconhecido pelas protéases comuns. O aminoácido que não ocorre naturalmente pode estar presente em qualquer posição

no péptido. Por exemplo, o aminoácido que não ocorre naturalmente pode estar no terminal N, no terminal C, ou em qualquer posição entre o terminal N e o terminal C.

Os aminoácidos não naturais podem, por exemplo, compreender grupos alquilo, arilo, ou alquilarilo não encontrados nos aminoácidos naturais. Alguns exemplos de aminoácidos alquilo não naturais incluem ácido  $\alpha$ -aminobutírico, ácido  $\beta$ -aminobutírico, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido  $\delta$ -aminovalérico, e ácido  $\epsilon$ -aminocapróico. Alguns exemplos de aminoácidos aril não naturais incluem ácido orto, meta, e para aminobenzóico. Alguns exemplos de aminoácidos alquilaril não naturais incluem ácido orto, meta, e para aminofenilacético, e ácido  $\gamma$ -fenil- $\beta$ -aminobutírico. Aminoácidos que não ocorrem naturalmente incluem derivados de aminoácidos que ocorrem naturalmente. Os derivados de aminoácidos que ocorrem naturalmente podem, por exemplo, incluir a adição de um ou mais grupos químicos ao aminoácido que ocorre naturalmente.

Por exemplo, um ou mais grupos químicos podem ser adicionados a uma ou mais das posições 2', 3', 4', 5', ou 6' do anel aromático do resíduo de fenilalanina ou tirosina, ou a posição 4', 5', 6', ou 7' do anel benzo de um resíduo de triptofano. O grupo pode ser qualquer grupo químico que pode ser adicionado a um anel aromático. Alguns exemplos desses grupos incluem C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo ramificado ou não ramificado, tais como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ou t-butilo, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquiloxi (isto é, alcoxi), amina, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilamina e C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> dialquilamina (por exemplo, metilamina, dimetilamina), nitro, hidroxilo, halo (isto é, flúor, cloro, bromo, ou iodo). Alguns exemplos específicos de derivados, que não

ocorrem naturalmente, de aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem norvalina (Nva) e norleucina (Nle).

Outro exemplo de uma modificação de um aminoácido num péptido é a derivatização de um grupo carboxilo de um ácido aspártico ou um resíduo do ácido glutâmico do péptido. Um exemplo de derivatização é a amidação com amónia ou com uma amina primária ou secundária, por exemplo, metilamina, etilamina, dimetilamina ou dietilamina. Outro exemplo de derivatização inclui esterificação com, por exemplo, álcool metílico ou etílico. Outra modificação dessas inclui derivatização de um grupo amina de um resíduo de lisina, arginina, ou histidina. Por exemplo, esses grupos amina podem ser acilados. Alguns grupos acilo adequados incluem, por exemplo, um grupo benzoílo ou um grupo alcanoílo compreendendo qualquer dos grupos  $C_1$ - $C_4$  alquilo mencionados acima, tais como um grupo acetilo ou propionilo.

Os aminoácidos que não ocorrem naturalmente são preferencialmente resistentes, e mais preferencialmente insensível, às proteases comuns. Exemplos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente que são resistentes ou insensíveis a proteases incluem a forma dextrogira (D-) de qualquer dos L-aminoácidos que ocorrem naturalmente acima mencionados, assim como L- e/ou D-aminoácidos que não ocorrem naturalmente. Os D-aminoácidos que não ocorrem normalmente em proteínas, apesar de serem encontrados em certos péptidos antibióticos que são sintetizados por outros meios que não a maquinaria sintética de proteína ribossomal normal da célula. Conforme aqui usados, os D-aminoácidos são considerados aminoácidos que não ocorrem naturalmente.

A fim de minimizar a sensibilidade a proteases, os péptidos devem ter menos de cinco, preferencialmente menos de

quatro, mais preferencialmente menos de três, e o mais preferencialmente, menos de dois L-aminoácidos contíguos reconhecidos pelas proteases comuns, independentemente do facto dos aminoácidos ocorrerem naturalmente ou não naturalmente. Adequadamente, o péptido tem somente D-aminoácidos, e nenhum L-aminoácido. Se o péptido contém sequências sensíveis a proteases de aminoácidos, pelo menos um dos aminoácidos é preferencialmente um D-aminoácido que não ocorre naturalmente, conferindo assim resistência a proteases. Um exemplo de uma sequência sensível a protease inclui dois ou mais aminoácidos básicos contíguos que são facilmente clivados por proteases comuns, tais como endopeptidases e tripsina. Exemplos de aminoácidos básicos incluem arginina, lisina e histidina.

Os péptidos aromático-catiónicos devem ter um número mínimo de cargas positivas totais a pH fisiológico em comparação com o número total de resíduos de aminoácidos no péptido. O mínimo número de cargas positivas totais a pH fisiológico será referido abaixo como ( $p_m$ ). O número total de resíduos de aminoácidos no péptido será referido abaixo como ( $r$ ). O número mínimo de cargas positivas totais discutidas abaixo são todos a pH fisiológico. O termo "pH fisiológico" conforme aqui usado refere-se ao pH normal nas células dos tecidos e órgãos do organismo de mamíferos. Por exemplo, o pH fisiológico de um humano é normalmente aproximadamente 7,4, mas o pH fisiológico normal em mamíferos pode ser qualquer pH desde cerca de 7,0 até cerca de 7,8.

"Carga total" conforme aqui usado refere-se ao equilíbrio do número de cargas positivas e o número de cargas negativas carregadas pelos aminoácidos presentes no péptido. Nesta especificação, entende-se que as cargas totais são medidas a pH fisiológico. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente que são positivamente carregados a pH

fisiológico incluem L-lisina, L-arginina, e L-histidina. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente que são carregados negativamente a pH fisiológico incluem ácido L-aspartico e ácido L-glutâmico.

Tipicamente, um péptido tem um grupo amina N-terminal carregado positivamente e um grupo carboxilo C-terminal carregado negativamente. As cargas anulam-se mutuamente a pH fisiológico. Como exemplo do cálculo da carga total, o péptido Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg tem um aminoácido carregado negativamente (isto é, Glu) e quatro aminoácidos carregados positivamente (isto é, dois resíduos Arg, um Lys, e um His). Portanto, o péptido acima tem uma carga total positiva de três.

Numa forma de realização, os péptidos aromático-catiónicos têm uma relação entre o número mínimo de cargas positivas totais a pH fisiológico ( $p_m$ ) e o número total de resíduos de aminoácidos ( $r$ ) em que  $3p_m$  é o número maior que é inferior ou igual a  $r + 1$ . Nesta forma de realização, a relação entre o número mínimo das cargas positivas totais ( $p_m$ ) e o número total dos resíduos de aminoácidos ( $r$ ) é como se segue:

**Tabela 1. Número de aminoácidos e cargas positivas totais**

$$(3p_m \leq r+1)$$

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

Noutra forma de realização, os péptidos aromático-catiónicos têm uma relação entre o número mínimo de cargas positivas totais ( $p_m$ ) e o número total de resíduos de aminoácidos ( $r$ ) em que  $2p_m$  é o maior número que é inferior

ou igual a  $r + 1$ . Nesta forma de realização, a relação entre o número mínimo de cargas positivas totais ( $p_m$ ) e o número total de resíduos de aminoácidos ( $r$ ) é como se segue:

**Tabela 2. Número de aminoácidos e cargas positivas totais**  
( $2p_m \leq p+1$ )

(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

Numa forma de realização, o número mínimo de cargas positivas totais ( $p_m$ ) e o número total de resíduos de aminoácidos ( $r$ ) são iguais. Noutra forma de realização, os péptidos têm três ou quatro resíduos de aminoácidos e no mínimo uma carga positiva total, preferencialmente, no mínimo duas cargas positivas totais e mais preferencialmente no mínimo três cargas positivas totais.

É também importante que os péptidos aromático-catiónicos tenham um número mínimo de grupos aromáticos em comparação com o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ). O número mínimo de grupos aromáticos será referido abaixo como ( $a$ ). Aminoácidos que ocorrem naturalmente que têm um grupo aromático incluem os aminoácidos histidina, triptofano, tirosina, e fenilalanina. Por exemplo, o hexapéptido Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp tem uma carga total positiva de dois (por contributo dos resíduos de lisina e arginina) e três grupos aromáticos (por contributo dos resíduos de tirosina, fenilalanina e triptofano).

Os péptidos aromático-catiónicos deverão ter também uma relação entre o número mínimo de grupos aromáticos ( $a$ ) e o número total de cargas positivas totais a pH fisiológico ( $p_t$ ) em que  $3a$  é o número maior que é inferior ou igual a

$p_t + 1$ , exceto que quando  $p_t$  é 1, a pode também ser 1. Nesta forma de realização, a relação entre o número mínimo de grupos aromáticos (a) e o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ) é como se segue:

**Tabela 3. Grupos aromáticos e cargas positivas totais (3a  $\leq p_t+1$  ou  $a=p_t=1$ )**

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

Noutra forma de realização, os péptidos aromático-catiónicos têm uma relação entre o número mínimo de grupos aromáticos (a) e o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ) em que 2a é o número maior que é inferior ou igual a  $p_t + 1$ . Nesta forma de realização, a relação entre o número mínimo de resíduos de aminoácidos aromáticos (a) e o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ) é como se segue:

**Tabela 4. Grupos aromáticos e cargas positivas totais (2a  $\leq p_t+1$  ou  $a=p_t=1$ )**

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

Noutra forma de realização, o número de grupos aromáticos (a) e o número total de cargas positivas totais ( $p_t$ ) são iguais.

Grupos carboxilo, especialmente o grupo carboxilo terminal de um aminoácido C-terminal, são preferencialmente amidados com, por exemplo, amónia para formar a amida C-terminal. Em alternativa, o grupo carboxilo terminal do aminoácido C-terminal pode ser amidado com qualquer amina primária ou



secundária. A amina primária ou secundária pode, por exemplo, ser um alquilo, especialmente um C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo ramificado ou não ramificado, ou uma arilamina. Portanto, o aminoácido no terminal C do péptido pode ser convertido num grupo amida, N-metilamida, N-etilamida, N,N-dimetilamida, N,N-dietilamida, N-metil-N-etilamida, N-fenilamida ou N-fenil-N-etilamida. Os grupos livres de carboxilato dos resíduos de asparagina, glutamina, ácido aspártico, e ácido glutâmico que não ocorrem no terminal C dos péptidos aromático-catiónicos podem também ser amidados quando ocorrem no péptido. A amidação nestas posições internas pode ser com amónia ou qualquer das aminas primárias ou secundárias descritas acima.

Numa forma de realização, o péptido aromático-catiónico é um tripéptido com duas cargas positivas totais e pelo menos um aminoácido aromático. Numa forma de realização particular, o péptido aromático-catiónico é um tripéptido com duas cargas positivas totais e dois aminoácidos aromáticos.

Péptidos aromático-catiónicos incluem, mas não se limitam, aos seguintes exemplos de péptidos:

Lys-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>  
 Phe-D-Arg-His  
 D-Tyr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>  
 Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>  
 Tyr-His-D-Gly-Met  
 Phe-Arg-D-His-Asp  
 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH<sub>2</sub>  
 Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg  
 D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg  
 Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH<sub>2</sub>  
 Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His

Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>  
 Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH<sub>2</sub>  
 Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys  
 Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH<sub>2</sub>  
 Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys  
 Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH<sub>2</sub>  
 D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH<sub>2</sub>  
 Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe  
 Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe  
 Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>  
 Phe-Trp-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr  
 Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys  
 Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-  
 Met-NH<sub>2</sub>  
 Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-  
 D-Arg-Gly  
 D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-  
 Arg-His-Phe-NH<sub>2</sub>  
 Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-  
 Tyr-D-Phe-Lys-Phe  
 His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-  
 D-Lys-Tyr-His-Ser-NH<sub>2</sub>  
 Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-  
 Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp  
 Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-  
 Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH<sub>2</sub>

Numa forma de realização, um péptido que tem atividade agonista de recetor mu-opiíide tem a fórmula Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (referido aqui como "SS-01"). O SS-01 tem uma carga positiva total de três, por contributo dos aminoácidos tirosina, arginina, e lisina e tem dois grupos aromáticos fornecidos pelos aminoácidos fenilalanina e tirosina. A tirosina de SS-01 pode ser um derivado modificado de tirosina tais como em 2',6'-dimetiltirosina para produzir o

composto com a fórmula 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (referida aqui como "SS-02"). O SS-02 tem um peso molecular de 640 e carrega uma carga positiva total de três a pH fisiológico. O SS-02 penetra facilmente na membrana plasmática de vários tipos de células de mamífero de um modo independente de energia (Zhao *et al.*, *J. Pharmacol Exp Ther.* 304: 425-432, 2003).

Péptidos que não têm atividade agonista do receptor mu-opiíide geralmente não têm um resíduo tirosina ou um derivado de tirosina na terminação N (isto é, a posição de aminoácido 1). O aminoácido na terminação N pode ser qualquer aminoácido que ocorre naturalmente ou que não ocorre naturalmente que não a tirosina. Numa forma de realização, o aminoácido na terminação N é fenilalanina ou o seu derivado. Derivados exemplificativos de fenilalanina incluem 2'-metilfenilalanina (Mmp), 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp), N,2',6'-trimetilfenilalanina (Tmp), e 2'-hidroxi-6'-metilfenilalanina (Hmp).

Um exemplo de um péptido aromático-catiónico que não tem atividade agonista do receptor mu-opiíide tem a fórmula Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> (referido aqui como "SS-20"). Em alternativa, a fenilalanina N-terminal pode ser um derivado da fenilalanina tal como 2',6'-dimetilfenilalanina (2',6'-Dmp). SS-01 contendo 2',6'-dimetilfenilalanina na posição de aminoácido 1 tem a fórmula 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>. Numa forma de realização, a sequência de aminoácidos de SS-02 é rearranjada de modo a que Dmt não esteja na terminação N. Um exemplo de um tal péptido aromático-catiónico que não tem atividade agonista do receptor mu-opiíide tem a fórmula D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (SS-31).

SS-01, SS-20, SS-31, e seus derivados podem adicionalmente incluir análogos funcionais. Um péptido é considerado um análogo funcional de SS-01, SS-20, ou SS-31 se o análogo tiver a mesma função que SS-01, SS-20, ou SS-31. O análogo pode, por exemplo, ser uma variante de substituição de SS-01, SS-20, ou SS-31, em que um ou mais aminoácidos são substituídos por outro aminoácido.

Variantes de substituição adequadas de SS-01, SS-20, ou SS-31 incluem substituições de aminoácidos conservativas. Os aminoácidos podem ser agrupados de acordo com as suas características físico-químicas como se segue:

- (a) Aminoácidos não polares: Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C);
- (b) Aminoácidos não acídicos: Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);
- (c) Aminoácidos básicos: His(H) Arg(R) Lys(K);
- (d) Aminoácidos hidrofóbicos: Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V);
- e
- (e) Aminoácido aromáticos: Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His (H).

Substituições de um aminoácido num péptido por outro aminoácido no mesmo grupo são referidas como uma substituição conservativa e pode conservar as características físico-químicas do péptido original. Em contraste, as substituições de um aminoácido num péptido por outro aminoácido num grupo diferente é geralmente mais suscetível de alterar as características do péptido original.

Em algumas formas de realização, o péptido aromático-catiónico tem uma fórmula como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Análogos de Péptidos com Atividade Um-Opióide

Aminoácido Posição 1	Aminoácido Posição 2	Aminoácido Posição 3	Aminoácido Posição 4	Modificação C-Terminal
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -NH-das	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -NH-atn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-aminoheptanoic acid)	NH <sub>2</sub>
Bio-2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>

2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	chsDap	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	stsDap	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH <sub>2</sub>
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg	NH <sub>2</sub>
Met	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Met	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>

Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH <sub>2</sub>

Dab = diaminobutírico

Dap = ácido diaminopropiónico

Dmt = dimetiltirosina

Mmt = 2'-metiltirosina

Tmt = N,2',6'-trimetiltirosina

Hmt = 2'-hidroxi,6'-metiltirosina

dnsDap = ácido  $\beta$ -dansil-L- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropiônico

atnDap = ácido  $\beta$ -antranioloil-L- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropiônico

Bio = biotina

Exemplos de outros péptidos aromático-catiônicos que não ativam recetores mu-opioides incluem, mas não são limitados aos péptidos aromático-catiônicos mostrados na Tabela 6.

TABELA 6. Análogos de Péptidos Sem Atividade mu-opioide

Aminoácido Posição 1	Aminoácido Posição 2	Aminoácido Posição 3	Aminoácido Posição 4	Modificação C-Terminal
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Phe	Lys	Dmt	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Phe	Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Dmt	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Phe	Dmt	NH <sub>2</sub>
Phe	Lys	Dmt	D-Arg	NH <sub>2</sub>
Phe	Lys	D-Arg	Dmt	NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
Phe	D-Arg	Lys	Dmt	NH <sub>2</sub>
Phe	Dmt	D-Arg	Lys	NH <sub>2</sub>
Phe	Dmt	Lys	D-Arg	NH <sub>2</sub>
Lys	Phe	D-Arg	Dmt	NH <sub>2</sub>
Lys	Phe	Dmt	D-Arg	NH <sub>2</sub>
Lys	Dmt	D-Arg	Phe	NH <sub>2</sub>
Lys	Dmt	Phe	D-Arg	NH <sub>2</sub>
Lys	D-Arg	Phe	Dmt	NH <sub>2</sub>
Lys	D-Arg	Dmt	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp	NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Tyr	Lys	NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Trp	Lys	NH <sub>2</sub>
Trp	D-Arg	Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Lys	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Lys	Dmt	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Trp	Dmt	Lys	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Trp	Phe	NH <sub>2</sub>
D-Arg	Lys	Trp	Dmt	NH <sub>2</sub>
Cha	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>
Ala	D-Arg	Phe	Lys	NH <sub>2</sub>



Cha = ciclohexil alanina

Os aminoácidos dos péptidos mostrados na Tabela 5 e 6 podem ser de configuração L- ou D-.

Os péptidos podem ser sintetizados por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica. Métodos adequados para sintetizar quimicamente a proteína incluem, por exemplo, aqueles descritos por Stuart e Young em *Solid Phase Peptide Synthesis*, segunda edição, Pierce Chemical Company (1984), e em *Methods Enzymol.* 289, Academic Press, Inc, New York (1997).

### **Usos Profiláticos e Terapêuticos de Péptidos Aromático-Catiônicos**

Os péptidos aromático-catiônicos aqui descritos são úteis para prevenir ou tratar doenças. Especificamente, a divulgação disponibiliza métodos profiláticos e terapêuticos para tratar um indivíduo em risco (ou suscetível) a uma doença ou condição oftálmica. Deste modo, os métodos aqui descritos fornecem prevenção e/ou tratamento de uma doença oftálmica a um indivíduo através da administração de uma quantidade eficaz de um péptido aromático-catiônico a um indivíduo com necessidade disso. Por exemplo, podem ser administradas a um indivíduo composições de péptidos aromático-catiônicos na tentativa de melhorar um ou mais dos fatores que contribuem para uma condição ou doença oftálmica.

Um aspecto da tecnologia inclui métodos para reduzir uma condição oftálmica num indivíduo com fins terapêuticos. Em aplicações terapêuticas, composições ou medicamentos são administrados a um indivíduo suspeito, ou que já sofre de

uma dessas doenças numa quantidade suficiente para curar, ou pelo menos suspender parcialmente, os sintomas da doença, incluindo as suas complicações e fenótipos patológicos intermediários no desenvolvimento da doença. Deste nodo, a divulgação fornece métodos para tratar um indivíduo que sofre de uma condição oftálmica. Em algumas formas de realização, a tecnologia fornece um método para tratar ou prevenir doenças oftálmicas específicas, tais como retinopatia diabética, cataratas, retinite pigmentosa, glaucoma, neovascularização coroidal, degeneração da retina, e retinopatia induzida por oxigénio, num mamífero através da administração de um péptido aromático-catiónico.

Numa forma de realização, um péptido aromático-catiónico é administrado a um indivíduo para tratar ou prevenir a retinopatia diabética. A retinopatia diabética caracterizam-se por microaneurismas capilares e pontos de hemorragia. Para além disso, as obstruções microvasculares causam a formação de manchas brancas na retina. Mais ainda, pode formar-se edema da retina e/ou exsudatos duros em indivíduos com retinopatia diabética devido ao aumento da hiperpermeabilidade vascular. Subsequentemente, a neovascularização aparece e o descolamento da retina é causado por tração do tecido conectivo desenvolvido no corpo vítreo. Podem também ocorrer rubeose da íris e glaucoma neovascular os quais, por sua vez, podem levar à cegueira. Os sintomas de retinopatia diabética incluem, mas não estão limitados a, dificuldade de leitura, visão turva, perda súbita da visão num olho, visão de círculos ao redor das luzes, visão de manchas escuras, e/ou visão de luzes a piscar.

Numa forma de realização, um péptido aromático-catiónico é administrado a um indivíduo para tratar ou prevenir as cataratas. As cataratas são uma doença congénita ou

adquirida caracterizada por redução na claridade natural da lente. Indivíduos com cataratas podem apresentar um ou mais sintomas, incluindo, mas não se limitando a, nebulosidade na superfície da lente, nebulosidade no interior da lente, e/ou inchaço da lente. Exemplos típicos de doenças congénitas associadas à catarata são pseudo-ataratas, catarata da membrana, catarata coronária, cataratas lamelares, cataratas pontuadas, e cataratas filamentosas. Exemplos típicos de doenças adquiridas associadas à catarata são cataratas geriátricas, cataratas secundárias, cataratas de escurecimento, cataratas complicadas, cataratas diabéticas, e cataratas traumáticas. As cataratas adquiridas são também induzíveis por choque elétrico, radiação, ultra-som, fármacos, doenças sistémicas, e distúrbios nutricionais. As cataratas adquiridas incluem ainda cataratas pós-operatórias.

Numa forma de realização, é administrado um péptido aromático-catiónico a um indivíduo para tratar ou prevenir a retinite pigmentosa. A retinite pigmentosa é um distúrbio que é caracterizado pela lesão da célula dos bastonetes e/ou cones. A presença das linhas escuras na retina é típica em indivíduos que sofrem de retinite pigmentosa. Indivíduos com retinite pigmentosa também apresentam uma variedade de sintomas incluindo, mas não se limitando a, dores de cabeça, dormência ou formigueiro nas extremidades, luzes a piscar, e/ou alterações visuais. Ver, por exemplo, Heckenlively et al., *Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol.* 105(5): 504-511 (1988).

Numa forma de realização, um péptido aromático-catiónico é administrado a um indivíduo para tratar ou prevenir glaucoma. O glaucoma é uma doença genética caracterizada por um aumento da pressão intraocular, que conduz à

diminuição da visão. O glaucoma pode originar-se de várias condições oftálmicas que estão previamente presentes num indivíduo, tais como, feridas, cirurgia, e outras malformações estruturais. Apesar de o glaucoma poder ocorrer em qualquer idade, frequentemente desenvolve-se em indivíduos idosos e leva à cegueira. Os doentes de glaucoma tipicamente têm uma pressão intraocular acima de 21 mmHg. No entanto, o glaucoma de pressão normal, onde as alterações glaucomatosas se encontram no campo visual e na papila óptica, pode ocorrer na ausência de pressões oculares aumentadas, isto é, superiores a 21 mmHg. Os sintomas de glaucoma incluem, mas não são limitados a, visão turva, dor forte nos olhos, dor de cabeça, visão de halos à volta das luzes, náuseas, e/ou vômitos.

Numa forma de realização, é administrado um péptido aromático-catiónico a um indivíduo para tratar ou prevenir a degeneração macular. A degeneração macular é tipicamente uma doença relacionada com a idade. As categorias gerais de degeneração macular incluem a degeneração macular húmida, seca, e não relacionada com a idade. A degeneração macular seca, que corresponde a cerca de 80-90 por cento de todos os casos, é também conhecida como degeneração macular atrófica, não exsudativa, ou drusanóide. Com a degeneração macular seca, tipicamente acumulam-se drusas sob o tecido epitelial do pigmento retinal. Perda de visão ocorre subsequentemente quando as drusas interferem com a função dos fotorrecetores na mácula. Os sintomas da degeneração macular seca incluem, mas não são limitados a, visão distorcida, distorção do centro de visão, distorção do claro ou escuro, e/ou alterações na percepção das cores. A degeneração macular seca pode resultar em perda gradual da visão.

A degeneração macular húmida é também conhecida como neovascularização, neovascularização subretiniana, degeneração exsudativa ou disciforme. Com degeneração macular húmida, vasos sanguíneos anormais crescem sob a mácula. Os vasos sanguíneos vazam fluido para a mácula e lesam as células fotorrecetoras. A degeneração da mácula húmida pode progredir rapidamente e causar lesões graves à visão central. A degeneração macular seca e húmida têm sintomas idênticos. A degeneração macular não relacionada com a idade, porém, é rara e pode estar ligada à hereditariedade, diabetes, deficiências nutricionais, feridas, infeção, ou outros fatores. Os sintomas de degeneração macular não relacionada com a idade incluem também, mas não são limitados a, visão distorcida, distorção do centro de visão, distorção do claro ou escuro, e/ou alterações na perceção das cores.

Numa forma de realização, administra-se um péptido aromático-catiónico a um indivíduo para tratar ou prevenir a neovascularização corioideia. A neovascularização corioideia (CNV) é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos na camada corioide do olho. Os vasos sanguíneos formados de novo crescem no corioide, através da membrana de Bruch, e invadem o espaço subretiniano. A CNV pode levar ao comprometimento da visão ou perda completa da visão. Os sintomas de CNV incluem, mas não são limitados a, visão com cintilação, luzes a piscar, ou manchas cinzentas no olho ou olhos afetados, visão turva, visão distorcida, e/ou perda de visão.

Numa forma de realização, administra-se um péptido aromático-catiónico a um indivíduo para tratar ou prevenir a degeneração da retina. A degeneração da retina é uma doença genética que se relaciona com a degradação da retina. O tecido retiniano pode degenerar por vários

motivos, tais como, oclusão arterial ou venosa, retinopatia diabética, retinopatia de prematuridade, e/ou fibroplasia retrolenticular. A degradação da retina geralmente inclui retinosquise, degeneração da estrutura, e está relacionada com degeneração progressiva da mácula. Os sintomas de degradação da retina incluem, mas não são limitados a, deficiência visual, perda de visão, cegueira noturna, visão em túnel, perda da visão periférica, descolamento da retina, e/ou sensibilidade à luz.

Numa forma de realização, administra-se um péptido aromático-catiónico a um indivíduo para tratar ou prevenir a retinopatia induzida por oxigénio. A retinopatia induzida por oxigénio (OIR) é uma doença caracterizada por degeneração microvascular. A OIR é um modelo estabelecido para estudo da retinopatia de prematuridade. A OIR está associada a lesões das células vasculares que culminam em neovascularização anormal. A degeneração microvascular conduz a isquemia que contribui para as alterações físicas associadas à OIR. O stresse oxidativo também desempenha um papel importante na obliteração dos vasos da OIR onde as células endoteliais são propensas a lesões peroxidativas. No entanto, pericitos, células do músculo liso, e astrócitos perivasculares, são geralmente resistentes a lesões peroxidativas. Ver, por exemplo, Beauchamp *et al.*, *Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy*, *J Appl. Physiol.* 90: 2279-2288 (2001). A OIR, incluindo retinopatia de prematuridade, é geralmente assintomática. Porém, movimentos anormais do olho, estrabismo, miopia grave, e/ou leucocoria, podem ser sinais de OIR ou retinopatia da prematuridade.

A invenção fornece um péptido representado pela fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> para uso no tratamento ou prevenção de uma condição oftálmica em que

a condição oftálmica é selecionada a partir do grupo que consiste em rinite pigmentosa, neovascularização coroidal, e retinopatia induzida por oxigénio. Indivíduos em risco de uma doença oftálmica podem ser identificados, por exemplo, por qualquer teste ou combinação de testes diagnósticos ou prognósticos como aqui descritos. Em aplicações profiláticas, as composições farmacêuticas ou medicamentos à base de péptidos aromático-catiónicos são administrados a um indivíduo susceptível a, ou de outro modo em risco de doença ou condição, numa quantidade suficiente para eliminar ou reduzir o risco, diminuir a gravidade, ou atrasar o início da doença, incluindo sintomas da doença bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais, suas complicações e fenótipos patológicos intermédios presentes durante o desenvolvimento da doença. A administração de um aromático-catiónico profilático pode ocorrer antes da manifestação dos sintomas característicos da aberração, de tal modo que uma doença ou distúrbio é prevenida ou, em alternativa, retardada na sua progressão. Dependendo do tipo de aberração, por exemplo, um péptido aromático-catiónico que atua para aumentar ou melhorar a função mitocondrial ou reduzir as lesões oxidativas pode ser usado para tratar o indivíduo. O composto adequado pode ser determinado com base em ensaios de rastreio aqui descritos.

*Determinação do Efeito Biológico da Terapêutica à Base do Péptido aromático-catiónico.* Em várias formas de realização, são realizados ensaios adequados *in vitro* ou *in vivo* para determinar o efeito de uma terapêutica à base do péptido aromático-catiónico específico e se a sua administração é indicada para o tratamento. Em várias formas de realização, podem ser realizados ensaios *in vitro* com células representativas do(s) tipo(s) envolvido(s) na doença do indivíduo, para determinar se uma dada

terapêutica à base de péptidos aromático-catiónicos exerce o desejado efeito sobre o tipo de célula(s). Compostos para uso em terapia podem ser testados em sistemas de modelos animais incluindo, mas não se limitando a ratazanas, ratinhos, galinhas, vacas, macacos, coelhos, e afins, antes dos testes em indivíduos humanos. De modo semelhante, para testes *in vivo*, qualquer dos sistemas de modelo animal conhecidos na técnica podem ser usados para administração a indivíduos humanos. Numa forma de realização, a administração de um péptido aromático-catiónico a um indivíduo exibindo sintomas associados a uma condição oftálmica pode causar uma melhoria de um ou mais desses sintomas.

#### **Modos de Administração e Dosagens Eficazes**

Qualquer método conhecido pode ser empregue da técnica para contatar uma célula, órgão ou tecido com um péptido. Métodos adequados incluem métodos *in vitro*, *ex vivo*, ou *in vivo*. Os métodos *in vivo* incluem tipicamente a administração de um péptido aromático-catiónico, tal como os descritos acima, a um mamífero, preferencialmente a um humano. Quando usados *in vivo* para terapia, os péptidos aromático-catiónicos são administrados a um indivíduo em quantidades eficazes (isto é, quantidades que têm o efeito terapêutico desejado). A dose e regime de dosagem vão depender do grau da doença oftálmica do indivíduo, das características do péptido aromático-catiónico específico usado, por exemplo, o seu índice terapêutico, o indivíduo, e a história do indivíduo.

A quantidade eficaz pode ser determinada durante ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos através de métodos familiares dos médicos e clínicos. Uma quantidade eficaz de



um péptido útil nos métodos da presente invenção, preferencialmente numa composição farmacêutica, pode ser administrada a um mamífero com essa necessidade por qualquer método dos vários métodos bem conhecidos para administração de compostos farmacêuticos. Em algumas formas de realização, o péptido pode ser administrado por via sistêmica, tópica, ou intraocular.

Os péptidos aromático-catiônicos aqui descritos podem ser incorporados nas composições farmacêuticas para administração, isoladamente ou em combinação, a um indivíduo para o tratamento ou prevenção de um distúrbio aqui descrito. Essas composições incluem tipicamente o agente ativo e um transportador farmacêuticamente aceitável. Conforme aqui usado o termo "transportador farmacêuticamente aceitável" inclui solução salina, solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento da absorção e isotônicos, e afins, compatíveis com administração farmacêutica. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

As composições farmacêuticas são tipicamente formuladas para serem compatíveis com as respectivas vias de administração pretendidas. Exemplos de vias de administração incluem administração parentérica (por exemplo, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal ou subcutânea), oral, por inalação, transdérmica (tópica), intraocular, iontoforética, e transmucosal. As soluções ou suspensões usadas para aplicação parentérica, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixados, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil

parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetraacético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para ajustamento da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico. Para conveniência do doente ou do médico assistente, a formulação de dosagem pode ser fornecida num kit contendo todo o equipamento necessário (por exemplo, frascos de fármaco, frascos de diluente, seringas e agulhas) para um ciclo de tratamento.

As composições farmacêuticas adequadas para uso injetável podem incluir soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa, transportadores adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) ou tampão fosfato salino (PBS). Em todos os casos, uma composição para administração parentérica pode ser estéril e deve ser fluída de modo a que a aplicação por seringa seja facilitada. Deve ser estável sob as condições de fabrico e armazenamento e deve ser conservada protegida da ação contaminante por microrganismos tais como bactérias e fungos.

As composições de péptidos aromático-catiónicos podem incluir um transportador, o qual pode ser um solvente ou um meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por

exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser conseguida com vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, tiomerasol, e semelhantes. Glutathione e outros antioxidantes podem ser incluídos para prevenir oxidação. Em muitos casos, pode ser desejável incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que prolongue a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo numa quantidade necessária num solvente apropriado com um componente ou uma combinação de componentes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo num veículo estéril, que contém um meio de dispersão básico e os outros componentes necessários de entre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação típicos incluem secagem a vácuo e liofilização, que podem produzir um pó do componente ativo mais qualquer componente adicional desejado a partir de uma solução destes previamente esterilizada por filtração.

Para aplicações oftálmicas, o composto terapêutico é formulado como soluções, suspensões, e pomadas adequadas para uso no olho. Para formulações oftálmicas geralmente, ver Mitra (ed.), *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. (1993) e também Havener, W.

H., *Ocular Pharmacology*, C.V. Mosby Co., St. Louis (1983). As composições farmacêuticas oftálmicas podem ser adaptadas para administração tópica no olho na forma de soluções, suspensões, pomadas, cremes ou como uma inserção sólida. Para uma dose única, desde entre 0,1 ng até 5000 µg, 1 ng até 500 µg, ou 10 ng até 100 µg dos péptidos aromático-catiónicos podem ser aplicados no olho humano.

A preparação oftálmica pode conter substâncias auxiliares não tóxicas tais como componentes antibacterianos que não sejam lesivos quando usados, por exemplo, timerosal, cloreto de benzalcónio, metil e propil parabeno, brometo de benzildodecínio, álcool benzílico, ou feniletanol; componentes de tamponamento tais como tampões de cloreto de sódio, borato de sódio, acetato de sódio, citrato de sódio, ou gluconato; e outros componentes convencionais tais como monolaurato de sorbitano, trietanolamina, monopalmitilato de polioxietileno de sorbitano, ácido etilenodiamino tetracético, e afins.

A solução ou suspensão oftálmica pode ser administrada tantas vezes quantas necessárias para manter um nível aceitável do péptido aromático-catiónico no olho. A administração no olho do mamífero pode ser cerca de uma a duas vezes por dia.

As composições orais incluem geralmente um diluente inerte ou um transportador edível. Com o objetivo de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usados na forma de comprimidos, pastilhas, ou cápsulas, por exemplo, cápsulas de gelatina. Agentes ligantes farmacêuticamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e afins podem

conter qualquer dos seguintes componentes, ou compostos de natureza semelhante: um ligante tal como celulose microcristalina, goma de tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente de desintegração tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um lubrificante tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, ou aromatizante de laranja.

Para administração por inalação, os compostos podem ser distribuídos na forma de um spray de aerossol de um recipiente ou aplicador pressurizado que contém um propulsor adequado, por exemplo, um gás como dióxido de carbono, ou a nebulizador. Tais métodos incluem os descritos na Pat. U.S. No. 6,468,798.

A administração sistêmica de um composto terapêutico como aqui descrito pode também ser por via transmucosal ou transdérmica. Para administração transmucosal ou transdérmica são usados penetrantes adequados à barreira a ser permeada na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, detergentes, sais biliares, e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosal pode ser conseguida através do uso de sprays nasais. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em pomadas, unguentos, géis, ou cremes como os geralmente conhecidos na técnica. Numa forma de realização, a administração transdérmica pode ser realizada por iontoforese.

Uma proteína ou péptido terapêuticos podem ser formulados num sistema transportador. O transportador pode ser um

sistema coloidal. O sistema coloidal pode ser um lipossoma, um veículo fosfolípido bicamada. Numa forma de realização, o péptido terapêutico é encapsulado num lipossoma mantendo no entanto a integridade do péptido. Como seria apreciado por um especialista na técnica, há uma variedade de métodos para preparar lipossomas. (Ver Lichtenberg *et al.*, *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988); Anselem *et al.*, *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). As formulações lipossomais podem retardar a depuração e aumentar a absorção celular (Ver Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (J-8):915-923 (2000)). Um agente ativo pode também ser colocado numa partícula preparada a partir de componentes farmacologicamente aceitáveis incluindo, mas não se limitando a, polímeros ou lipossomas solúveis, insolúveis, permeáveis, impermeáveis, biodegradáveis ou de retenção gástrica. Tais partículas incluem, mas não estão limitadas a, nanopartículas, nanopartículas biodegradáveis, micropartículas, micropartículas biodegradáveis, nanoesferas, nanoesferas biodegradáveis, microesferas, microesferas biodegradáveis, cápsulas, emulsões, lipossomas, micelas e sistemas de vetores virais.

O transportador pode também ser um polímero, por exemplo, uma matriz de polímero biodegradável, biocompatível. Numa forma de realização, o péptido terapêutico pode ser embebido numa matriz de polímero, mantendo no entanto a integridade da proteína. O polímero pode ser natural, tal como polipéptidos, proteínas ou polissacáridos, ou sintético, tal como ácidos poli  $\alpha$ -hidroxi. Exemplos incluem transportadores feitos, por exemplo, de colagénio, fibronectina, elastina, acetato de celulose, nitrato de celulose, polissacárido, fibrina, gelatina, e combinações destes. Numa forma de realização, o polímero é ácido polilático (PLA) ou ácido copolilático/glicólico (PGLA).

As matrizes poliméricas podem ser preparadas e isoladas numa variedade de formas e tamanhos, incluindo microesferas e nanoesferas. As formulações poliméricas podem conduzir a duração prolongada do efeito terapêutico. (Ver Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8): 915-923 (2000)). Uma formulação polimérica para a hormona de crescimento humana (hGH) tem sido usada em ensaios clínicos. (Ver Kozarich e Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552 (1998)).

Exemplos de formulações de libertação controlada de microesferas de polímero são descritos na publicação PCT WO 99/15154 (Tracy et al.), Pat. U.S. Nos. 5,674,534 e 5,716,644 (ambas de Zale et al.), publicação PCT WO 96/40073 (Zale et al.), e publicação PCT WO 00/38651 (Shah et al.). As Pat. U.S. Nos. 5,674,534 e 5,716,644 e publicação PCT WO 96/40073 descrevem uma matriz polimérica contendo partículas de eritropoietina que são estabilizadas contra a agregação com um sal.

Em algumas formas de realização, os compostos terapêuticos são preparados com transportadores que vão proteger os compostos terapêuticos contra a rápida eliminação do organismo, tais como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de administração microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno acetato de vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido polilacético. Essas formulações podem ser preparadas usando técnicas conhecidas. Os materiais podem também ser obtidos comercialmente, por exemplo, da Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossômicas (incluindo lipossomas direcionados para células específicas com anticorpos monoclonais para antigénios específicos de células) podem também ser usadas

como transportadores farmacêuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, conforme descrito na Pat. U.S. No. 4,522,811.

Os compostos terapêuticos podem também ser formulados para aumentar a administração intracelular. Por exemplo, os sistemas de administração lipossomais são conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Chonn e 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); e 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), descreve o uso de lipossomas fusogênicos para administrar uma proteína às células tanto *in vivo* como *in vitro*.

A dosagem, toxicidade e eficácia terapêutica dos agentes terapêuticos podem ser determinados por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais de experiência, por exemplo, para determinar a LD50 (a dose letal para 50% da população) e o ED50 (a dose terapeuticamente eficaz para 50% da população). A razão de doses entre o efeito tóxico e terapêutico é o índice terapêutico e pode ser expresso como a razão LD50/ED50. Compostos que apresentam elevados índices terapêuticos são preferidos. Embora compostos que apresentam efeitos secundários tóxicos possam ser usados, deve ter-se cuidado no delineamento do sistema de administração desses compostos para o sítio do tecido afetado de modo a minimizar os danos potenciais para células não infectadas e, assim, reduzir os efeitos secundários.



Os dados obtidos dos ensaios de culturas celulares e estudos em animais podem ser usados na formulação de uma gama de dosagens para uso em humanos. A dosagem desses compostos reside preferencialmente numa gama de concentrações de circulação que inclui ED50 com pequena ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta gama dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente em ensaios de cultura de células. A dosagem pode ser formulada em modelos animais para conseguir uma gama de concentrações plasmáticas em circulação que inclui a IC50 (isto é, a concentração do composto de teste que atinge metade da inibição máxima dos sintomas) conforme determinado em cultura de células. Essa informação pode ser usada para determinar mais cuidadosamente os níveis de dose úteis em humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta resolução.

Tipicamente, uma quantidade eficaz dos péptidos aromático-catiónicos, suficiente para atingir um efeito terapêutico ou profilático, varia desde cerca de 0,000001 mg por quilograma de peso corporal por dia até cerca de 10.000 mg por quilograma de peso corporal por dia. Preferencialmente, a gama de dosagem é desde cerca de 0,0001 mg por quilograma de peso corporal por dia até cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal por dia. Por exemplo as doses podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal por dia, a cada dois dias ou a cada três dias ou numa gama de 1-10 mg/kg semanalmente, a cada duas semanas ou a cada três semanas. Numa forma de realização, uma dosagem única do péptido varia entre 0,1-10.000 microgramas por kg de peso corporal. Numa forma de realização, as concentrações de péptidos aromático-catiónicos num transportador varia desde 0,2 até 2000 microgramas por mililitro administrado. Um

regime de tratamento exemplificativo implica a administração uma vez por dia ou uma vez por semana. Os intervalos podem também ser irregulares conforme indicado pela medição dos níveis de glucose ou insulina no indivíduo e ajustando a dosagem ou a administração em conformidade. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é por vezes necessária até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, e preferencialmente até o indivíduo mostrar melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Posteriormente, pode ser administrado ao doente um regime profilático.

Em algumas formas de realização, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um péptido aromático-catiónico pode ser definida como uma concentração de péptido no tecido alvo de  $10^{-11}$  até  $10^{-6}$  molar, por exemplo, aproximadamente  $10^{-7}$  molar. Esta concentração pode ser aplicada por doses sistémicas de 0,001 até 100 mg/kg ou dose equivalente por área de superfície corporal. O plano de doses pode ser otimizado para manter a concentração terapêutica no tecido alvo, o mais preferencialmente com uma única administração diária ou semanal, mas também incluindo administração contínua (por exemplo, infusão parentérica ou aplicação transdérmica).

Em algumas formas de realização, a dosagem do péptido aromático-catiónico é fornecido a um nível de dose "baixo," "médio," ou "alto". Numa forma de realização, a dose baixa é fornecida desde cerca de 0,0001 até cerca de 0,5 mg/kg/h, adequadamente desde cerca de 0,01 até cerca de 0,1 mg/kg/h. Numa forma de realização, a dose média é fornecida desde cerca de 0,1 até cerca de 1,0 mg/kg/h, adequadamente desde cerca de 0,1 até cerca de 0,5 mg/kg/h. Numa forma de realização, a dose alta é fornecida desde cerca de 0,5 até

cerca de 10 mg/kg/h, adequadamente desde cerca de 0,5 até cerca de 2 mg/kg/h.

O especialista na técnica vai apreciar que determinados fatores podem influenciar a dosagem e o momento necessário para tratar efetivamente um indivíduo, incluindo mas não se limitando a, gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos prévios, saúde geral e/ou idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Principalmente, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz das composições terapêuticas aqui descritas pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos.

O especialista na técnica vai apreciar que determinados fatores podem influenciar a dosagem e o momento necessário para tratar efetivamente um indivíduo, incluindo mas não se limitando a, gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos prévios, estado geral de saúde e/ou idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Principalmente, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz das composições terapêuticas aqui descritas pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos.

O mamífero tratado de acordo com os presentes métodos pode ser qualquer mamífero, incluindo, por exemplo, animais de quinta, tais como ovelhas, porcos, vacas e cavalos; animais de estimação, tais como cães e gatos; animais de laboratório, tais como ratazanas, ratinhos e coelhos. Numa forma de realização preferida, o mamífero é um humano.

### **Terapia de Combinação com um Péptido Aromático-Catiónico e Outros Agentes Terapêuticos**

Em certos casos, pode ser apropriado administrar pelo menos um dos péptidos aromático-catiónicos aqui descritos (ou um sal, éster, amida, profármaco, ou solvato farmaceuticamente aceitáveis) em combinação com outro agente terapêutico. Apenas a título de exemplo, se um dos efeitos colaterais experienciados por um doente após receber um destes péptidos aromático-catiónicos for inflamação, pode ser apropriado administrar um agente anti-inflamatório em combinação com o agente terapêutico inicial. Ou, apenas a título de exemplo, a eficácia terapêutica de um dos compostos aqui descritos pode ser melhorada através da administração de um adjuvante (isto é, por si só o adjuvante pode ter somente um benefício terapêutico mínimo, mas em combinação com outro agente terapêutico, o benefício terapêutico total para o doente é melhorado). Ou, apenas a título de exemplo, o benefício experienciado por um doente pode ser aumentado através da administração de um dos compostos aqui descritos com outro agente terapêutico (o qual também inclui um regime terapêutico) que também tem benefício terapêutico na prevenção ou tratamento das condições oftálmicas. Apenas a título de exemplo, num tratamento de degeneração macular envolvendo a administração de um dos péptidos aromático-catiónicos aqui descritos, o benefício terapêutico aumentado pode resultar também pelo fornecimento ao doente com outros agentes terapêuticos ou terapias para a degeneração macular. Em qualquer caso, independentemente da doença, distúrbio ou condição oftálmica a tratar, o benefício total experienciado pelo doente pode simplesmente ser o aditivo de dois agentes terapêuticos ou o doente por experienciar um benefício sinérgico.

Exemplos específicos, não limitativos de terapias de combinação possíveis incluem o uso de pelo menos um péptido aromático-catiónico com indutores de óxido nítrico (NO) indutores, estatinas, fosfolípidos carregados negativamente, antioxidantes, minerais, agentes anti-inflamatórios, agentes antiangiogénicos, inibidores da matriz de metaloproteinase, e carotenoides. Em vários casos, agentes de combinação adequados podem cair em múltiplas categorias (apenas a título de exemplo, a luteína é um antioxidante e um carotenoide). Mais ainda, os péptidos aromático-catiónicos podem também ser administrados com agentes adicionais que podem fornecer benefício ao doente, incluindo, apenas a título de exemplo, a ciclosporina A.

Adicionalmente, os péptidos aromático-catiónicos podem também ser usados em combinação com procedimentos que podem fornecer benefício adicional ou sinérgico ao doente, incluindo, apenas a título de exemplo, o uso de reoforese extracorporal (também conhecido como filtração de membrana diferencial), o uso de telescópios miniatura implantáveis, fotocoagulação a laser de drusas, e terapia de microestimulação.

O uso de antioxidantes mostrou beneficiar doentes com degenerações e distrofias maculares. Ver, por exemplo, *Arch. Ophthalmol.*, 119: 1417-36 (2001); Sparrow, et al., *J. Biol. Chem.*, 278:18207-13 (2003). Exemplos de antioxidantes adequados que podem ser usados em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico incluem vitamina C, vitamina E, betacaroteno e outros carotenoides, coenzima Q, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido (também conhecido como Tempol), luteína, hidroxitolueno butilado, resveratrol, um análogo de trolox (PNU-83836-E), e extrato de mirtilo.

O uso de certos minerais mostrou beneficiar doentes com degeneração e distrofias da mácula. Ver, por exemplo, *Arch. Ophthalmol.*, 119: 1417-36 (2001). Exemplos de minerais adequados que podem ser usados em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico incluem minerais contendo cobre, tais como óxido cúprico; minerais contendo zinco, tais como óxido de zinco; e compostos contendo selénio.

O uso de certos fosfolípidos carregados negativamente mostrou beneficiar doentes com degeneração e distrofias maculares. Ver, por exemplo, Shaban & Richter, *Biol. Chem.*, 383:537-45 (2002); Shaban, et al., *Exp. Eye Res.*, 75:99-108 (2002). Exemplos de fosfolípidos carregados negativamente adequados que podem ser usados em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico incluem cardiolipina e fosfatidilglicerol. Fosfolípidos carregados negativamente e/ou neutros pode também fornecer benefício aos doentes com degenerações e distrofias maculares quando usados em combinação com péptidos aromático-catiónicos.

O uso de certos carotenoides tem sido correlacionado com a manutenção da fotoproteção necessária nas células fotorrecetoras. Os carotenoides são pigmentos amarelos a vermelhos que ocorrem naturalmente do grupo dos terpenoides que podem ser encontrados em plantas, algas, bactérias, e certos animais, tais como pássaros e mariscos. Os carotenoides são uma vasta classe de moléculas na qual foram identificados mais de 600 carotenoides que ocorrem naturalmente. Os carotenoides incluem hidrocarbonetos (carotenos) e seus derivados alcoólicos oxigenados, (xantofilas). Incluem actinioeritrol, astaxantina, cantaxantina, capsantina, capsorubina,  $\beta$ -8'-apo-carotenal (apo-carotenal),  $\beta$ -12'-apo-carotenal,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, "caroteno" (uma mistura de  $\alpha$  - e  $\beta$ -carotenos),  $\gamma$ -

carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, licopeno, violeritrina, zeaxantina, e seus ésteres contendo membros hidroxilo ou carboxilo. Muitos dos carotenoides ocorrem na natureza como formas isoméricas cis e trans, enquanto que compostos sintéticos são frequentemente misturas racêmicas.

Em humanos, a retina acumula seletivamente principalmente dois carotenoides: zeaxantina e luteína. Estes dois carotenoides pensa-se que são auxiliares na proteção da retina porque são poderosos antioxidantes e absorvem luz azul. Estudos com codornizes estabelecem que grupos criados com dieta deficiente em carotenoides tinham retinas com baixas concentrações de zeaxantina e sofreram graves lesões com a luz, como evidenciado por um elevado número de células fotorrecetoras apoptóticas, enquanto que o grupo com altas concentrações de zeaxantina tinham lesões mínimas. Exemplos de carotenoides adequados em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico incluem luteína e zeaxantina, assim como qualquer dos carotenoides acima mencionados.

Indutores de óxido nítrico adequados incluem compostos que estimulam NO endógeno ou aumentam os níveis de fator relaxante derivado do endotélio endógeno (EDRF) *in vivo* ou são substratos para óxido nítrico sintase. Esses compostos incluem, por exemplo, L-arginina, L-homoarginina, e N-hidroxi-L-arginina, incluindo os seus análogos nitrosados e nitrosilados (por exemplo, L-arginina nitrosada, L-arginina nitrosilada, N-hidroxi-L-arginina nitrosada, N-hidroxi-L-arginina nitrosada, L-homoarginina nitrosada e L-homoarginina nitrosilada), precursores de L-arginina e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, incluindo, por exemplo, citrulina, ornitina, glutamina, lisina, polipéptidos compreendendo pelo menos um desses

aminoácidos, inibidores da enzima arginase (por exemplo, N-hidroxi-L-arginina e ácido 2(S)-amino-6-boronohexanóico) e os substratos para óxido nítrico sintase, citocinas, adenosina, bradiquinina, calreticulina, bisacodilo, e fenolftaleína. EDRF é um fator de relaxamento vascular secretado pelo endotélio, e foi identificado como óxido nítrico ou um seu derivado estreitamente relacionado (Palmer *et al.*, *Nature*, 327:524-526 (1987); Ignarro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 84:9265-9269 (1987)).

As estatinas servem como agentes hipolipemiantes e/ou indutores de óxido nítrico adequados. Adicionalmente, foi demonstrada uma relação entre o uso de estatina e atraso no aparecimento ou desenvolvimento de degeneração macular. G. McGwin, *et al.*, *British Journal of Ophthalmology*, 87:1121-25 (2003). As estatinas podem, assim, proporcionar benefícios a um doente que sofre de uma condição oftálmica (tal como degeneração e distrofias maculares, e distrofias retinianas) quando administradas em combinação com péptidos aromático-catiónicos. Estatinas adequadas incluem, apenas a título de exemplo, rosuvastatina, pitivastatina, simvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatina, fluvastatina, compactina, lovastatina, dalvastatina, fluindostatina, atorvastatina, atorvastatina cálcica (a qual é o sal hemicálcico de atorvastatina), e dihidrocompactina.

Agentes anti-inflamatórios adequados com os quais os péptidos aromático-catiónicos podem ser utilizados incluem, apenas a título de exemplo, aspirina e outros salicilatos, cromolina, nedocromil, teofilina, zileutona, zafhiukast, montelukast, pranlukast, indometacina, e inibidores de lipoxigenase; fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) (tais como ibuprofeno e naproxina); prednisona, dexametasona, inibidores da ciclooxigenase (isto é,



inibidores da COX-I e/ou COX-2 tais como Naproxen<sup>TM</sup>, ou Celebrex<sup>TM</sup>); estatinas (apenas a título de exemplo, rosuvastatina, pitivastatina, simvastatina, pravastatina, cerivastatina, mevastatina, velostatina, fluvastatina, compactina, lovastatina, dalvastatina, fluindostatina, atorvastatina, atorvastatina cálcica (a qual é o sal hemicálcio de atorvastatina), e dihidrocompactina); e esteroides dissociados.

Inibidores de matrizes de metaloproteinases (MMPs) adequados podem também ser administrados em combinação com péptidos aromático-catiônicos com vista a tratar condições oftálmicas ou sintomas associados à degeneração macular ou da retina. As MMPs são conhecidas por hidrolisarem a maioria dos componentes da matriz extracelular. Estas proteinases desempenham um papel central em muitos processos biológicos tais como remodelação do tecido normal, embriogénese, cicatrização de feridas e angiogénese. Porém, a expressão excessiva de MMP foi observada em muitos estados de doença, incluindo degeneração macular. Muitas MMPs foram identificadas, a maioria das quais são endopeptidases de zinco multidomínio. Conhecem-se vários inibidores de metaloproteinases (ver por exemplo a revisão dos inibidores de MMP de Whittaker M. *et al.*, *Chemical Reviews* 99(9):2735-2776 (1999)). Exemplos representativos de inibidores de MMP incluem Inibidores Tecidulares de Metaloproteinases (TIMPs) (por exemplo, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, ou TIMP-4),  $\alpha$ -2-macroglobulina, tetraciclinas (por exemplo, tetraciclina, minociclina, e doxiciclina), hidroxamatos (por exemplo, BATIMASTAT, MARIMISTAT e TROCADE), quelantes (por exemplo, EDTA, cisteína, acetilcisteína, D-penicilamina, e sais de ouro), fragmentos de MMP sintéticos, succinil mercaptopurinas, fosfonamidatos, e ácidos hidroxamínicos. Exemplos de

inibidores de MMP que podem ser usados em combinação com péptidos catiónico-aromáticos incluem, apenas a título de exemplo, qualquer dos inibidores acima mencionados.

O uso de fármacos antiangiogénicos ou anti-VEGF mostrou também fornecer benefício a doentes com degeneração e distrofias maculares. Exemplos de fármacos antiangiogénicos ou anti-VEGF adequados que podem ser usados em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico incluem Rhufab V2 (Lucentis<sup>TM</sup>), Triptofanil-tRNA sintetase (TrpRS), Eye001 (Aptamer Pegilado Anti-VEGF), esqualamina, Retaane<sup>TM</sup> 15 mg (acetato de anecortave para suspensão de depósito; Alcon, Inc.), Profármaco combretastatina A4 (CA4P), Macugen<sup>TM</sup>, Mifeprex<sup>TM</sup> (mifepristona~ru486), triancinolona acetonida subtenoniana, triamcinolona acetonida cristalina intravítrea, Prinomastat (inibidor AG3340 de metaloproteínase de matriz sintética, Pfizer), fluocinolona acetonida (incluindo implante intraocular de fluocinolona, Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), inibidores de VEGFR (Sugen), e VEGF-Trap (Regeneron/Aventis).

Outras terapias farmacêuticas que têm sido usadas para aliviar a incapacidade visual podem ser usadas em combinação com pelo menos um péptido aromático-catiónico. Esses tratamentos incluem mas não são limitados a agentes tais como Visudyne<sup>TM</sup> com o uso de um laser não térmico, PKC 412, Endovion (NeuroSearch A/S), fatores neurotróficos, incluindo a título de exemplo Fator Neurotróficos Derivados Glial e Fator Neurotrófico Ciliar, diatazem, dorzolamida, Phototrop, 9-cis-retiniana, medicação ocular (incluindo Echo Therapy) incluindo iodeto de fosfolina ou ecotiofato ou inibidores da anidrase carbónica, AE-941 (AEterna Laboratories, Inc.), Sirna-027 (Sirna Therapeutics, Inc.), pegaptanibe (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), neurotrofinas (incluindo, apenas a título de exemplo, NT-

4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), ranibizumab (Genentech), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), antagonistas da integrina (incluindo os da Jerini AG e Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), talidomida (como usado, por exemplo, por EntreMed, Inc.), cardiotrofina-1 (Genentech), 2-metoxiestradiol (Allergan/Oculex), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), tetratiomolibdato (Universidade de Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech), composto de microalgas (Aquasearch/ Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), inibidores da tirosina quinase (Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS França SA), neuroprotetores das células ganglionares retinianas (Cogent Neurosciences), derivados de N-nitroporazole (Texas A&M University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), e ciclosporina A.

Em qualquer caso, os múltiplos agentes terapêuticos podem ser administrados em qualquer ordem ou mesmo simultaneamente. Se simultaneamente, os múltiplos agentes terapêuticos podem ser fornecidos numa forma unitária, forma unificada, ou em formas múltiplas (apenas a título de exemplo, tanto como uma única solução ou como duas soluções separadas). Um dos agentes terapêuticos pode ser dado em doses múltiplas, ou ambos podem ser dados como doses múltiplas. Se não simultâneas, o tempo entre as doses múltiplas pode variar desde mais de zero semanas até menos de cerca de quatro semanas, menos de cerca de seis semanas, menos de cerca de 2 meses, menos de cerca de 4 meses, menos de cerca de 6 meses, ou menos de cerca de um ano. Adicionalmente, os métodos de combinação, composições e formulações não são para serem limitadas ao uso de apenas dois agentes. Apenas a título de exemplo, um péptido

aromático-catiónico pode ser fornecido com pelo menos um antioxidante e pelo menos um fosfolípido carregado negativamente; ou um péptido aromático-catiónico pode ser fornecido com pelo menos um antioxidante e pelo menos um indutor da produção de óxido nítrico; ou um péptido aromático-catiónico pode ser fornecido com pelo menos um indutor de produções de óxido nítrico e pelo menos um fosfolípido carregado negativamente; e assim sucessivamente.

Adicionalmente, um péptido aromático-catiónico pode também ser usado em combinação com procedimentos que podem fornecer benefícios adicionais ou sinérgicos ao doente. Procedimentos conhecidos, propostos ou considerados para aliviar a deficiência visual incluem mas não são limitados a "translocação retiniana limitada", terapia fotodinâmica (incluindo, apenas a título de exemplo, PDT dirigido a recetor, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfímero sódico para injeção com PDT; verteporfina, QLT Inc.; rostaporfina com PDT, Miravent Medical Technologies; talaporfina sódica com PDT, Nippon Petroleum; motexafina lutécia, Pharmacyclics, Inc.), oligonucleótidos antisentido (incluindo, a título de exemplo, produtos testados por Novagali Pharma SA e ISIS-13650, Isis Pharmaceuticals), fotocoagulação a laser, aplicação de laser a drusas, cirurgia do buraco macular, cirurgia de translocação macular, telescópios miniatura implantáveis, Angiografia Phi-Motion (também conhecida como Terapia Micro-Laser e Tratamento Feeder Vessel), Terapia de Feixe de Protões, terapia de microestimulação, cirurgia do descolamento da retina e do Vítreo, Buckle Escleral, Cirurgia Submacular, Termoterapia Transpupilar, terapia de Fotossistema I, uso de RNA de interferência (RNAi), reoforese extracorpórea (também conhecida como filtração de membrana diferencial e Reoterapia), implantação de microchip, terapia com células estaminais, terapia de

substituição genética, terapia genética de ribozima (incluindo terapia genética para o elemento de resposta a hipoxia, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; terapia genética PDEF, GenVec), transplante de células fotorrecetoras/retinianas (incluindo células epiteliais retinianas transplantáveis, Diacrin, Inc.; transplante de células retiniana, Cell Genesys, Inc.), e acupuntura.

Outras combinações que podem ser usadas para beneficiar um indivíduo incluem usar testagem genética para determinar se o indivíduo é um transportador de um gene mutante conhecido por estar correlacionado com certas condições oftálmicas. Apenas a título de exemplo, pensa-se que defeitos no gene ABCA4 humano estão associados a cinco fenótipos retinianos distintos incluindo doença de Stargardt, distrofia dos cones/bastonetes, degeneração macular relacionada com a idade e retinite pigmentosa. Ver por exemplo, Allikmets *et al.*, *Science*, 277:1805-07 (1997); Lewis *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 64:422-34 (1999); Stone *et al.*, *Nature Genetics*, 20:328-29 (1998); Allikmets, *Am. J. Hum. Gen.*, 67:793-799 (2000); Klevering, *et al.*, *Ophthalmology*, 111:546-553 (2004). Adicionalmente, uma forma autossômica dominante da Doença de Stargardt é causada por mutações no gene ELOV4. Ver Karan, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). Doentes possuindo qualquer destas mutações espera-se que encontrem benefício terapêutico e/ou profilático nos métodos aqui descritos.

### EXEMPLOS

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como limitantes de qualquer forma.

Exemplo de Referência 1 - Prevenção de Lesão Induzida por Glucose Elevada de células Epiteliais da Retina Humana

Os efeitos dos péptidos aromático-catiônicos da invenção na prevenção de lesões induzidas por glucose elevada em células epiteliais da retina humana (HREC) foram investigados em HRECs cultivadas.

Métodos de cultura de HREC úteis nos estudos da presente invenção são conhecidos. *Ver geralmente*, Li B, Tang SB, Zhang G, Chen JH, Li BJ. Culture and characterization of human retinial capillary endothelial cell. *Chin Ophthal Res* 2005; 23: 20-2; Premanand C, Rema M, Sameer MZ, Sujatha M, Balasubramanyam M. Effect of curcumin on proliferation of human retiniana endothelial cells under *in vitro* conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2179-84.

Em resumo, as células HREC foram divididas em três grupos: um grupo normal de controlo; um grupo administrado com 30 mM de glucose; e um grupo administrado com 30 mM de glucose + SS-31. A sobrevivência das HRECs em glucose elevada co-tratadas com diferentes concentrações de SS-31 (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) foi medida usando um ensaio de Anexina V+PI e citometria de fluxo. *Ver geralmente*, Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., e van Oers, M. H. J. 1994. Anexina V para detecção de fluxo citométrico da expressão da fosfatidilserina nas células B que sofreram apoptose. *Blood* 84: 1415; Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., e Roos, D. 1995. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 85: 532; Vermes, L, Haanen, C, Steffens-Nakken, H., e Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for

apoptose - flow citometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184: 39; Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., e Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207.

A sobrevivência das HRECs de glucose elevada co-tratadas com SS-31 foi testada às 24 h e 48 h. Os resultados são conhecidos na Fig. 1 e indicam que a sobrevivência das HRECs foi significativamente melhorada com a administração de SS-31, com uma redução das células apoptóticas e necróticas. O tratamento com SS-31 também reduziu a produção de ROS (Fig. 2).

Procedeu-se à avaliação de SS-31 como protetor contra a perda mitocondrial potencial das HRECs tratadas com glucose elevada. Para determinar se um passo mediado por mitocôndria foi importante no efeito protetor de SS31 contra a morte celular induzida por glucose elevada, mediu-se  $\Delta\Psi_m$  por citometria de fluxo. Após tratamento das HRECs com glucose elevada sem SS31 durante 24 ou 48 horas, uma perda rápida de potencial de membrana mitocondrial foi detetada por sonda fluorescente JC-I como indicado por um decréscimo significativo na razão de fluorescência do vermelho em relação ao verde observada no grupo de glucose elevada. Em contraste,  $\Delta\Psi_m$  no grupo co-tratado com 100 nM de SS31 permaneceu virtualmente inalterado e foi comparável ao grupo controle de glucose normal (Fig. 3). Estes dados sugerem que SS31 preveniu a perda de potencial da membrana mitocondrial causada por exposição a um ambiente de glucose elevada.

A libertação de citocromo c induzida por glucose (30 mmol/L) da mitocôndria das HRECs. As HRECs fixadas foram imunomarcadas com um anticorpo de citocromo c e um anticorpo de proteína específico da mitocôndria (HSP60). A análise microscópica confocal mostrou que as HRECs em cultura normal e em SS-31 co-tratado com glucose têm coloração de citocromo c e coloração mitocondrial sobrepostas, indicando que a co-localização do citocromo c e da mitocôndria (Fig. 4). Após tratamento com 30 mmol/L de glucose durante 24 h ou 48 h, foi observado algum citocromo c no citoplasma das HRECs, indicando que a glucose induz a libertação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma nas células HREC, mas o SS-31 pode diminuir essa translocação entre a mitocôndria e o citoplasma.

A prevenção da libertação de citocromo c da mitocôndria resultou na redução da atividade da caspase-3. Como mostrado na Fig. 5, o SS-31 diminuiu a expressão da proteína caspase-3 nas HRECs tratadas com glucose elevada. O nível de expressão da proteína caspase-3 clivada foi medido por Western blot (Fig. 5A). Quando as HRECs foram expostas a 30 mM de glucose durante 24 h e 48 h, o nível de expressão de caspase-3 aumentou drasticamente. Ao mesmo tempo, o grupo co-tratado com SS-31, apresentou uma marcada diminuição no nível da proteína caspase-3 (\* $p < 0,05$ ). A Fig. 5B mostra uma análise quantitativa do nível de expressão de caspase-3 nas HRECs co-tratadas com SS-31 durante 24 e 48h.

O SS-31 aumentou a expressão de Trx2 nas HRECs tratadas com glucose elevada. A Fig. 5C mostra os níveis de mRNA de Trx2 nas HRECs expostas a 30 mM de glucose co-tratadas com SS-31 durante 24 h e 48 h. O nível de expressão de mRNA de Trx2 foi medido por PCR quantitativo em tempo real. Os níveis de mRNA relativos de Trx2 foram normalizados por níveis de mRNA 18S (\*  $p < 0,05$  vs. o grupo de meio de glucose normal e



o grupo tratado com glucose elevada de 30 mM). Três amostras independentes foram usadas para cada ponto de tempo. A Fig. 5D mostra o nível de expressão da proteína Trx2 conforme medido por Western blot. A expressão de proteína de Trx2 no grupo com SS-31 co-tratado com glucose elevada aumentou significativamente em comparação com o grupo de glucose normal (\* $p < 0,05$ ). A Fig. 5E mostra a análise quantitativa do nível de proteína de Trx2 nas HRECs 24 e 48 h após glucose elevada sem ou com co-tratamento com SS-31.

Estes resultados indicam que SS-31 pode promover a sobrevivência das células HREC num ambiente de glucose elevada. Como tal, SS-31 e outros péptidos aromático-catiónicos podem ser úteis nos métodos de prevenção da retinopatia diabética.

#### Exemplo de referência 2 - Prevenção da Retinopatia Diabética em Ratos Alimentados com Dieta de Gordura Elevada

Os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção na prevenção do desenvolvimento da retinopatia diabética foram investigados num modelo de ratazana Sprague-Dawley. O exemplo descreve os resultados dessas experiências.

Um modelo de ratazana de diabetes foi estabelecido pela combinação de injeção de HFD e dose baixa de STZ (30 mg/kg) por 6 semanas ou uma única dose alta de STZ (65 mg/kg) em ratazanas SD. *Ver geralmente*, K. Srinivasan, B. Viswanad, Lydia Asrat, CL. Kaul e P. Ramarao, Combination of high-fat diet- fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening, *Pharmacological Research*, 52(4): 313-320, 2005. As ratazanas do mesmo lote de alimentação com ração normal

(NRC) foram usadas como controle. As Tabelas 7-10 mostram o plano terapêutico e protocolo experimental.

**TABELA 7. Grupos de Tratamento - Modelo HFD/STZ**

Grupo	Número de Ratos	Modelo	Tratamento	Dosagem e Via
A	12	HFD/STZ	SS-31	10 mg/kg s.c
B	12	HFD/STZ	SS-31	3 mg/kg s.c
C	12	HFD/STZ	SS-31	1 mg/kg s.c
D	10	HFD/STZ	SS-20	10 mg/kg s.c
E	10	HFD/STZ	SS-20	3 mg/kg s.c
F	10	HFD/STZ	Soro fisiológico	Vol igual s.c.
G	10	NRC	Soro fisiológico	Vol igual s.c.

**TABELA 8. Plano Terapêutico - Modelo HFD/STZ**

Duração	Objetivo	Grupo Diabético (A,B,C,D,E,F)	Grupo Controle (G)
1ª Semana	Aclimatização	Ração de ratazana normal	
2ª-7ª Semana	Manipulação da Dieta	Dieta Rica em Gordura	Dieta de Gordura Média
Fim da 7ª Semana	Injeção de STZ	30 mg/kg de STZ i.p. uma vez	Tampão citrato
8ª a 27ª Semana	Indução da Diabetes	Dieta rica em gordura até à 21ª semana, depois mudou para ração de ratazana normal	Ração normal de rato
28ª a 37ª Semana	Tratamento Peptídico	Tratamento Peptídico (ver Tabela 7)	Grupo G: 2 mL/kg, s.c.
38ª Semana	Recolha de amostras urina e de sangue às 24h, e recolha de órgãos vitais		

**TABELA 9. Grupos de Tratamento - Modelo STZ**

Grupo	Número de Ratos	Modelo	Tratamento	Dosagem e Via
A	11	Diabetes	SS-31	10 mg/kg s.c
B	11	Diabetes	SS-20	10 mg/kg s.c
C	10	Diabetes	Soro fisiológico	Vol igual s.c.
D	10	Normal	Soro fisiológico	Vol igual s.c.

**TABELA 10. Plano Terapêutico - Modelo STZ**

Duração	Objetivo	Grupos Diabéticos (A,B,C)	Grupo Controlo (D)
1 <sup>a</sup> - 3 <sup>a</sup> Semana	Aclimatização	Ração de ratazana normal	
Fim da 3 <sup>a</sup> Semana	Injeção de STZ	30 mg/kg de STZ, i.p., uma vez	Tampão citrato
4 <sup>a</sup> - 18 <sup>a</sup> Semana	Indução das Complicações Diabéticas	Ração de Rato Normal	
19 <sup>a</sup> -28 <sup>a</sup> Semana	Tratamento Peptídico	Tratamento peptídico (ver Tabela 9)	Grupo D: 2 mL/kg, s.c.
29 <sup>a</sup> Semana	Recolha de amostras de urina e de sangue às 24 h, e recolha de órgãos vitais		

De acordo com o protocolo experimental agora descrito, foram demonstrados os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos no tratamento de doenças associadas à diabetes num modelo de ratazana SD. A administração de SS-20 e SS-31 resultou na prevenção ou reversão da formação de catarata nas lentes das ratazanas diabéticas (Figs. 6 e 7, Tabelas 11 e 12).

**TABELA 11. Modelo de ratazana HFD/STZ**

Grupo	Grau de Turbidez					Percentagem de opacidade (%)	Percentagem de opacidade grave (%)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	4	0	0	0	0	0	0
HFD/STZ	1	0	2	3	0	83,3	0
SS-20 3mg	1	1	1	0	1	75,0	25,0
SS-20 10mg	1	2	1	0	0	75,0	0
SS-31 1mg	1	1	1	0	0	67,7	0
SS-31 3mg	3	1	0	0	1	20,0	20,0
SS-31 10mg	6	1	0	0	0	14,3	0

-; transparente;

+: ligeiramente opaco;

++: opaco;

+++ : moderadamente opaco;

++++: fortemente opaco

**TABELA 12. Modelo de ratazana STZ**

Grupo	Grau de Opacidade					Percentagem de Opacidade (&)	Percentagem de Opacidade Grave (&)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	6	0	0	0	0	0	0
STZ	1	0	0	1	3	80,0	60,0
SS20 10mg	2	0	2	0	1	60,0	20,0
SS31 10mg	2	2	0	0	1	60,0	20,0

O efeito dos péptidos catiónico-aromáticos no epitélio da lente no modelo de ratazana SD foi investigado. A administração de SS-31 reduziu as alterações celulares epiteliais no modelo de ratazana STZ (Fig. 8) e no modelo de ratazana HFD/STZ (Fig. 9).

O efeito dos péptidos aromático-catiónicos na função da barreira interna hematorretiniana no modelo de ratazana SD foi investigado. A administração de SS-20 e SS-31 resultou em função melhorada da barreira hematorretiniana interna comparativamente às ratas em HFD não administrado com SS-20 ou SS-31 (Fig. 10).

O efeito dos péptidos aromático-catiónicos nos microvasos retinianos no modelo de ratas SD foi investigado (Figs. 11-12). A administração de SS-31 reduziu as alterações microvasculares retinianas observadas em ratas STZ ou HFD/STZ.

O efeito dos péptidos aromático-catiónicos na distribuição da proteína claudina-5 de junção estreita em microvasos da retina no modelo de ratazana SD foi investigado. A distribuição da proteína claudina-5 de junção estreita foi detetada sob um microscópio confocal (Fig. 13). A claudina-

5 foi distribuída ao longo os vasos retinianos de forma regular, linear, e uniforme em ratas normais (A), mas a forma linear foi quebrada em ratas STZ (B, seta). A distribuição de claudina-5 nos vasos retinianos em ratas STZ tratadas com SS-20 (10 mg/kg) ou SS-31 (10 mg/kg) foi semelhante à das ratas normais (Painéis C e D, respetivamente).

Em resumo, estes resultados estabelecem coletivamente que os péptidos aromático-catiónicos, previnem ou compensam os efeitos negativos da diabetes no olho, por exemplo, cataratas e microvasculatura. Como tal, a administração dos péptidos aromático-catiónicos da presente invenção é útil em métodos de prevenção e tratamento de condições oftálmicas associadas à diabetes em indivíduos humanos.

### **Exemplo de referência 3 - O SS-31 previne o estresse oxidativo nas células glaucomatosas da rede trabecular.**

Os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção na prevenção e tratamento de glaucoma foram investigados através do estudo dos efeitos dos péptidos em células glaucomatosas da rede trabecular. O glaucoma é a segunda causa principal de cegueira irreversível em todo o mundo. O glaucoma primário de ângulo aberto (POAG) é o principal subtipo de glaucoma. Em POAG, não existe qualquer alteração visível da rede trabecular. Porém, acredita-se que a capacidade das células na rede trabecular para realizar a sua função normal é prejudicada.

Neste Exemplo, compararam-se os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção entre as células da rede trabecular de doentes de POAG (GTM) e as células da rede trabecular de indivíduos não-doentes (HTM). Foram descritos

métodos úteis para os estudos da presente invenção. Ver geralmente, He Y, Ge J, Tombran-Tink J., Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, 49(11):4912-22; He Y, Leung KW, Zhang YH, Duan S, Zhong XF, Jiang RZ, Peng Z, Tombran-Tink J, Ge J. Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008, 49(4): 1447-58. As células GTM mostram danos significativos no potencial da membrana mitocondrial em comparação com as células HTM (Fig. 18).

As células foram divididas em três grupos: as células do "Grupo A" foram expostas a peróxido de hidrogénio antes da administração de SS-31. As células do "Grupo B" foram expostas a SS-31 antes da administração do peróxido de hidrogénio. As células do "Grupo C" foram administradas com SS-31 e peróxido de hidrogénio simultaneamente.

Para avaliar se o SS-31 tinha efeitos citotóxicos das células HTM ou GTM, várias concentrações de SS-31 foram administradas às células e a citotoxicidade foi medida usando um ensaio de LDH. Um ensaio de citotoxicidade de LDH é um método colorimétrico de avaliação da citotoxicidade celular. O ensaio mede quantitativamente a enzima lactato desidrogenase (LDH) estável citosólica, que é libertada por células lesadas. A LDH libertada é medida com uma reação enzimática acoplada que resulta na conversão de um sal tetrazólio (iodonitrotetrazólio (INT)) numa cor vermelha formazan por diaforase. São conhecidos métodos úteis para detetar LDH das células nos estudos da presente invenção. Ver geralmente, Haslam, G. et al. (2005) *Anal. Biochem.* 336: 187; Tarnawski, A. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*

333: 207; Round, J. L et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201 : 419; Bose, C. et al. (2005) *Am. J. Physiol. Gastr.* L. 289: G926; Chen, A. e Xu, J. (2005) *Am. J. Physiol. Gastr.* L. 288: G447. A atividade da LDH é determinada como oxidação NADH ou redução de INT ao longo de um período de tempo definido. Os resultados são mostrados na Fig. 14 e indicam que o SS-31 não afeta a viabilidade das células HTM e GTM.

Os métodos úteis para medir o potencial de membrana mitocondrial usando TMRM nos estudos da presente invenção foram descritos por Andrea Rasola e Massimo Geuna, A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters, *Cytometry* 45:151-157, 2001; Mitoprobe™ JC-1 Kit para Citometria de Fluxo, Sondas Moleculares, Invitrogen, EUA. A Fig. 16 mostra os resultados em células GTM. Coletivamente, estes resultados estabelecem que o tratamento com SS-31 melhora o potencial de membrana mitocondrial das células que foram expostas ao peróxido de hidrogénio antes da administração de SS-31.

*Grupo A.* O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células HTM e GTM foi investigado quando aquelas células foram expostas ao peróxido de hidrogénio antes da administração de SS-31. Primeiro, o potencial de membrana mitocondrial foi medido usando microscopia confocal das células marcadas com éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM, 500 nM x 30 min) (Fig. 15). O potencial de membrana mitocondrial foi também medido usando citometria de fluxo (Figs. 16-17) por marcação das células com a sonda seletiva para mitocôndria de éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM, 500 nM x 30 min).

*Grupo B.* A morfologia das células GTM foi investigada quando aquelas células foram expostas a SS-31 antes da

administração de peróxido de hidrogénio. A Fig. 18 mostra os resultados microscopia de contraste de fase invertida de células a que foram administradas várias concentrações de SS-31. Os resultados indicam que o SS-31 protege as células das alterações morfológicas mediadas por peróxido de hidrogénio num modo dependente do tempo e dependente da concentração. Ou seja, perda de células e o arredondamento das células mediados por peróxido de hidrogénio diminuiu nas células expostas ao péptido SS-31. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células HTM e GTM foi também investigado quando aquelas células foram expostas a SS-31 antes da administração de peróxido de hidrogénio. O potencial de membrana mitocondrial foi medido usando microscopia confocal das células marcadas com éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM, 500 nM x 30 min) (Fig. 19-21). Estes resultados mostram que o pré-tratamento com SS-31 melhora o potencial de membrana mitocondrial dependente da dose das células que foram expostas ao peróxido de hidrogénio. Como tal, o SS-31 fornece um efeito protetor contra o stresse oxidativo em células GTM.

Os efeitos de SS-31 na mitigação das lesões oxidativas agudas em células GTM e HTM foram investigados. A Fig. 36 mostra a intensidade de fluorescência de TMRM das células GTM e HTM usando análise de FACS. A percentagem da intensidade de fluorescência em comparação com GTM de controlo em  $H_2O_2$ , SS-31  $10^{-6}$  M, SS-31  $10^{-7}$  M, SS-31  $10^{-8}$  M foram  $35,2 \pm 2,12\%$ ,  $56,2 \pm 4,04\%$ ,  $50,3 \pm 4,46\%$ ,  $47,5 \pm 2,82\%$  respetivamente,  $n=4$ ; os grupos HTM foram  $37,4 \pm 0,725\%$ ,  $57,7 \pm 1,80\%$ ,  $50,6 \pm 3,06\%$ ,  $49,4 \pm 2,27\%$  respetivamente,  $n=4$ .

\*\* significa  $P < 0,01$  comparado com grupo GTM  $H_2O_2$ ;

\* significa  $P < 0,05$  comparado com o grupo GTM  $H_2O_2$ ; ▲ ▲ ▲

significa  $P < 0,001$  comparado com o grupo HTM  $H_2O_2$ .



A Fig. 37 mostra a intensidade de fluorescência de ROS das células GTM e HTM nos grupos de controlo e tratado com SS-31 usando análise de FACS. A percentagem da produção de ROS intracelular em comparação com o controlo GTM em GTM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os grupos SS-31 10<sup>-6</sup>M, SS-31 10<sup>-7</sup>M, SS-31 10<sup>-8</sup>M foram 146,0±2,27%, 84,5±8,75%, 102,0±5,69%, 133,0±5,17% respetivamente (n=3); os grupos HTM foram 153,0±3,46%, 79±2,39%, 91,8±3,49%, 129,0±8,24% respetivamente (n=4). P<0,001 GTM e grupo HTM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado com o controlo; \*\*\* significa P<0,001 comparado com o grupo GTM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ▲ ▲ ▲ significa P<0,001 comparado com o grupo HTM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ▲ ▲ significa P<0,01 comparado com o grupo HTM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A Fig. 38 mostra que o SS-31 reduz a quantidade de apoptose celular induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os efeitos de SS-31 nas lesões oxidativas sustentadas das células GTM e HTM foram examinados. As células foram pré-tratadas com 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> M de SS-31 durante 1 h, e em seguida, incubadas com 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h para investigar o efeito protetor de SS-31 no estresse oxidativo sustentado. A Fig. 39 e Tabela 13 mostram os efeitos de SS-31 na produção de ROS a partir de lesões oxidativas sustentadas das células GTM e HTM. A Fig. 40 e Tabela 14 mostram a alteração de MMP nas células GTM e HTM em cada grupo de tratamento.

**Tabela 13. Produção de ROS em células GTM3 e iHTM tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Controlo (%)	SS-31		
		1 µ M (%)	0,1 µ M (%)	0,01 µ M (%)
GTM3	376,80±17,47	47,40±1,81***	68,91±8,62***	133,70±3,24***
iHTM	388,50±5,54	36,91±1,47***	82,89±3,70***	114,30±3,89***

**Tabela 14. Declínio de MMP em células GTM3 e iHTM tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Controlo (%)	SS-31		
		1 $\mu$ M (%)	0,1 $\mu$ M (%)	0,01 $\mu$ M (%)
GTM3	-39,67 $\pm$ 2,33	-24,40 $\pm$ 4,81***	-29,33 $\pm$ 2,19***	-31,33 $\pm$ 1,20***
iHTM	-69,53 $\pm$ 2,01	-44,99 $\pm$ 2,19***	-53,24 $\pm$ 2,52**	-58,24 $\pm$ 2,62*

Coletivamente, estes resultados demonstram que o SS-31 não tem citotoxicidade a 10<sup>-4</sup> M para ambas as células GTM e HTM e que o estresse oxidativo agudo e sustentado induzido por peróxido de hidrogénio pode ser prevenido por SS-31 (>10<sup>-9</sup> M). Como tal, os péptidos aromático-catiónicos da presente invenção são úteis em métodos de prevenção e tratamento de glaucoma em indivíduos humanos.

**Exemplo de referência 4 - SS-31 previne o estresse oxidativo em células epiteliais primárias do pigmento retiniano.**

Células epiteliais do pigmento retiniano (RPE) primárias foram cultivadas para testar os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção na prevenção ou redução das lesões oxidativas nestas células. Foram descritos métodos úteis para o estudo das células epiteliais do pigmento retiniano primárias. Ver, Dunn *et al.*, ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties, *Experimental Eye Research*, 1996, 62(2): 155-170. Primeiro, foi mostrado que o SS-31 não afetou negativamente estas células. Células RPE humanas primárias cultivadas foram incubadas com diferentes concentrações de SS-31 sozinhas por um período de 24 h, e a viabilidade das células foram determinadas por um ensaio de MTT (Fig. 22).

Em seguida, a viabilidade das células RPE primárias foi testada na presença de tBHP e várias concentrações de SS-31. As células foram colocadas em placas a 10.000 células por poço numa placa de 96 poços e cultivadas durante 24 h, e mantidas sem alimentação durante 24 h. Depois disso, as células foram expostas a concentrações crescentes de tBHP (Fig. 23A), ou pré-incubadas durante 4 h com diferentes concentrações de SS-31, depois estimuladas com tBHP durante 6 h (Fig. 23B). Estes resultados indicam que o SS-31 melhorou a viabilidade celular em resposta à administração de tBHP. A produção de ROS intracelular em três grupos de células RPE foi também examinada usando análise de FACS. A Fig. 31A mostra a produção de ROS em células RPE de controlo; A Fig. 31B mostra a produção de ROS em células RPE tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h; e a Fig. 31C mostra a produção de ROS em células RPE tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 3 h e 1  $\mu\text{M}$  SS-31. A Fig. 32 mostra MMP marcado com JC-1 numa análise de FACS. Foram analisadas três concentrações diferentes dos grupos SS-31. A proporção de vermelho para verde em 500  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo das 3 h é 1,08, a proporção de vermelho para verde em 10 nM de SS-31 durante 4 h + 500  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo das 3 h é 1,25; a proporção de vermelho para verde em 100 nM de SS-31 para o grupo das 4h + 500  $\mu\text{M}$  de tBHP do grupo das 3 h é 1,4; e a proporção de vermelho para verde em 1  $\mu\text{M}$  de SS-31 durante 4 h + 500  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo das 3 h é 2,28. A Fig. 33 mostra o efeito de 1  $\mu\text{M}$  de SS-31 no declínio de MMP induzido por tBHP. Fig. 33A: Grupo controlo, R/G é  $3,63 \pm 0,24$ ; Fig. 33B: 500  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo das 3 h, R/G é  $1,08 \pm 0,11$ ; A Fig. 33C: 1  $\mu\text{M}$  de SS-31 durante 4 h + 500  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo das 3 h, R/G é  $2,38 \pm 0,18$ . A Fig. 33D é um gráfico que compara a taxa de fluorescência para os diferentes grupos. \* $P < 0,01$ , C vs. B.

A Fig. 34 mostra o efeito de SS-31 na apoptose celular induzida por 250  $\mu\text{M}$  de tBHP durante 24 h. Fig. 34A: grupo controlo;  $(Q2+Q4)\% = 1,27 \pm 0,3\%$ ; Fig. 34B: 250  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo de 24 h;  $(Q2+Q4)\% = 15,7 \pm 0,6\%$ ; Fig. 34C: 1  $\mu\text{M}$  SS-31 durante 4 h + 250  $\mu\text{M}$  de tBHP para o grupo de 24 h;  $(Q2+Q4)\% = 8,4 \pm 0,8\%$ . A Fig. 34D é um gráfico que compara a taxa de fluorescência dos diferentes grupos.  $*P < 0,05$  C vs. B. A Fig. 35 é um gráfico que mostra o nível de MDA induzido por tBHP em 3 grupos de células RPE. ( $*P < 0,05$ ).

Coletivamente, estes resultados demonstram que SS-31 previne o estresse oxidativo em células epiteliais do pigmento retiniano primárias. Como tal, os péptidos aromático-catiónicos da presente invenção são úteis em métodos de prevenção e tratamento de lesões das células retinianas em indivíduos humanos.

#### **Exemplo 5 - Prevenção e Tratamento de Neovascularização Coroideia por Péptidos Aromático-Catiónicos da Invenção num Modelo de Rato CNV**

Para demonstrar ainda mais a prevenção da neovascularização corioideia (CNV) por um lado, e o tratamento de CNV por outro, os péptidos aromático-catiónicos da invenção foram testados num modelo de rato de CNV (Fig. 24). CNV foram induzidas no olho com queimaduras por laser. Métodos úteis nos presentes estudos foram descritos por Reich, *Mol Vis* 2003; 9:210-216.

Em resumo, ratinhos machos C57BL/6 com cinco a seis semanas foram anestesiados com hidrato de cloral e as pupilas foram dilatadas com tropicamida. Com uma lamela usada como uma lente de contacto, quatro pontos de laser (532 nm, 260 mw, 0,01s, 50  $\mu\text{M}$ ; Novus Spectra, Lumenis, EUA)

foram aplicados ao fundo num círculo em torno do disco ótico no olho direito. Injeções intraperitoneais diárias de 1 mg/kg, 9 mg/kg de SS-31 ou veículo foram iniciadas no dia anterior à fotocoagulação a laser.

Após uma semana, os ratinhos foram profundamente anestesiados e perfundidos através do ventrículo esquerdo com 1 mL (50 mg/mL) de fluoresceína-dextrano tamponado com PBS. Os olhos foram enucleados e fixados em 4% de paraformaldeído durante 2 h. Os olhos foram seccionadas no equador, e a metade anterior e a retina foram removidas. O segmento posterior do segmento do olho contendo a esclerótica e o coróide foi dissecado em quartos com quatro a cinco cortes radiais e montados numa lâmina. Todas as montagens planas foram examinadas através de um microscópio de fluorescência (AxioCam MRQCarl Zeiss). O software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) foi usado para medir a área de cada lesão de CNV.

Existiam 48 localizações de neovascularização em cada grupo. A área da neovascularização foi calculada usando software IMAGE-PROPLUS6.0. A área de neovascularização no modelo de CNV, os grupos de 1 mg/kg de SS-31 e 9 mg/kg de SS-31 foram  $0,0130 \pm 0,0034$ ,  $0,0068 \pm 0,0025$ ,  $0,0067 \pm 0$ , respetivamente. Estes resultados indicam que as duas concentrações de SS-31 reduzem significativamente a área de neovascularização coróideia ( $P < 0,05$ ) (Fig. 24).

#### **Exemplo 6 - Prevenção e Tratamento de Retinopatia induzida por oxigénio (OIR) com Péptidos Aromático-Catiónicos da Invenção num Modelo de Rato OIR**

Para demonstrar ainda mais a prevenção da retinopatia induzida por oxigénio (OIR), os péptidos aromático-

catiónicos da invenção foram testados num modelo de rato de OIR (Fig. 25). Neste modelo, crias de ratinho com 7 dias com vasculatura retiniana parcialmente desenvolvida foram sujeitos a hiperóxia (75% de oxigénio) durante 5 dias, que pára o crescimento de vasos retinianos e causa vaso-obliteração significativa. Aos 12 dias após o nascimento, as crias regressaram ao ar ambiente, e aos 17 dias após o nascimento, ocorreu a neovascularização retiniana compensatória corada. Este modelo de neovascularização patológica tem sido largamente usado como um substituto para a retinopatia diabética proliferativa (DR).

Para examinar os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção na prevenção de OIR, a OIR foi induzida em crias de ratinho e os ratinhos foram simultaneamente administrados com um péptido aromático-catiónico (por exemplo, SS-20 ou SS-31) durante aproximadamente 6 semanas. Os resultados são mostrados na Fig. 26 e indicam que o tratamento com SS-31 previne a neovascularização retiniana compensatória. Como tal, os péptidos aromático-catiónicos da invenção são úteis em métodos para prevenir a retinopatia diabética proliferativa em indivíduos mamíferos.

**Exemplo 7 - Antioxidantes reduzem a morte das células fotorrecetoras num modelo de retinite pigmentosa.**

A linha específica de células de cones 661W derivou de um tumor da retina de rato. Métodos úteis nos presentes estudos das células 66 IW foram descritos previamente. *Ver geralmente, Gearóid Tuohy, Sophia Millington-Ward, Paul F. Kenna, Peter Humphries e G. Jane Farrar, Sensitivity of Photoreceptor-Derived Cell Line (661W) to Baculoviral p35, Z-VAD.FMK, and Fas-Associated Death Domain, Investigative*

*Ophthalmology and Visual Science*. 2002;43:3583-3589. Estas células foram cultivadas para testar os efeitos dos péptidos aromático-catiónicos da invenção na prevenção ou redução das lesões oxidativas nas células dos cones (Fig. 27). Primeiro, foi mostrado que tBHP afetou a sobrevivência das células 661W (Fig. 27A). Administraram-se diferentes doses de tBHP às células durante 3 h. A seguir, foi mostrado que diferentes doses de SS-31 reduziram morte celular de 661 W induzida por tBHP (Fig. 27B).

O potencial do SS-31 para proteger contra a perda de viabilidade mitocondrial induzida por tBHP, 100 nmol/L SS-31 foram administrados às culturas de células 661w. Os resultados são mostrados na Fig. 30 e indicam que o SS-31 melhorou significativamente a viabilidade das mitocôndrias em comparação com as células não administradas com SS-31, como mostrado por um ensaio JC-1.

#### **Exemplo de referência 8 - Efeitos de SS-31 num modelo de rato de degeneração da retina.**

Para demonstrar adicionalmente a prevenção da degeneração da retina, os péptidos aromático-catiónicos da invenção foram testados num modelo de rato de degeneração da retina. É induzida CNV no olho com queimaduras a laser, (ver Exemplo 5). Modelos de rato de degeneração da retina foram investigados durante muitos anos na esperança de entender as causas de morte das células fotorrecetoras. Foram encontrados ratos mutantes que ocorrem naturalmente que manifestam degeneração dos fotorrecetores na retina com preservação de todos os outros tipos de células retinianas: degeneração da retina (anteriormente *rd*, idêntica a retina sem bastonetes, *r*, agora *Pde6b rdl*); degeneração das

células de Purkinje (*pcd*); nervosa (*nr*); degeneração lenta da retina (*rds*, agora *Prph Rd2*); degeneração da retina 3 (*rd3*); degeneração do neurónio motor (*mnd*); degeneração da retina 4 (*Rd4*); degeneração da retina 5 (*rd5*); vitiligo (*vit*, agora *Mitfmi-vit*); degeneração da retina 6 (*rd6*); degeneração da retina 7 (*rd7*); lipofuscinose ceróide neuronal (*nclf*); degeneração da retina 8 (*rd8*); degeneração da retina 9 (*Rd9*); degeneração da retina 10 (*rd10*); e perda de função dos fotoprotetores dos cones (*cpfl1*).

A Fig. 28 é uma série de micrografias que mostram a espessura da camada nuclear externa da retina (ONL) num modelo de rato de degeneração da retina em ratos controlo e em ratos tratados com SS-31. Os resultados indicam que os ratos tratados com SS-31 retiveram um maior número de camadas de células ONL em comparação com os ratos não tratados. Montagens planas da retina coradas com aglutinina de amendoim (PNA), que seletivamente cora os segmentos nucleares interiores e exteriores mostram também que a densidade das células dos cones é maior em ratos tratados com SS-31 (Fig. 29). Estes resultados indicam que o tratamento com SS-31 preveniu as lesões compensatórias na camada nuclear externa da retina num modelo de rato de degeneração da retina. Assim, os péptidos aromático-catiónicos da invenção são úteis em métodos para prevenir a degeneração da retina em indivíduos mamíferos.

#### EQUIVALENTES

A presente invenção não é para ser limitada em termos de formas de realização particulares descritas neste pedido, que pretendem ser apenas ilustrações de aspetos individuais da invenção. Muitas modificações e variações desta invenção podem ser feitas sem se afastar do seu âmbito, como é



evidente para os especialistas na técnica. Métodos funcionalmente equivalentes e equipamentos para além dos aqui enumerados, serão evidentes para os especialistas na técnica a partir das descrições precedentes. A presente invenção é para ser limitada apenas pelos termos das reivindicações anexas. Deve ser entendido que esta invenção não está limitada a métodos específicos, reagentes, composições de compostos ou sistemas biológicos, que podem, naturalmente, variar. É também para ser entendido que a terminologia aqui usada é apenas para fins de descrição das formas de realização particulares, e não se destina a ser limitativa.

Adicionalmente, onde as características ou aspetos da divulgação são descritos nos termos dos grupos Markush, aqueles especialistas na técnica reconhecerão que a divulgação é também desse modo descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupos de membros do grupo Markush.

Como será entendido pelos especialistas na técnica, para qualquer e todos os fins, particularmente em termos de fornecer uma descrição escrita, todas as gamas aqui divulgadas englobam também todas e quaisquer subgamas possíveis e combinações das suas subgamas. Qualquer gama listada pode ser facilmente reconhecida como descrendo suficientemente e permitindo que a mesma gama seja dividida em pelo menos metades, terços, quartos, quintos, décimos, etc, iguais. Como um exemplo não limitativo, cada gama aqui discutida pode ser facilmente dividida em terços menores, meios terços e terços maiores, etc. Como será também entendido por um especialistas na técnica toda a linguagem como "até," "pelo menos," "superior a," "inferior a," e semelhantes, inclui o número citado e referem-se a gamas que podem ser subsequentemente divididas em subgamas como

discutido acima. Finalmente, como deverá ser entendido por um especialista na técnica, uma gama inclui cada membro individual. Assim, por exemplo, um grupo com 1-3 células refere-se a grupos com 1, 2, ou 3 células. Do mesmo modo, um grupo tendo 1-5 células refere-se a grupos com 1, 2, 3, 4, ou 5 células, e assim sucessivamente.

Lisboa, 29 de Maio de 2014

### **REIVINDICAÇÕES**

1. Péptido representado pela fórmula D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> ou Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> para uso no tratamento ou prevenção de uma doença oftálmica em que a doença oftálmica é selecionada a partir do grupo que consiste em: retinite pigmentosa, neovascularização coroideia, e retinopatia induzida por oxigénio.
2. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>
3. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>.
4. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é formulado para uso num humano.
5. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é formulado para ser administrado por via intraocular, iontoforética, oral, tópica, sistémica, intravenosa, subcutânea, ou intramuscular.
6. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o péptido é formulado para ser administrado separadamente, sequencialmente, ou simultaneamente com um segundo agente ativo.
7. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 6, em que o segundo agente ativo é selecionado a partir do grupo que consiste em: um antioxidante, um complexo metálico, um fármaco anti-inflamatório, um antibiótico, e um anti-histamínico.

8. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 7, em que o antioxidante é vitamina A, vitamina C, vitamina E, licopeno, selénio, ácido  $\alpha$ -lipoico, coenzima Q, glutatona, ou um carotenoide.
9. O péptido para uso de acordo com a reivindicação 6, em que o segundo agente ativo é selecionado a partir do grupo que consiste em: aceclidina, acetazolamida, anecortave, apraclonidina, atropina, azapentaceno, azelastina, bacitracina, befunolol, betametasona, betaxolol, bimatoprost, brimonidina, brinzolamida, carbacol, carteolol, celecoxib, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, cromoglicato, cromolina, ciclopentolato, ciclosporina, dapiprazole, demecário, dexametasona, diclofenac, diclorfenamida, dipivefrina, dorzolamida, ecotiofato, emedastina, epinastina, epinefrina, eritromicina, etoxzolamida, eucatropina, fludrocortisona, fluorometolona, flurbiprofeno, fomivirseno, framacetina, ganciclovir, gatifloxacina, gentamicina, homatropina, hidro cortisona, idoxuridina, indometacina, isoflurofato, cetorolac, cetotifeno, latanoprost, levobetaxolol, levobunolol, levocabastina, levofloxacina, lodoxamida, loteprednol, medrisona, metazolamida, metipranolol, moxifloxacina, nafazolina, natamicina, nedocromil, neomicina, norfloxacina, ofloxacina, olopatadina, oximetazolina, pemirolast, pegaptanib, fenilefrina, fisostigmina, pilocarpina, pindolol, pirenoxina, polimixina B, prednisolona, proparacaína, ranibizumab, rimexolona, escopolamina, sezolamida, esqualamina, sulfacetamida, suprofen, tetracaína, tetraciclina, tetrahidrozolina, tetrizolina, timolol, tobramicina, travoprost, triamcinulona, trifluormetazolamida, trifluridina, trimetoprim, tropicamida, unoprostona, vidarbina,

xilometazolina, seus sais farmacologicamente aceitáveis, e combinações dos mesmos.

Lisboa, 29 de Maio de 2014

Fig. 1

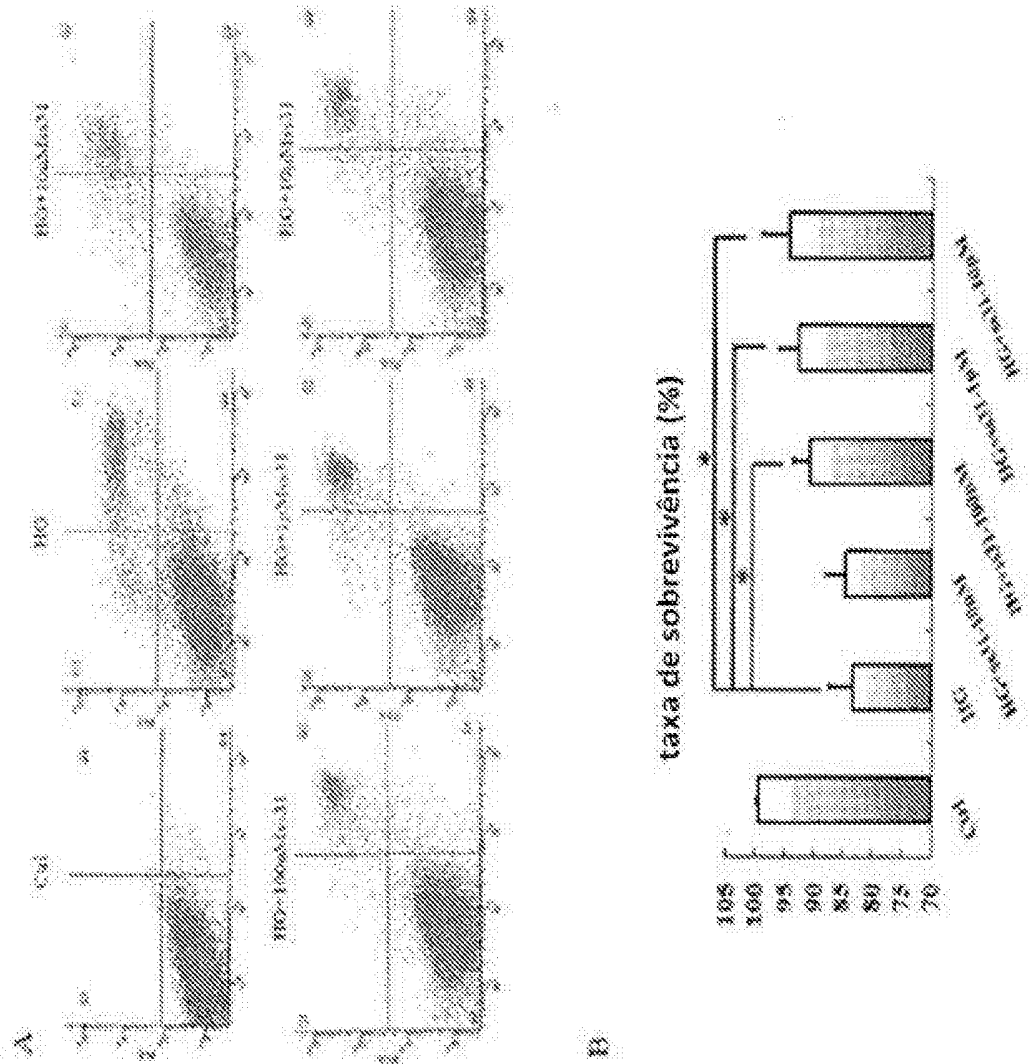


FIG. 2

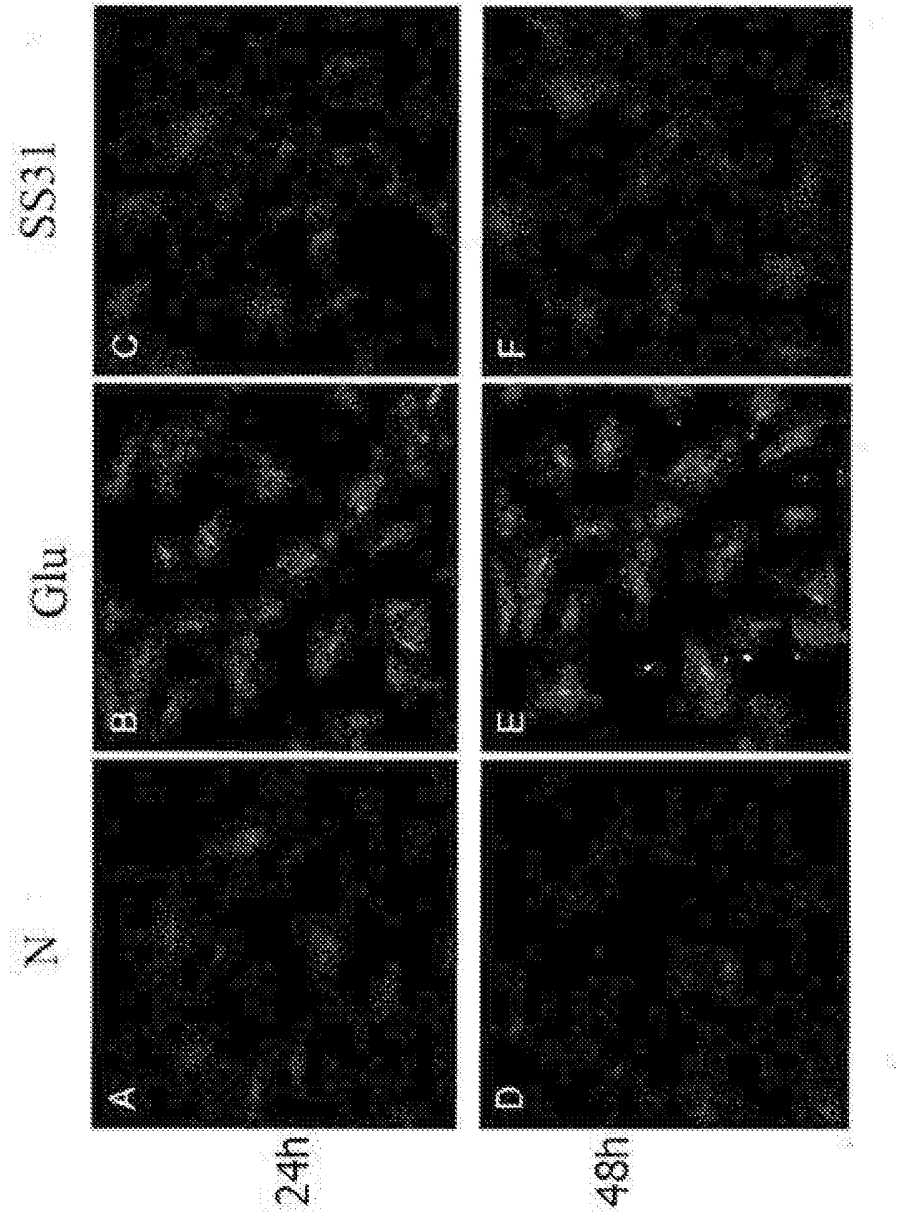


FIG. 3

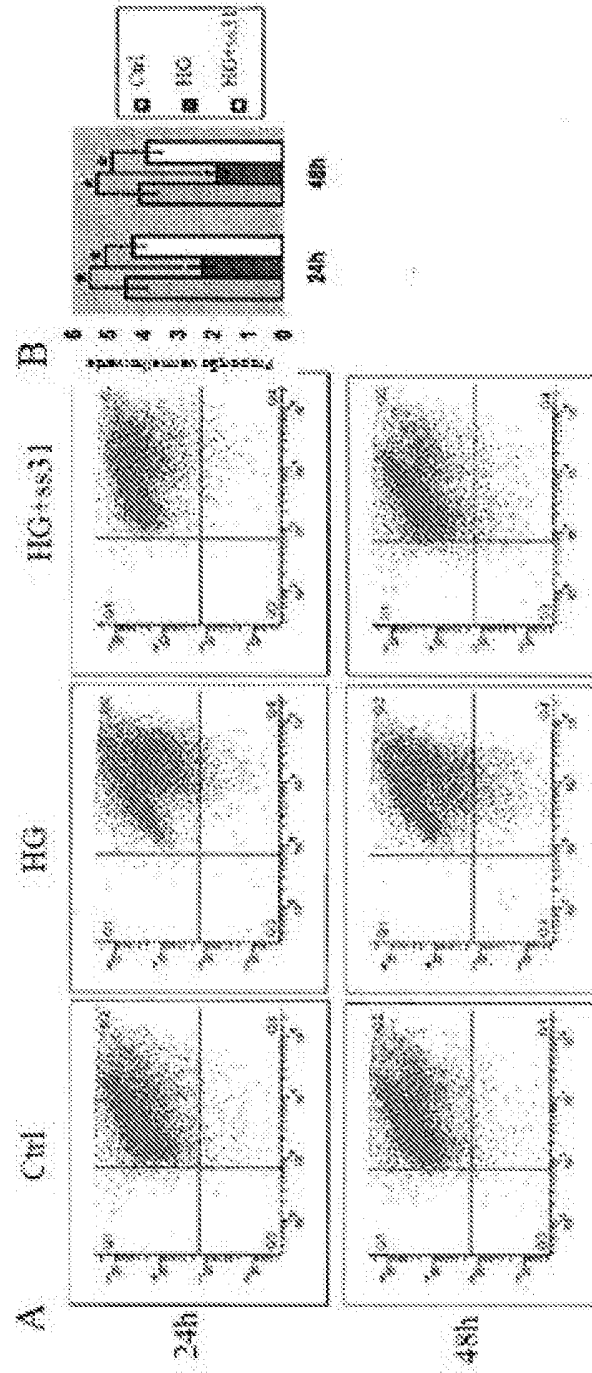




FIG. 4

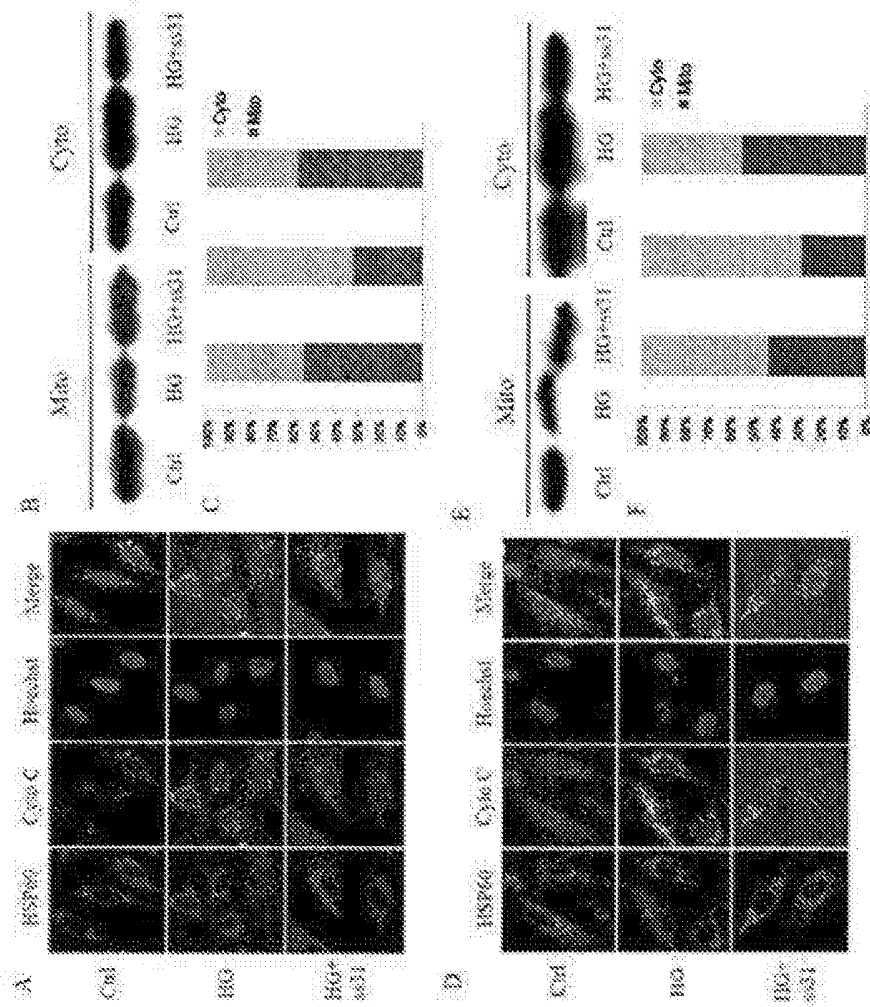


FIG. 5

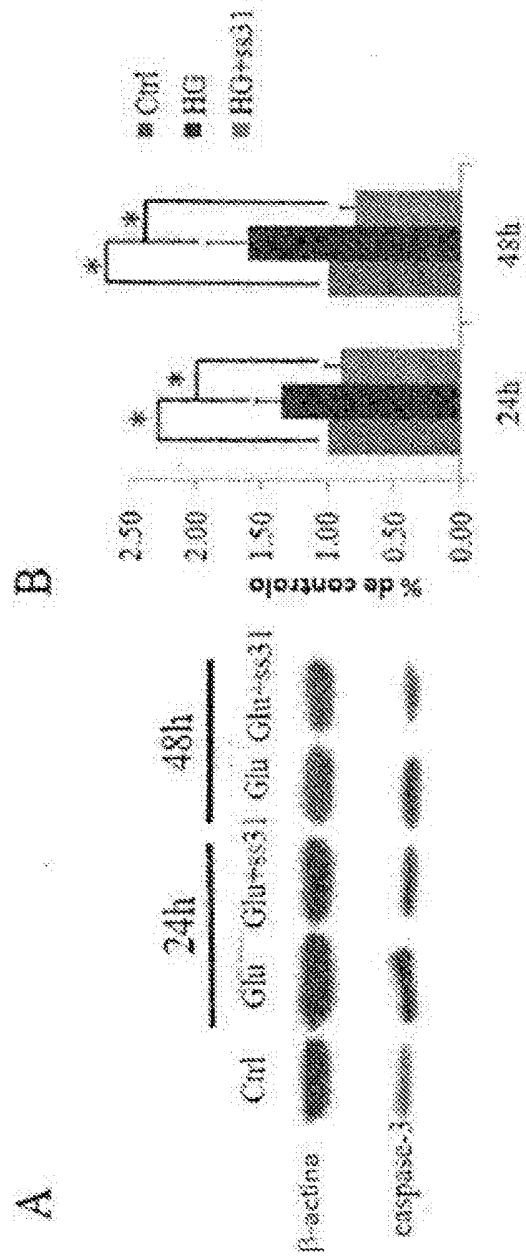


FIG. 5 (CONT.)

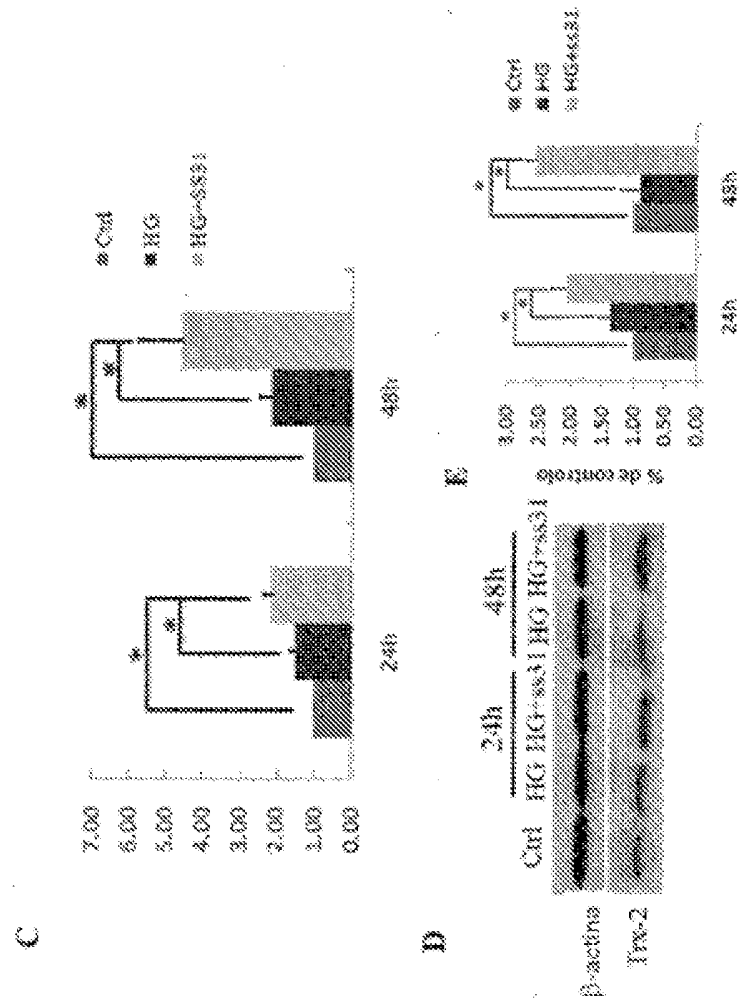


FIG. 6

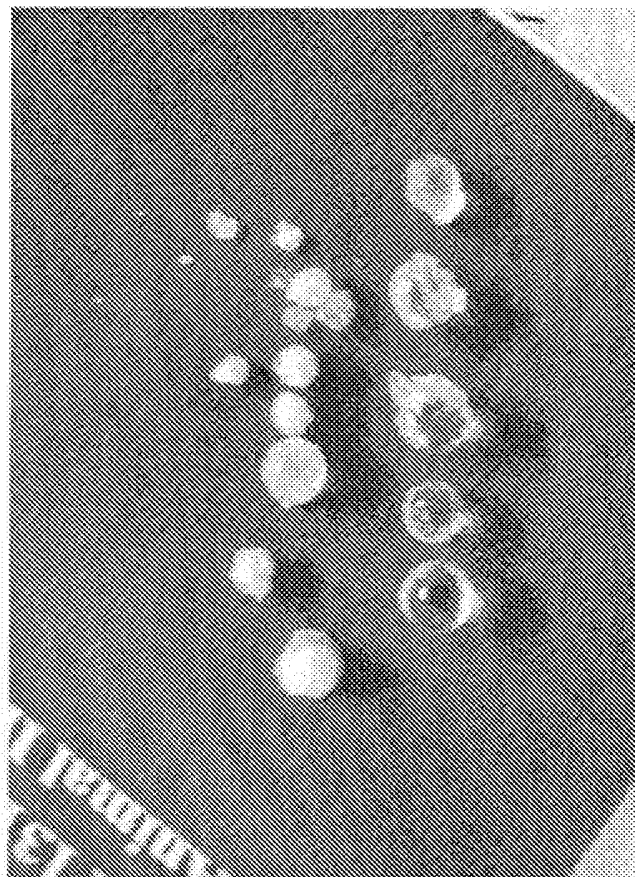


FIG. 7

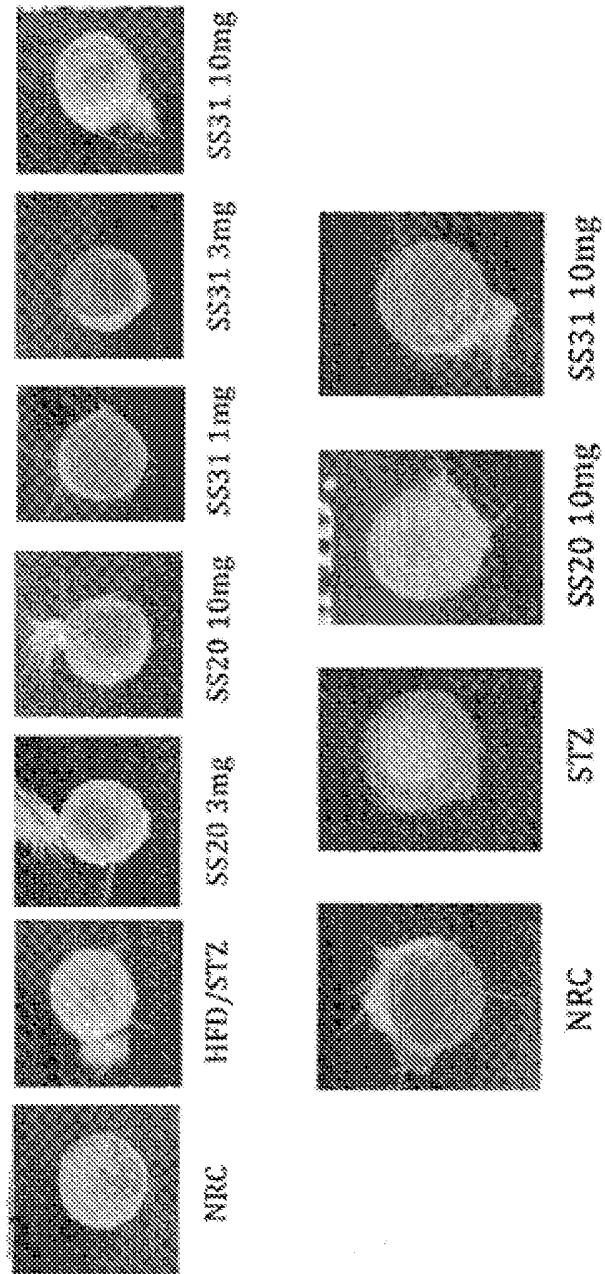
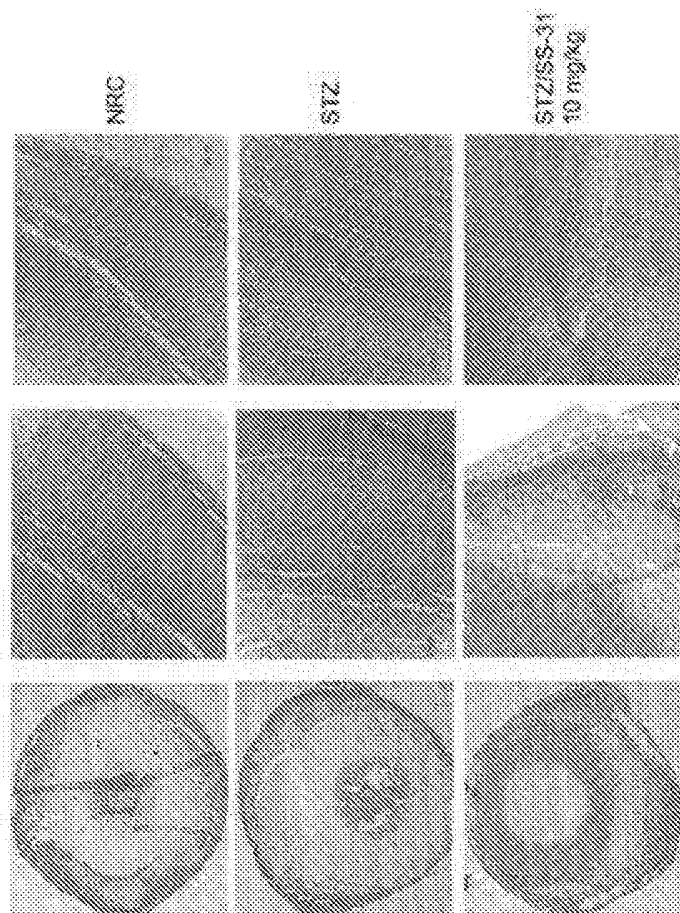


FIG. 8



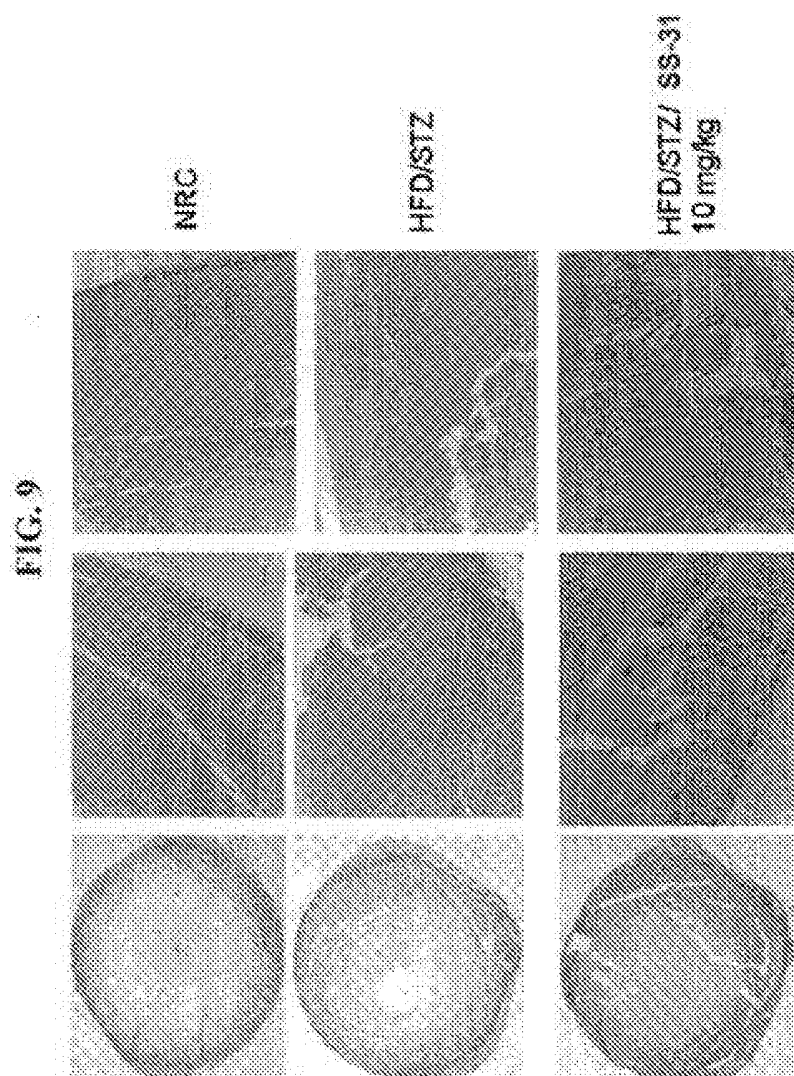
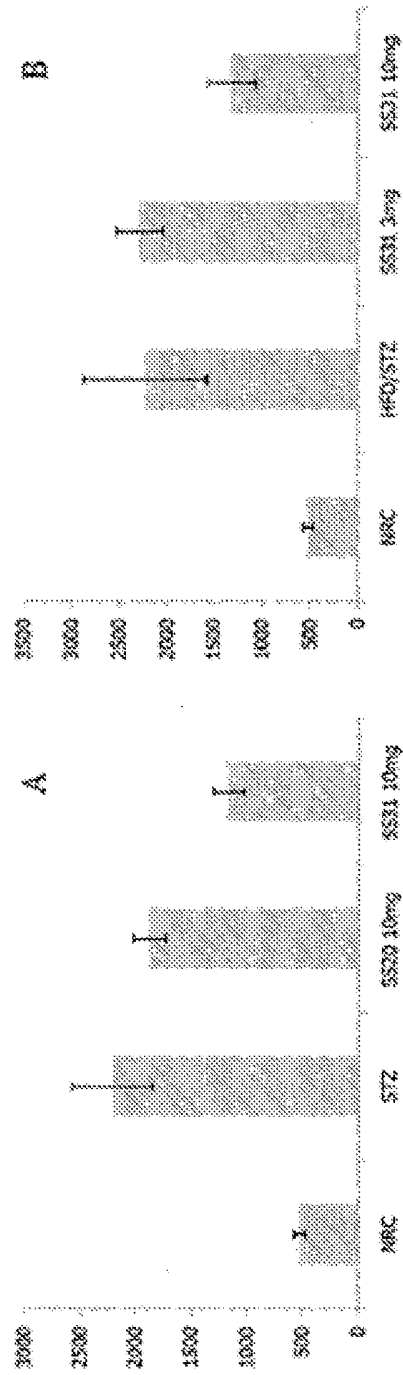


FIG. 10



A: modelo de rato STZ;

B: modelo de rato HFD/STZ



FIG. 11

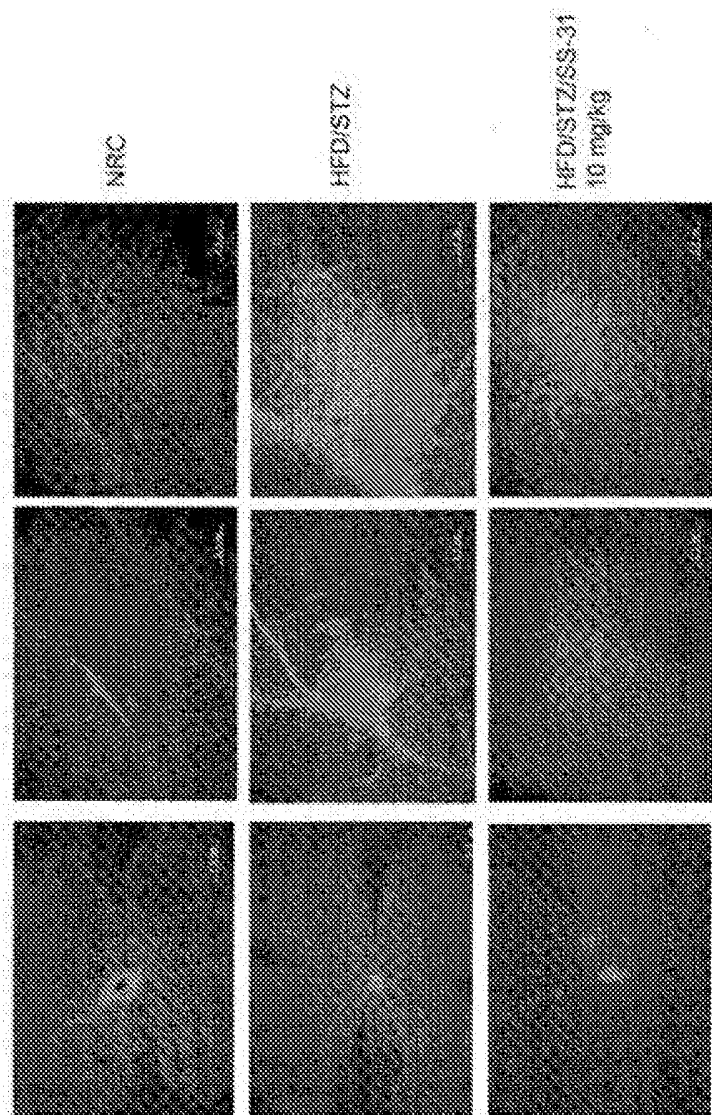


FIG. 12

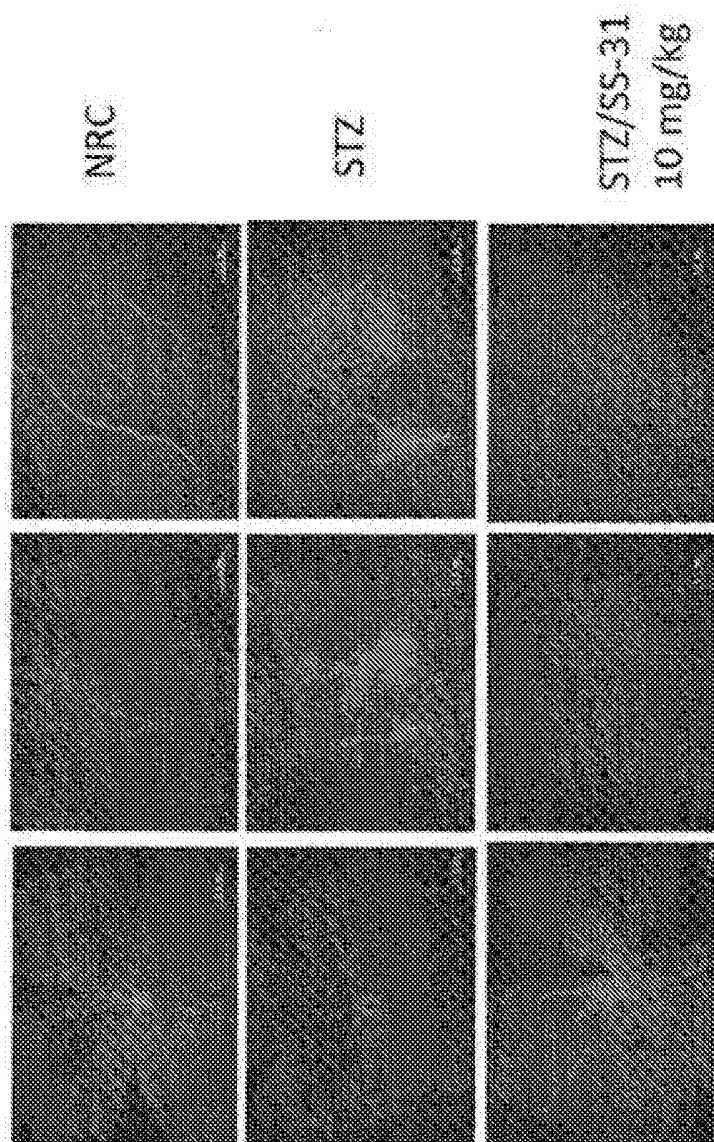


FIG. 13

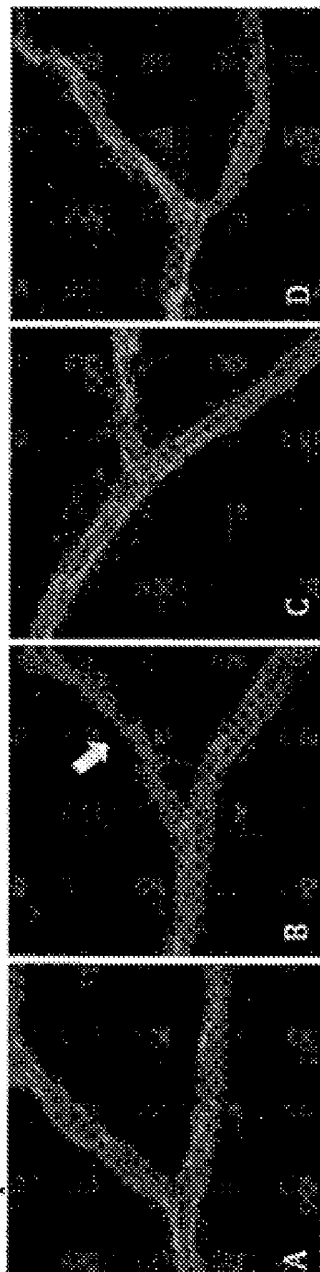


FIG. 14

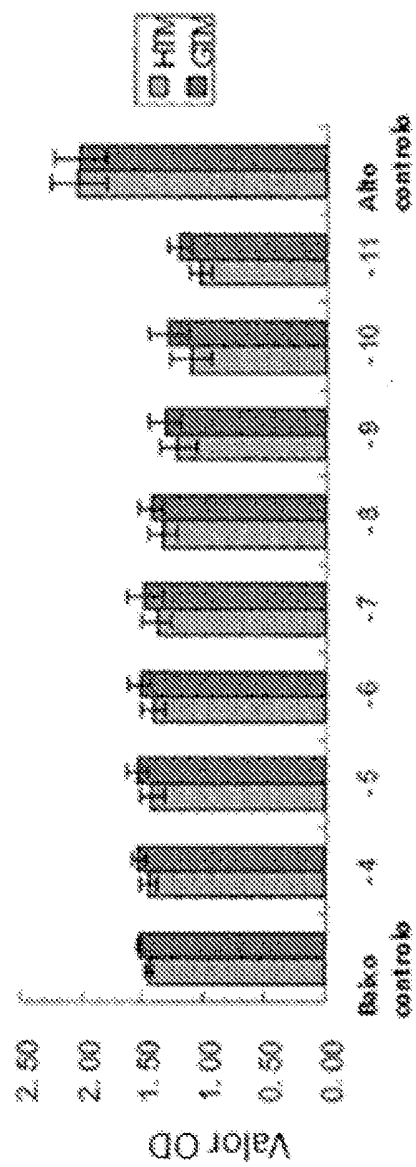
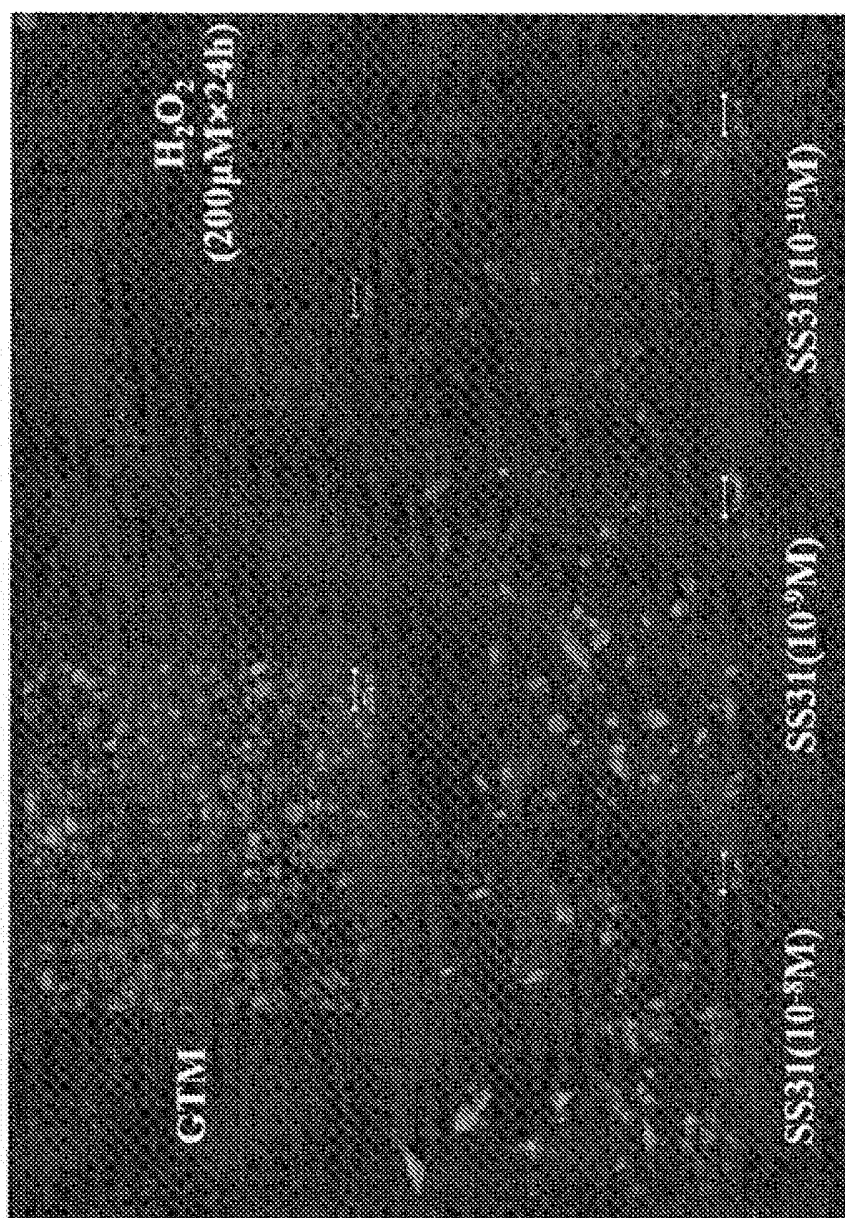


FIG. 15



160

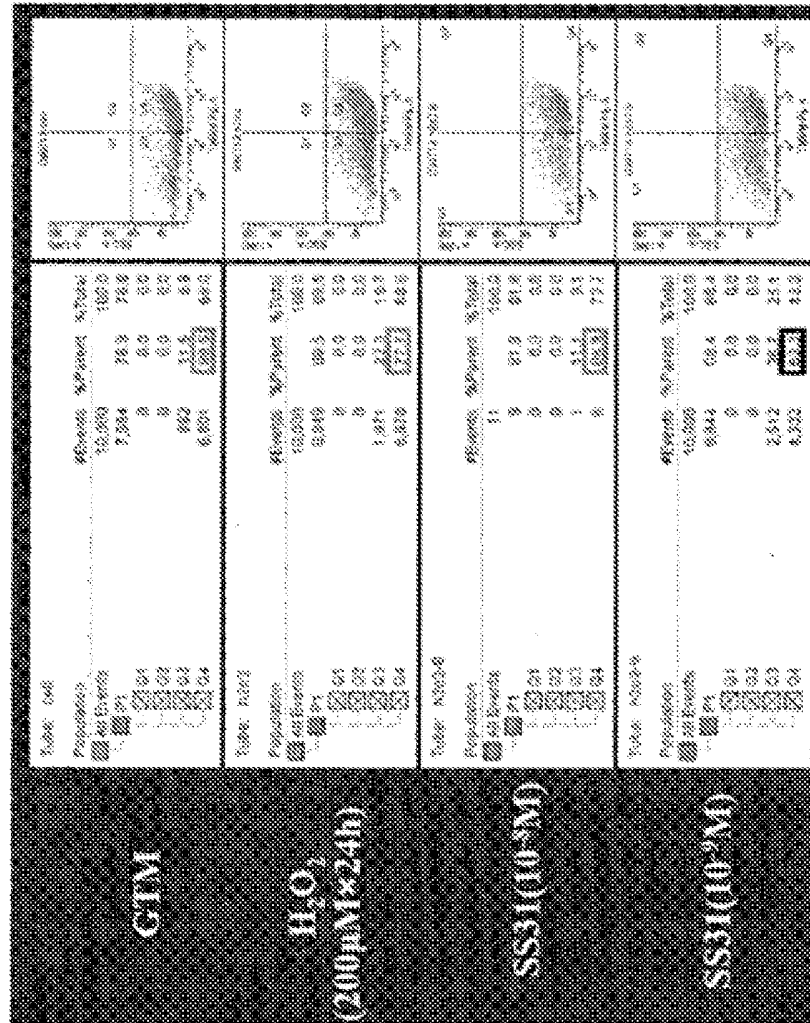


FIG. 17

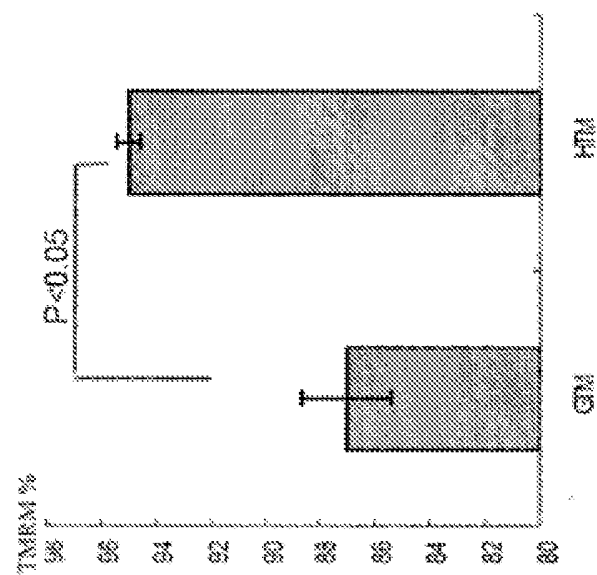


FIG. 18

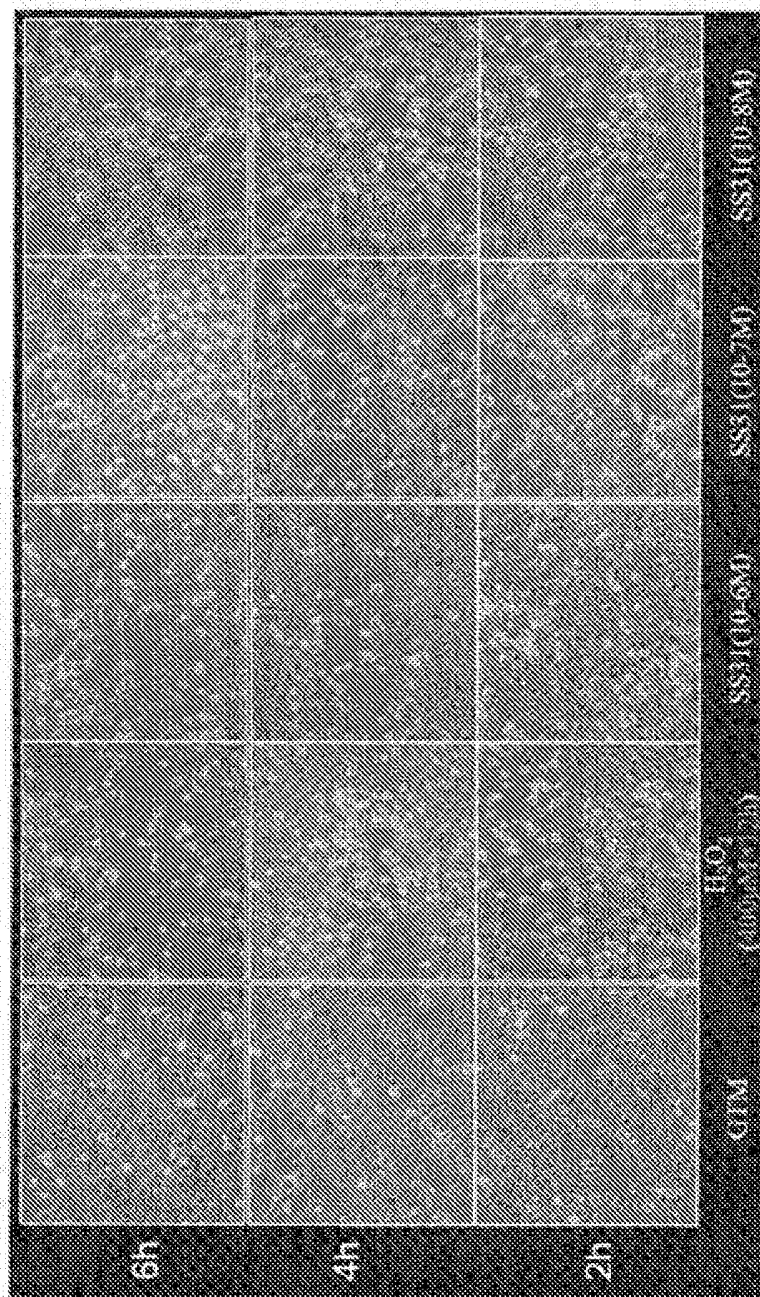




FIG. 19

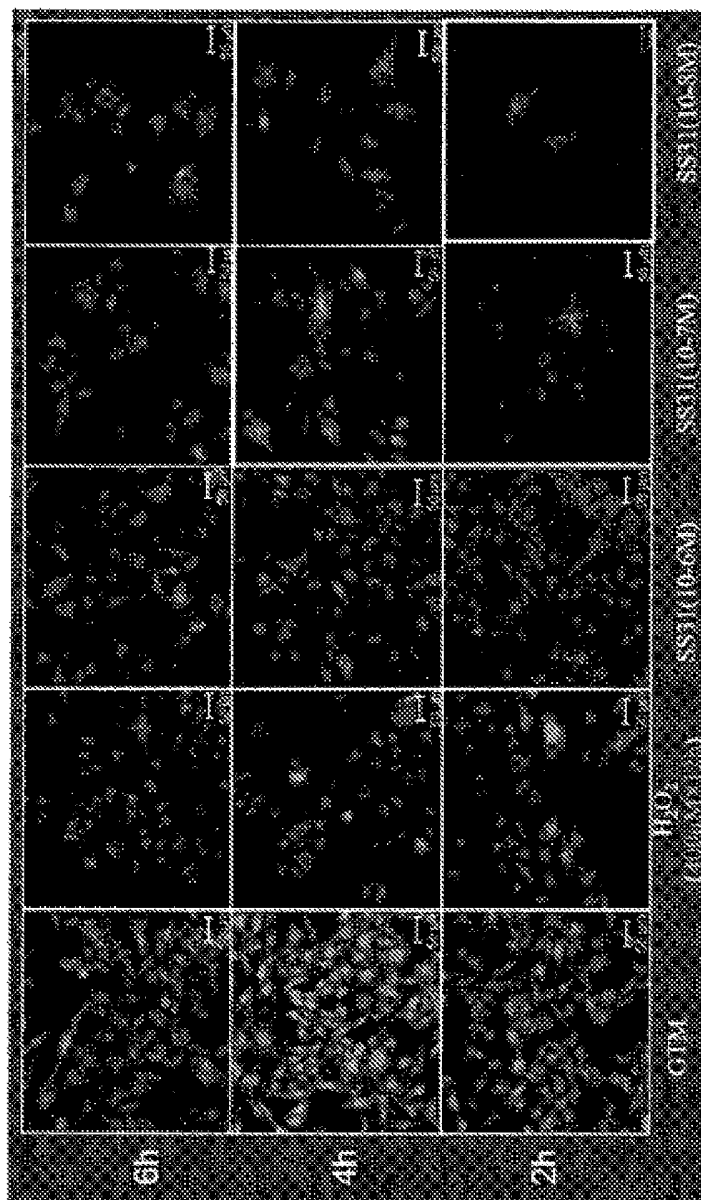


FIG. 20

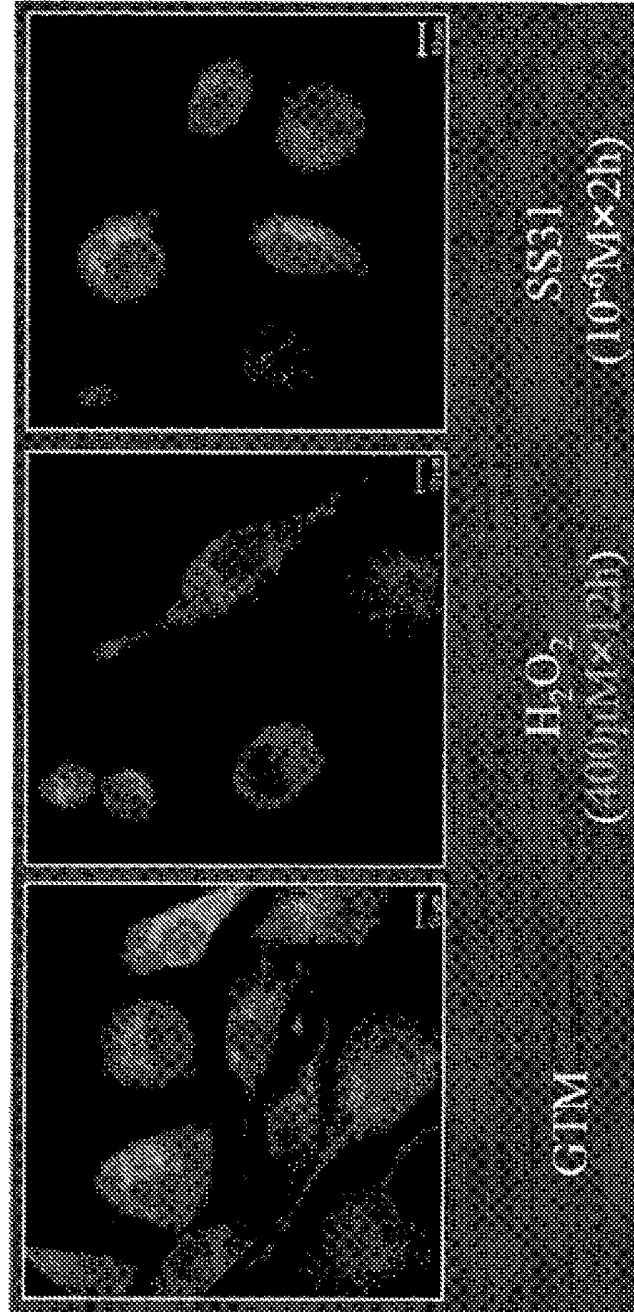


FIG. 21

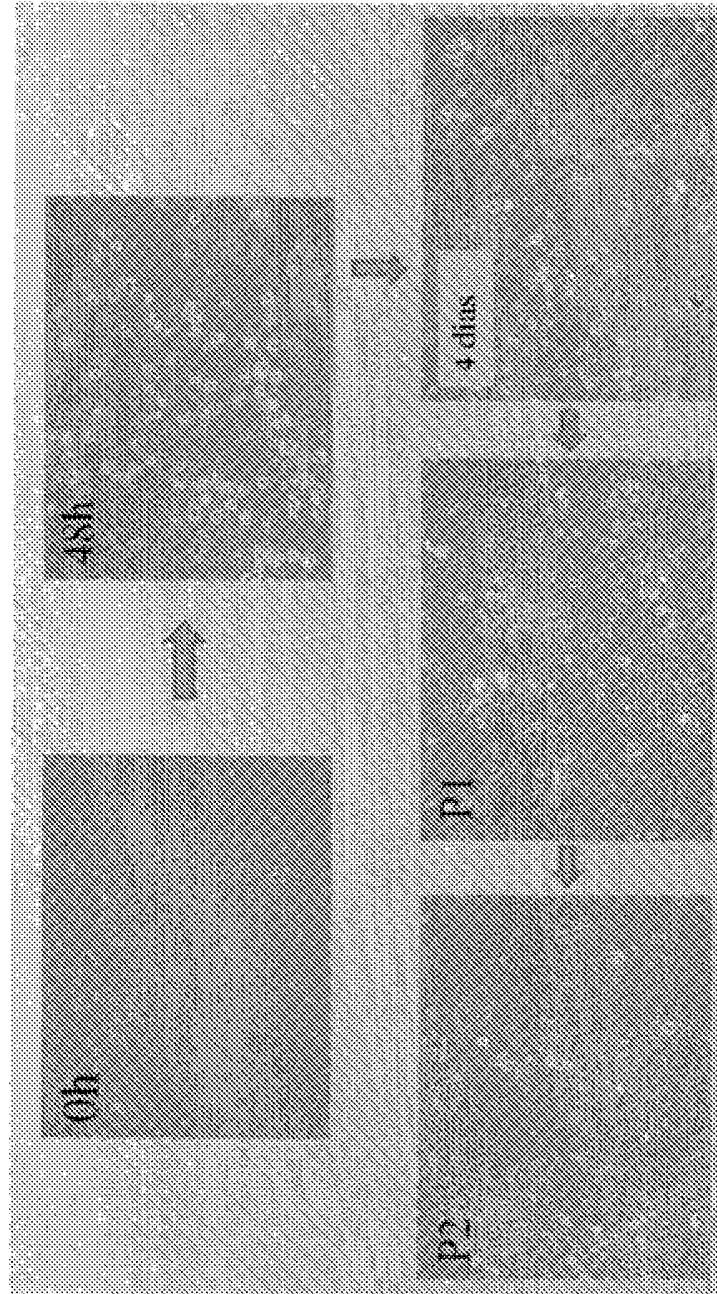


FIG. 22

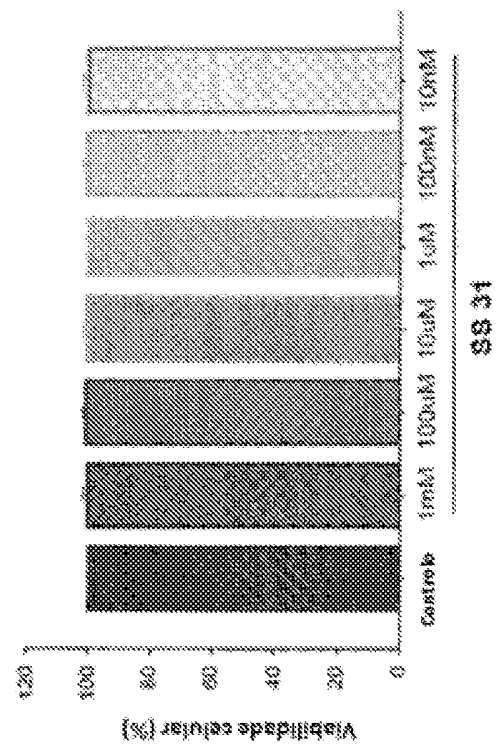


FIG. 23

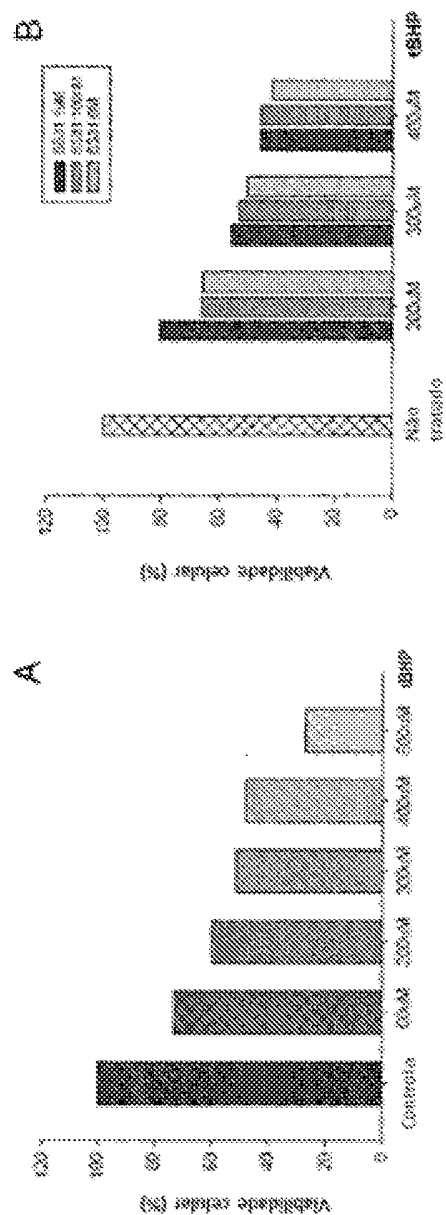


FIG. 24

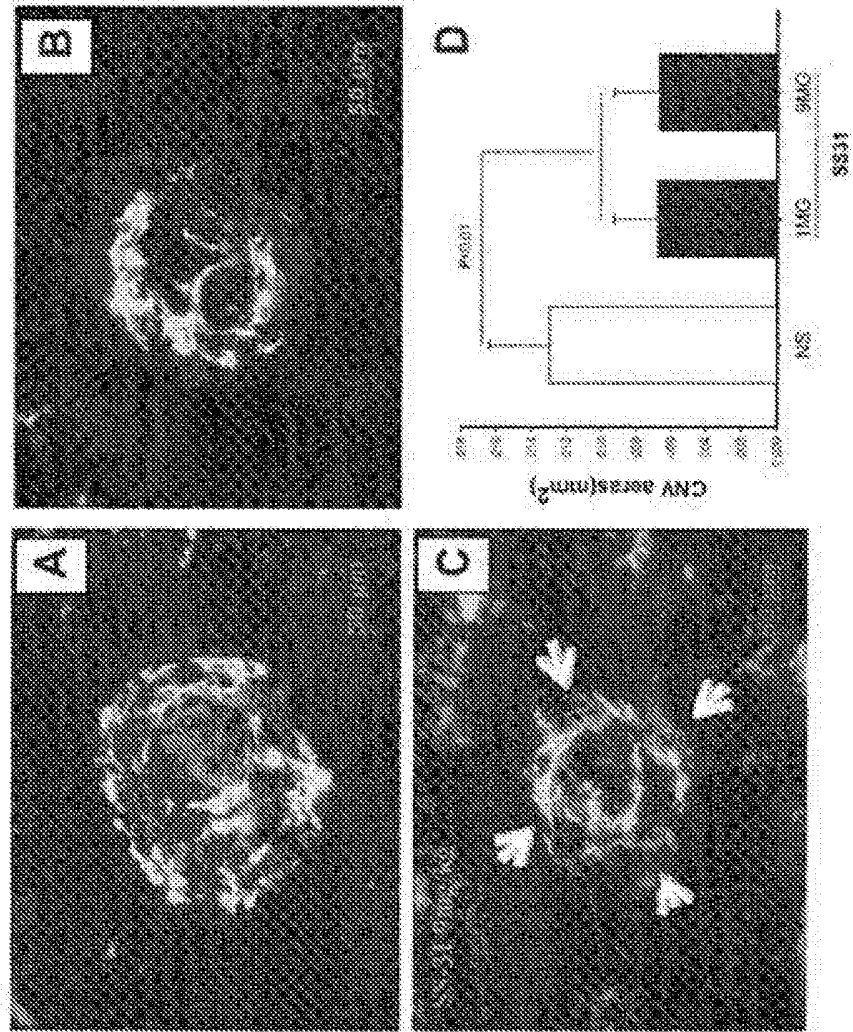


FIG. 25

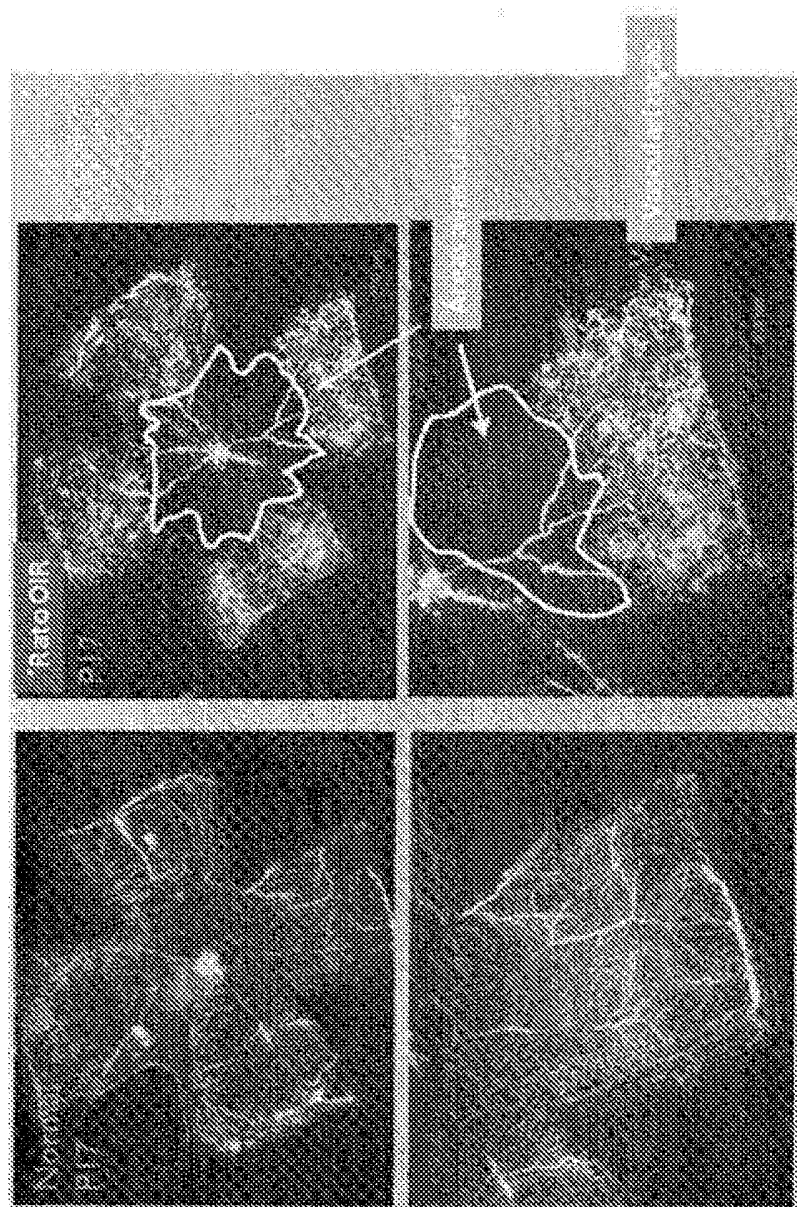


FIG. 26

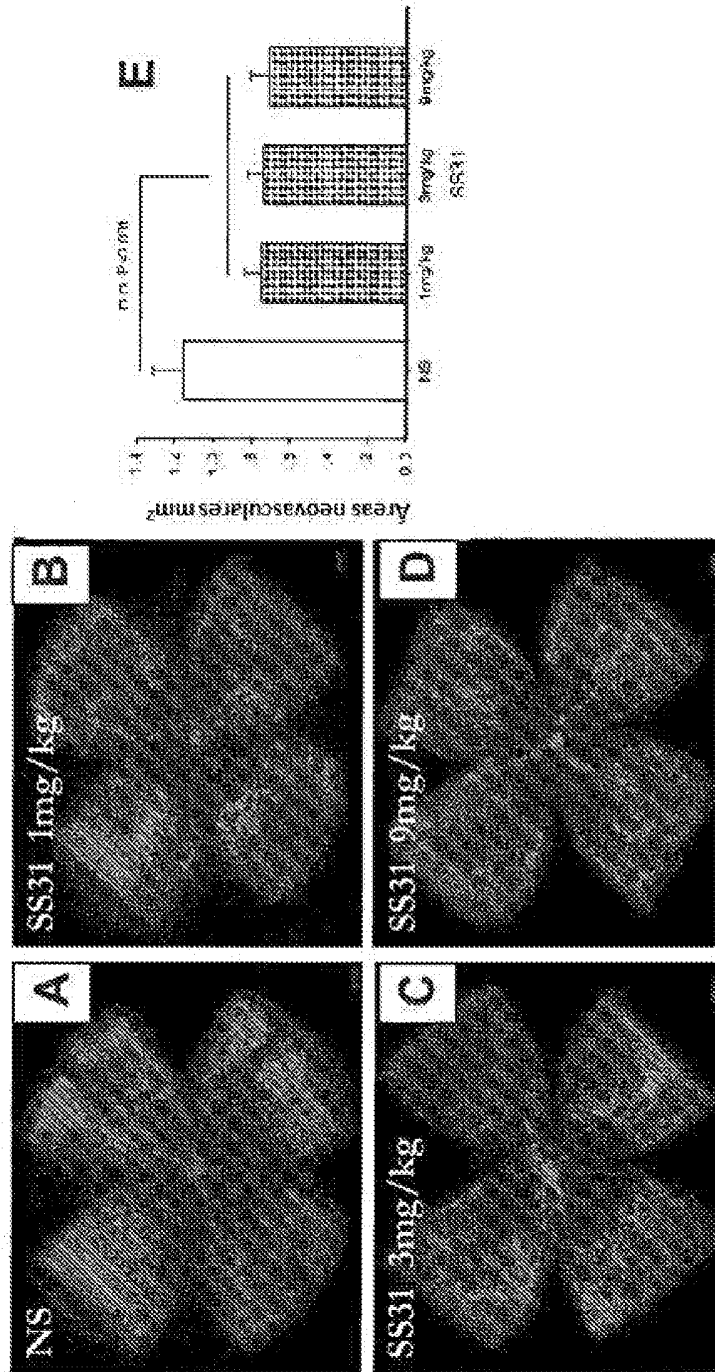




FIG. 27A

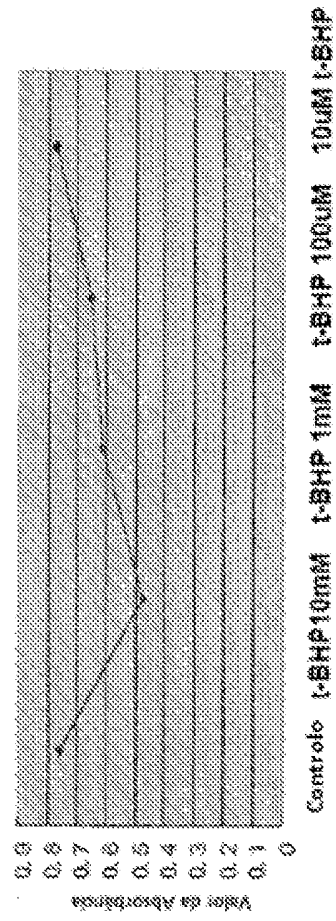


FIG. 27B

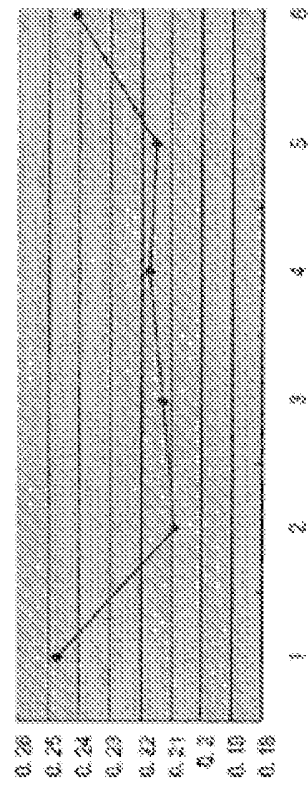


FIG. 28

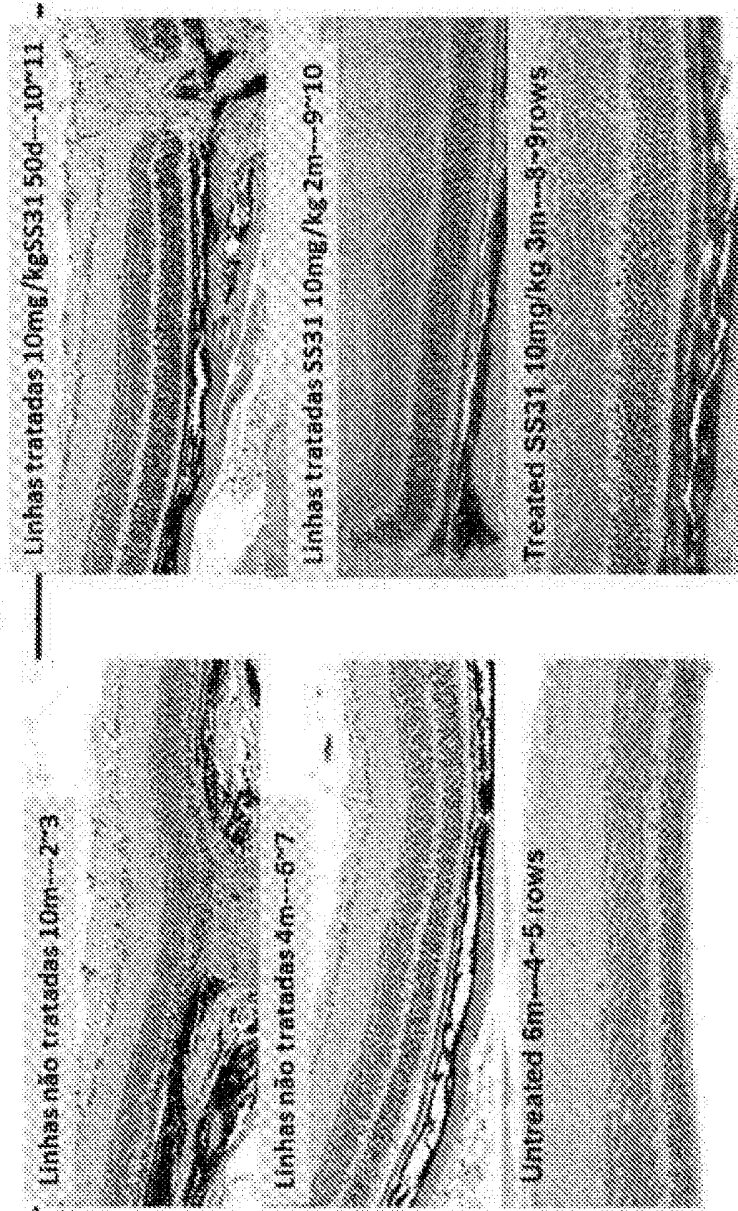


FIG. 29

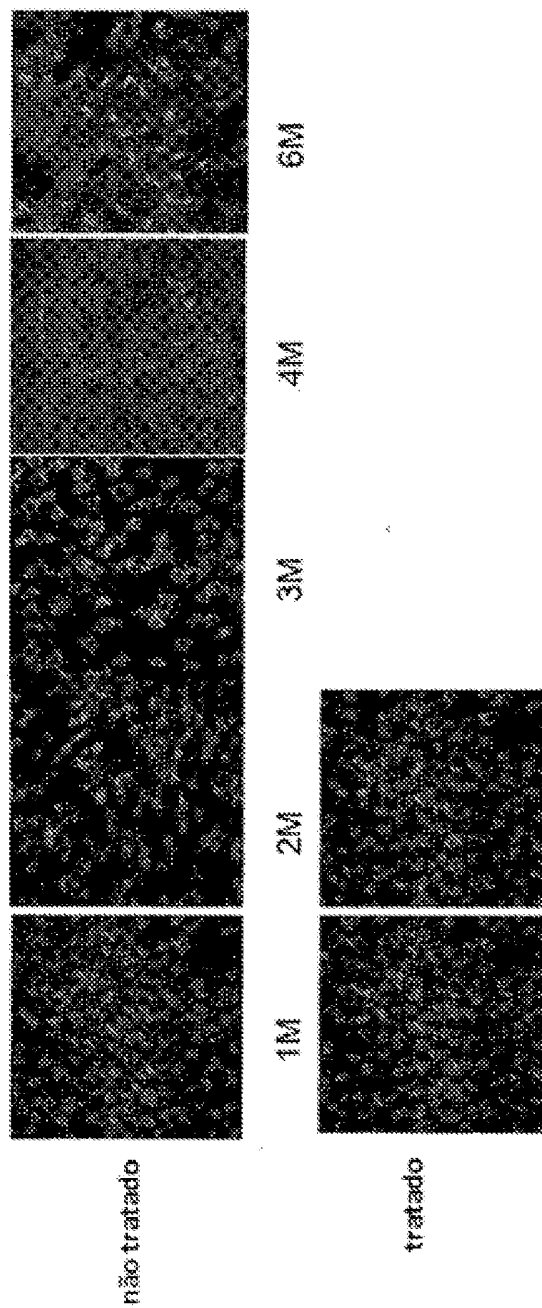


FIG. 30

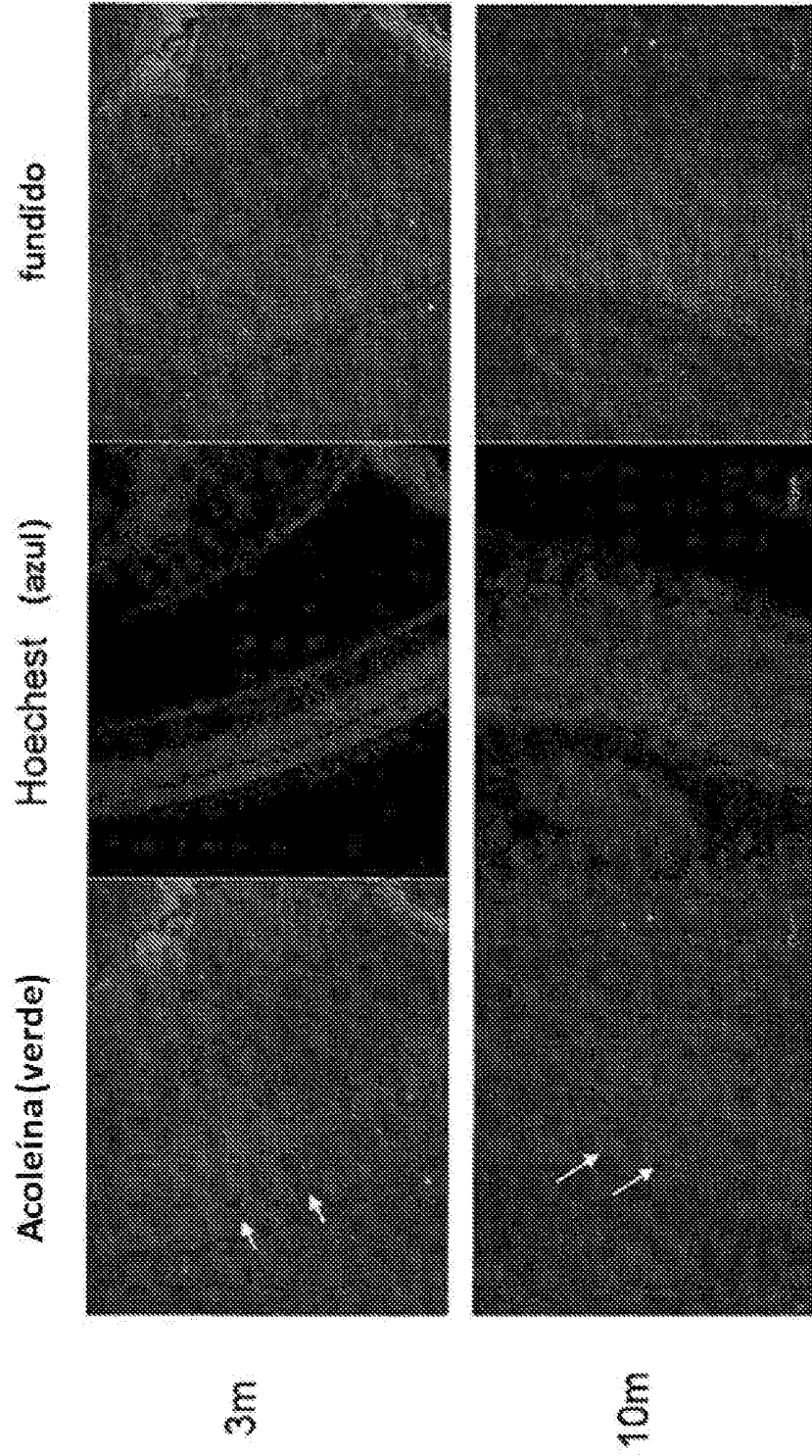


FIG. 31

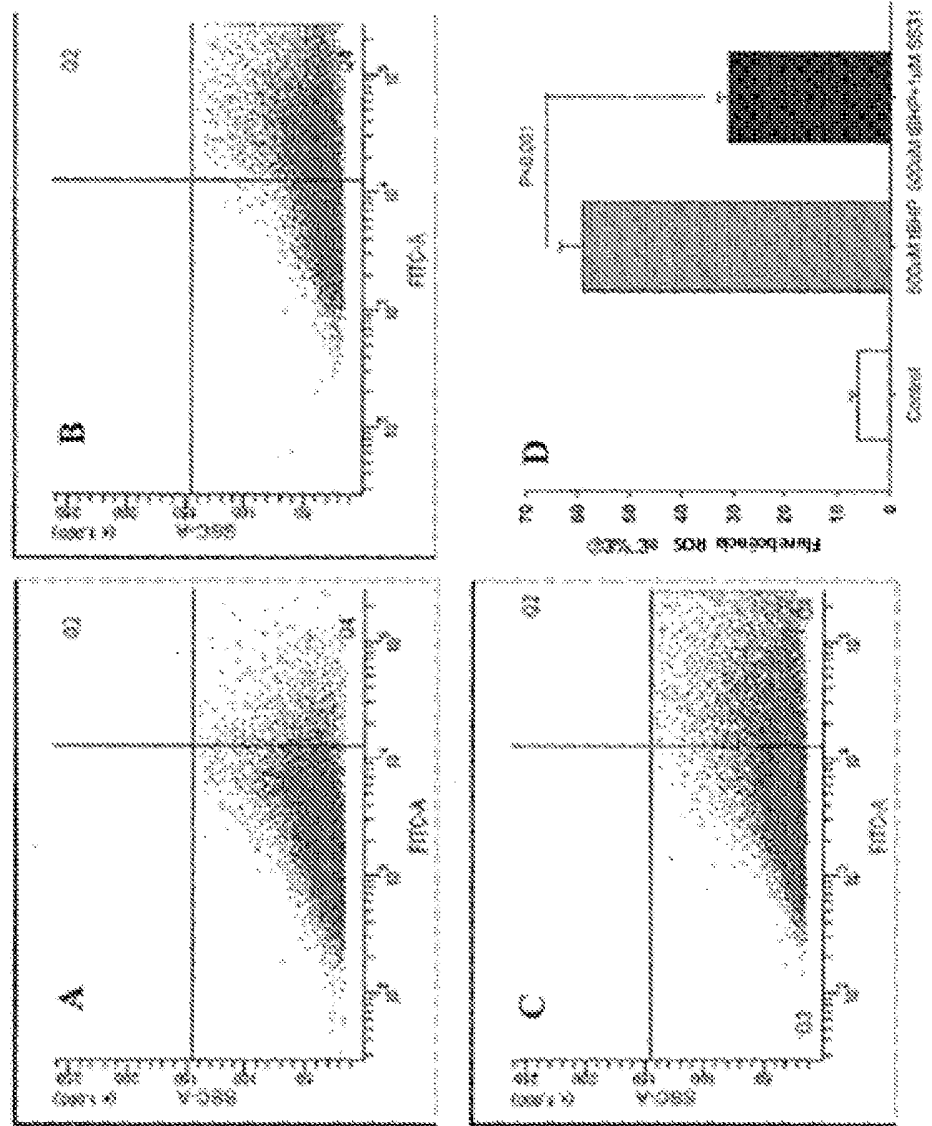


FIG. 32

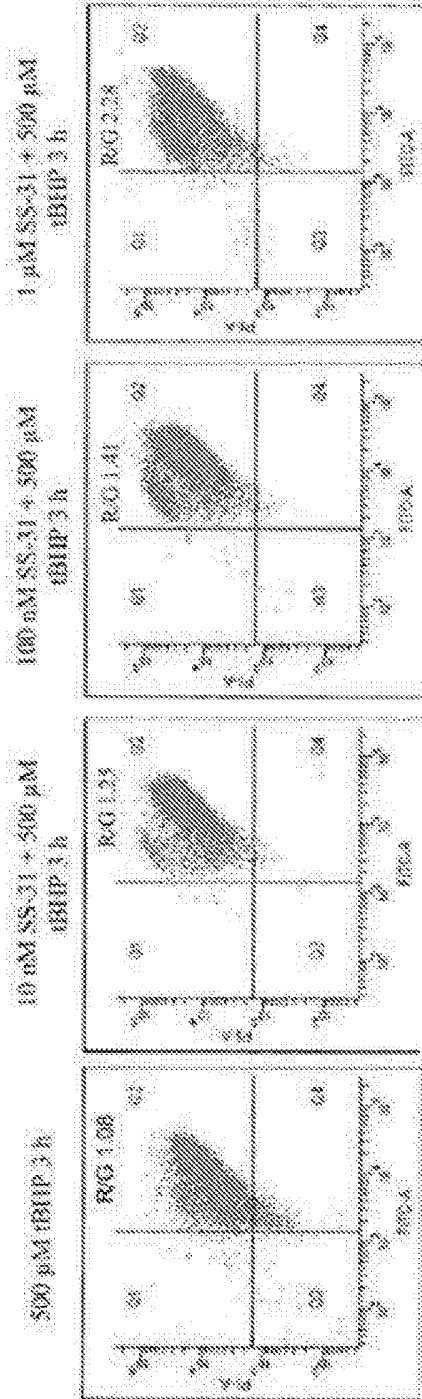


FIG. 33

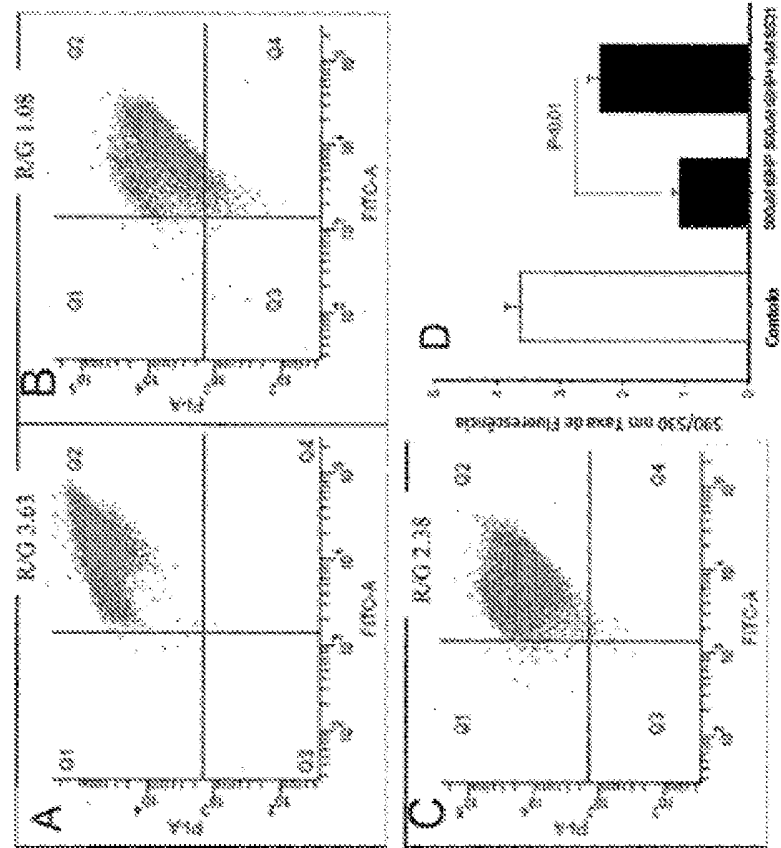






FIG. 35

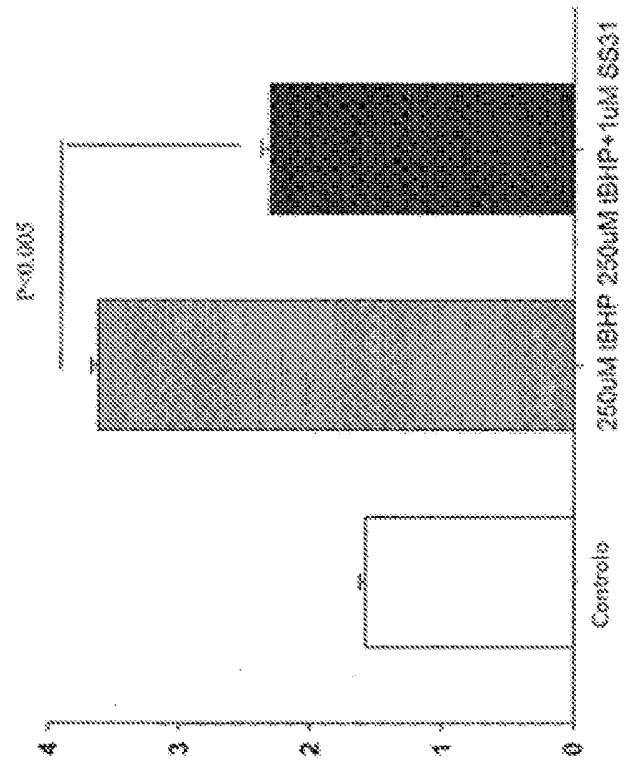


FIG. 36

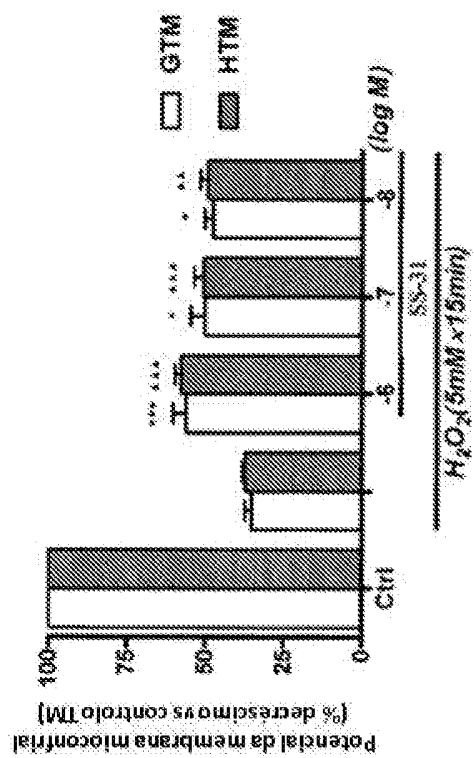


FIG. 37

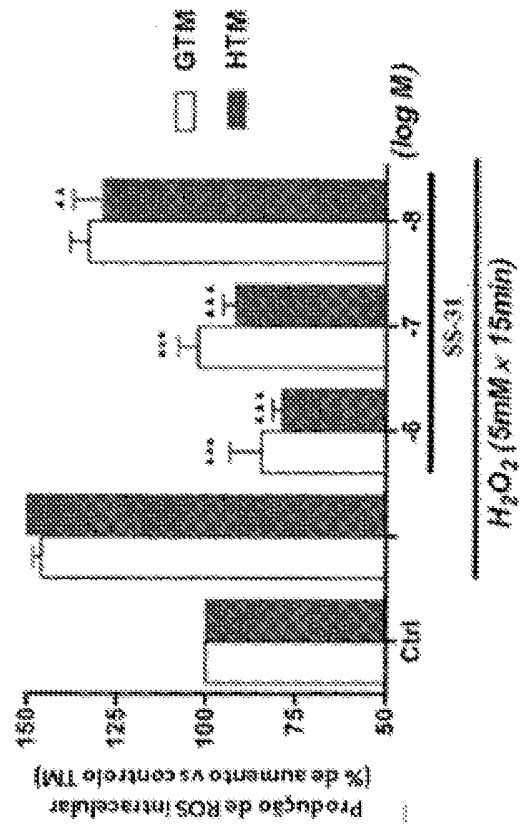


FIG. 38

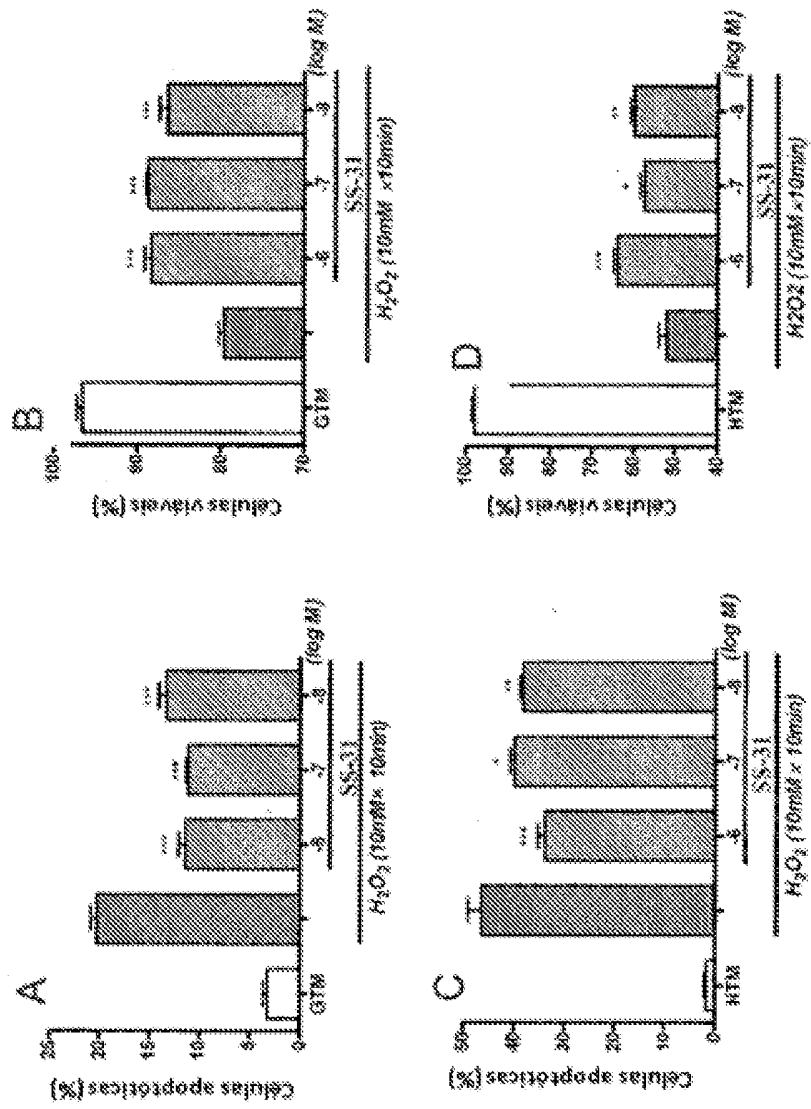


FIG. 39

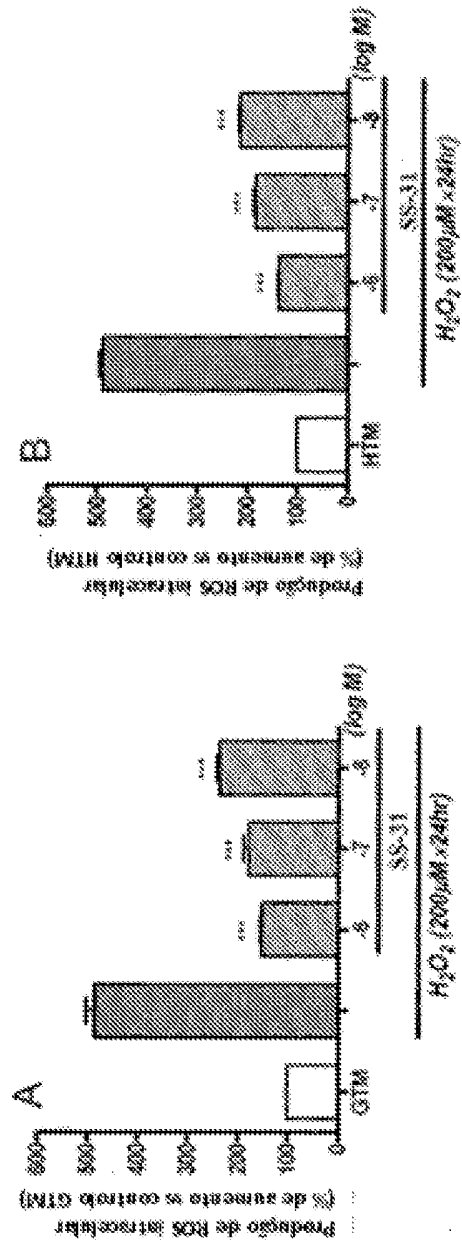


FIG. 40

