



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2470191 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/07 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/12 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.01
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.05.07
(86)	Europeisk søknadsnr	10812524.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.08.23
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.07.04
(30)	Prioritet	2009.08.24, US, 236440 P, 2009.08.28, US, 237745 P, 2010.05.26, US, 348470 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Stealth Peptides International, Inc., 2nd Floor Le Prince de Galles 3-5 Avenue des Citronniers, 98000 Monaco, Monaco
(72)	Oppfinner	LIU, Liping, 13560 Den Hollow Court, Manassas, Virginia 20112, USA TANG, Shibo, 54 South Xianlie Road, GuangzhouGuangdong 510060, Kina LIANG, Xiaoling, 54 South Xianlie Road, GuangzhouGuangdong 510060, Kina
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Metoder og sammensetning for forebygging eller behandling av oftalmiske tilstander
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2011/091357 WO-A2-2007/035640 WO-A2-2009/100363 WO-A2-2009/108695 X. Liang, F. Chen, H. Zhou, C. Yang, G. Sun, Q. Gao, Y. Luo, "SS31 Protects Human RPE Cells From Oxidative Damage and Reduce Laser-Induced Choroidal Neovascularization", 3 March 2010 (2010-03-03), XP009167611, Retrieved from the Internet: URL: http://www.abstractsonline.com/plan/Vi ewAbstract.aspx?mID=2511&sKey=30ba9e7c-8ff2-4a2d-9b34-8bd3ce86ee29&cKey=bb556ca3-13a0-40dd-8b09-f328d94cdeb2&mKey=1EA90E66-C548-49E0-9F05-30DA7938D511 [retrieved on 2013-02-28] CHATURVEDI RAJNISH K ET AL: "Mitochondrial approaches for neuroprotection.", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES DEC 2008, vol. 1147, December 2008 (2008-12), pages 395-412, XP009167547, ISSN: 1749-6632 JARRETT S G ET AL: "Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration", PROGRESS IN RETINAL AND EYE RESEARCH, OXFORD, GB, vol. 27, no. 6, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 596-607, XP025670749, ISSN: 1350-9462, DOI: 10.1016/J.PRETEYERES.2008.09.001 [retrieved on 2008-09-23] BRENNAN L A ET AL: "Mitochondrial function and redox control in the aging eye: Role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations", EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, ACADEMIC PRESS LTD, LONDON, vol. 88, no. 2, 2 February 2009 (2009-02-02), pages 195-203, XP026072626, ISSN: 0014-4835, DOI: 10.1016/J.EXER.2008.05.018 [retrieved on 2008-06-07] YOUSIF LEMA F ET AL: "Targeting Mitochondria with Organelle-Specific Compounds: Strategies and Applications", CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY, WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 10, no. 12, 17 August 2009 (2009-08-17), pages 1939-1950, XP009167550, ISSN: 1439-4227 [retrieved on 2009-07-27] YANG LICHUAN ET AL: "Mitochondria Targeted Peptides Protect Against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Neurotoxicity", ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING, MARY ANN LIEBERT, LARCHMONT, NY, US, vol. 11, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 2095-2104, XP009167548, ISSN: 1523-0864 ALAM N M ET AL: "Reducing mitochondrial oxidative stress to treat diabetes- and age-related visual decline", ABSTRACTS OF THE ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 41, 1 November 2011 (2011-11-01), XP009167565, ISSN: 0190-5295 LI J ET AL: "Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 attenuates high glucose-induced injury on human retinal endothelial cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 404, no. 1, 7 January 2011 (2011-01-07), pages 349-356, XP027587037, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2010.11.122 [retrieved on 2011-01-06]

Kryssreferanse til relaterte søknader

Denne søknaden krever prioritet fra US Provisional Application nr. 61/236,440, inngitt 24. august 2009; US Provisional Application nr. 61/237,745, inngitt 28. august 2009; og US Provisional Application nr. 61/348,470, inngitt 26. Mai 2010.

5

Teknisk område

Foreliggende teknologi vedrører generelt sammensetninger og fremgangsmåter for forebygging eller behandling av oftalmiske sykdommer eller tilstander. Spesielt vedrører foreliggende teknologi administrering av aromatisk-kationiske peptider i effektive mengder for å forebygge eller behandle oftalmiske sykdommer eller tilstander, f.eks. diabetisk retinopati, katarakter, retinitt pigmentosa, glaukom, koroidal neovaskularisering, og oksygenindusert retinopati, i pattedyrindivider.

10

Bakgrunn

Foreliggende beskrivelse er gitt for å assistere i forståelsen for leseren. Informasjonen som er gitt, eller referanser som er sitert, er ikke en tilståelse om at de er tidligere kjent teknikk i forhold til foreliggende oppfinnelse.

15

Sykdommer og degenerative tilstander til den optiske nerven og netthinnen, er de ledende årsakene til blindhet i verden. En signifikant degenerativ tilstand i netthinnen er aldersrelatert makulær degenerasjon (ARMD). ARMD er den mest vanlige årsaken til blindhet hos mennesker over 50 i USA, og forekomstene derav øker med alderen. ARMD blir klassifisert som enten våt (neovaskulær) og tørr (ikke-neovaskulær); idet den tørre formen av sykdommen er mer vanlig. Makulær degenerasjon oppstår når sentralnetthinnen er blitt forstyrret og fortynnet, og dette er vanligvis assosiert med alder, men også karakterisert ved intraokulær inflammasjon og angiogenese (kun våt ARMD) og/eller intraokulær infeksjon. Den deretter dannelsen av frie radikaler, resulterende i oksidativ vevsskade, lokal inflammasjon, og produksjon av vekstfaktorer (så som VEGF og FGF) og inflammatoriske mediatorer, fører til uhensiktsmessig neovaskularisering til felles med den våte formen av ARMD.

20

25

30

Retinopati er en ledende årsak til blindhet i type I diabetes, og er også vanlig i type II diabetes. Graden av retinopati avhenger av varigheten av diabetes, og begynner generelt å oppstå ti eller flere år etter begynnende diabetes. Diabetisk retinopati kan bli klassifisert som ikke-proliferativ, hvor retinopati er karakterisert ved forøket kapillær permeabilitet, ødem og eksudat, eller proliferativ, hvor retinopati er karakterisert ved neovaskularisering som utgår fra netthinnen til glasslegemet,

35

arrdannelse, deponering av fibrøst vev, og potensiale for netthinneløsning. Diabetisk retinopati er antatt å bli forårsaket av utviklingen av glykosylerte proteiner grunnet høy blodglukose. Flere andre mindre vanlige retinopatier inkluderer koroidal neovaskulær membran (CNVM), cystoid makulært ødem (CME), epi-retinal membran (ERM) og makulært hull.

Glaukom består av en samling øyesykdommer som forårsaker synstap ved skade på den optiske nerven. Forhøyet intraokulært trykk (IOP) grunnet utilstrekkelig okulær drenering er hovedårsaken til glaukom. Glaukom utvikles ofte når øyet blir eldre, eller det kan oppstå som et resultat av en øyeskade, inflammasjon, tumor eller i fremskredne tilfeller katarakt eller diabetes. Det kan også bli forårsaket av økning i IOP forårsaket av behandling med steroider. Medikamentterapier som er vist å være effektive i glaukom, reduserer IOP enten ved redusering av vitrøs humorproduksjon, eller ved letting av okulær drenering. Slike midler er ofte vasodilatorer, og virker følgelig på det sympatetiske nervesystemet, og inkluderer adrenerge antagonister.

Oppsummering

Foreliggende teknologi vedrører generelt til behandling eller forebygging av oftalmiske sykdommer eller tilstander i pattedyr, gjennom administrering av terapeutiske effektive mengder av aromatisk-kationiske peptider til individet som trenger det.

Oppfinnelsen er definert i kravene, og er rettet mot et peptid representert ved formel D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eller Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ for anvendelse ved behandling eller forebygging av en oftalmisk tilstand, hvor den oftalmiske tilstanden er valgt fra gruppen bestående av: retinitt pigmentosa, koroidal neovaskularisering, og oksygenindusert retinopati. Det er beskrevet en fremgangsmåte for behandling eller forebygging av en oftalmisk tilstand i et pattedyr som trenger det, idet fremgangsmåten omfatter administrering til individet en terapeutisk effektiv mengde av peptidet D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eller Ph-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. den oftalmiske tilstanden kan bli valgt fra gruppen bestående av: diabetisk retinopati, katarakter, retinitt pigmentosa, glaukom, makulær degenerasjon, koroidal neovaskularisering, netthinnedegenerasjon og oksygenindusert retinopati.

Det er også beskrevet en fremgangsmåte for behandling eller forebygging av oftalmiske tilstander i et pattedyr, omfattende administrering til nevnte pattedyrindivid en terapeutisk effektiv mengde av et aromatisk-kationisk peptid. I noen utførelsesformer er det aromatisk-kationiske peptidet et peptid som har:

minst én netto positiv ladning;
 et minimum av fire aminosyrer;
 et maksimum av omtrent tyve aminosyrer;

et forhold mellom minimum antall nettopositive ladninger (p_m) og det totale
 5 antallet aminosyreresidier $\otimes$ hvor $3p_m$ er det største antallet som er mindre enn eller
 lik $r + 1$; og et forhold mellom det minimum antallet aromatiske grupper (a) og det
 totale antallet av netto positive ladninger (p_t), hvor $2a$ er det største antallet som er
 mindre enn eller lik $p_t + 1$, med unntagelse av at når a er 1, kan p_t også være 1. I
 bestemte utførelsesformer er pattedyrindividet et menneske.

10

$2p_m$ kan være det største antallet som er mindre enn eller lik $r+1$, og kan være lik p_t .
 Det aromatisk-kationiske peptidet kan være et vannoppløselig peptid, som har et
 minimum av to eller et minimum av tre positive ladninger.

15

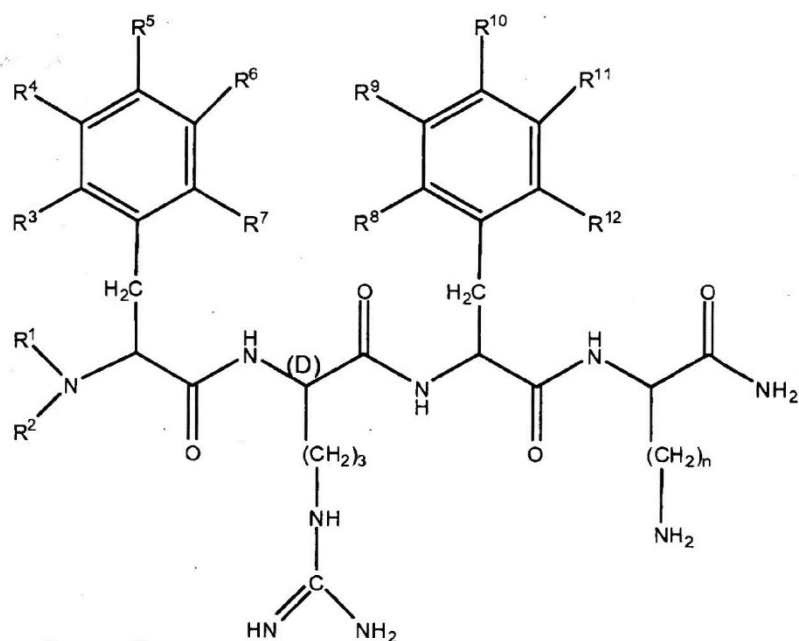
Peptidet beskrevet heri kan omfatte én eller flere ikke-naturlig forekommende
 aminosyrer, f.eks., én eller flere D-aminosyrer. I noen utførelsesformer er den C-
 terminale karboksylgruppen av aminosyren ved den C-terminale enden amidert. I
 visse utførelsesformer har peptidet et minimum av fire aminosyrer. Peptidet kan ha et
 maksimum på omtrent 6, et maksimum på omtrent 9, eller et maksimum på omtrent
 20 12 aminosyrer.

20

I én utførelsesform beskrevet heri, kan peptidet ha formelen Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
 (SS-20) eller 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. I en bestemt utførelsesform har det
 aromatisk-kationiske peptidet formelen D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (referert til om
 25 hverandre som SS-31, MTP-131, eller BendaviaTM).

25

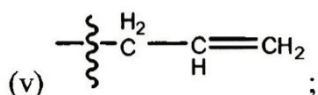
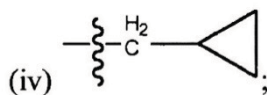
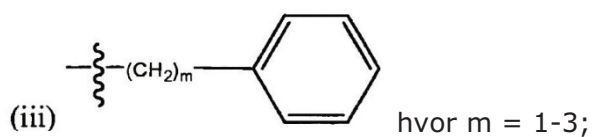
I én utførelsesform beskrevet heri er peptidet definert ved formel I:



hvor R^1 og R^2 er hver uafhængig valgt fra

(i) hydrogen;

5 (ii) lineær eller forgrenet C_1 - C_6 -alkyl;



R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} og R^{12} er hver uafhængig valgt fra

(i) hydrogen;

10 (ii) lineær eller forgrenet C_1 - C_6 -alkyl;

(iii) C_1 - C_6 -alkoxy;

(iv) amino;

(v) C_1 - C_4 -alkylamino;

(vi) C_1 - C_4 -dialkylamino;

15 (vii) nitro;

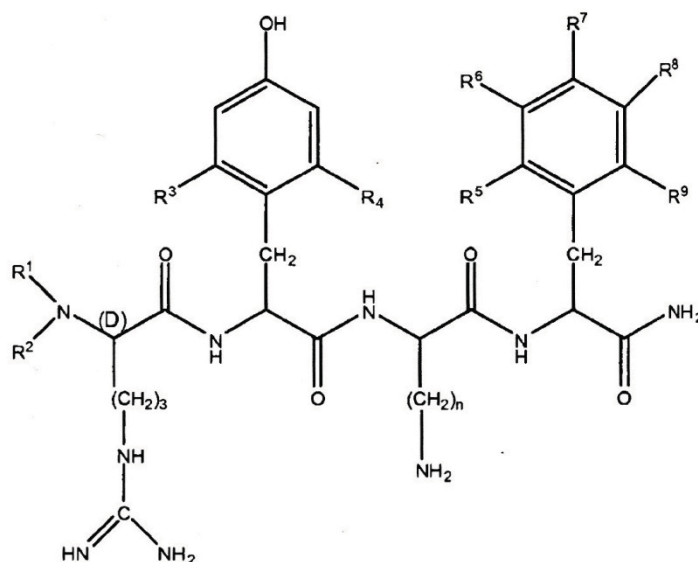
(viii) hydroksyl;

(ix) halogen, hvor "halogen" omfatter klor, fluor, brom og jod; og n er et tall fra 1 til

5.

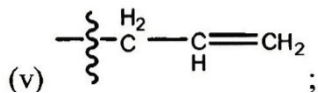
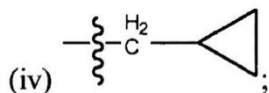
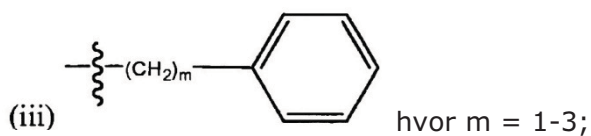
I en bestemt utførelsesform er R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} og R^{12} alle hydrogen; og n er 4. I en annen utførelsesform er R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 og R^{11} alle hydrogen; R^8 og R^{12} er metyl; R^{10} er hydroksyl; og n er 4.

- 5 I én utførelsesform beskrevet heri, er peptidet definert ved formel II:



hvor R^1 og R^2 er hver uavhengig valgt fra

- 10 (i) hydrogen;
(ii) lineær eller forgrenet C_1 - C_6 -alkyl;



R^3 og R^4 er hver uavhengig valgt fra

- 15 (i) hydrogen;
(ii) lineær eller forgrenet (C_1 - C_6 -alkyl);
(iii) C_1 - C_6 -alkoksy;
(iv) amino;
(v) C_1 - C_4 -alkylamino;
20 (vi) C_1 - C_4 -dialkylamino;
(vii) nitro;

(viii) hydroksyl;

(ix) halogen, hvor "halogen" omfatter klor, fluor, brom, og jod;

R^5 , R^6 , R^7 , R^8 og R^9 er hver uavhengig valgt fra

(i) hydrogen;

5 (ii) lineær eller forgrenet C_1 - C_6 -alkyl;

(iii) C_1 - C_6 -alkoksy;

(iv) amino;

(v) C_1 - C_4 -alkylamino;

(vi) C_1 - C_4 -dialkylamino;

10 (vii) nitro;

(viii) hydroksyl;

(ix) halogen, hvor "halogen" omfatter klor, fluor, brom, og jod; og n er et tall fra 1 til 5.

15 De aromatisk-kationiske peptidene kan bli administrert på forskjellige måter. I noen utførelsesformer kan peptidene bli administrert intraokulært, oralt, topisk, intranasalt, intravenøst, subkutant eller transdermalt (f.eks. ved iontoforese).

I ett aspekt tilveiebringer foreliggende beskrivelse en farmasøytisk sammensetning
20 omfattende en terapeutisk effektiv mengde av peptidet D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eller Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ formulert for topisk, iontoforetisk eller intraokulær administrasjon.

I ett aspekt tilveiebringer foreliggende beskrivelse en oftalmisk formulering
25 omfattende en terapeutisk effektiv emngde av peptidet D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eller Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. I én utførelsesform er formuleringen oppløselig i hornhinnen, vandig humor og linsen i øyet. I én utførelsesform omfatter formuleringen videre et konserveringsmiddel. I én utførelsesform er konserveringsmidlet tilstede i en konsentrasjon på mindre enn 1 %.

30 I én utførelsesform omfatter formuleringen videre et aktivt middel valgt fra gruppen bestående av: en antioksidant, en metallkompleksdanner, et anti-inflammatorisk medikament, et antibiotika og et antihistamin. I én utførelsesform er antioksidanten vitamin A, vitamin C, vitamin E, lykopen, selenium, α -lipoinsyre, koenzym Q, glutation
35 eller et karotenoid. I én utførelsesform omfatter formuleringen videre et aktivt middel valgt fra gruppen bestående av: aceclidin, acetazolamid, anekortav, atropin, azapentasen, azelastin, bakitracin, befunolol, betametason, betaksolol, bimatoprost,

brimonidin, brinzolamid, karbachol, karteolol, celecoxib, kloramfenikol, klortetrasyklin, ciprofloksacin, kromoglykat, kromolyn, syklopentolat, syklosporin, dapiprazol, demekarium, deksametason, diklofenak, diklorfenamid, dipivefrin, dorzolamid, ekotiopat, emedastin, epinastin, epinefrin, erytromycin, etokszolamid, eukatropin, 5 fludrokortison, fluormetolon, flurbiprofen, formivirsen, framycetin, gansiklovir, gatifloksacin, gentamycin, homatropin, hydrokortison, idoksuridin, indometacin, isofluorofat, ketorolak, ketotifen, latanoprost, levobetaksolol, levobunolol, levokabastin, levofloksacin, lodoksamid, loteprednol, medryson, metazolamid, metipranolol, moksifloksacin, nafazolin, natamycin, nedokromil, neomycin, norfloksacin, ofloksacin, 10 olopatadin, oksymetazolin, pemirolast, pegaptanib, fenyleprin, fysostigmin, pilokarpin, pindolol, pirenoksin, polymyksin B, prednisolon, proparakain, ranibizumab, rimeksolon, skopolamin, sezolamid, skvalamin, sulfacetamid, suprofen, tetrakain, tetrasyklin, tetrahydrozolin, tetryzolin, timolol, tobramycin, travoprost, triamcinulon, trifluormetazolamid, trifluoridin, trimetoprim, tropikamid, unoproston, vidarabin, 15 xylometazolin, farmasøytisk akseptable salter derav, og kombinasjoner derav.

Kort beskrivelse av figurene

Figurene 1A og 1B viser effektene av forskjellige konsentrasjoner av SS-31 (10 nM, 100 nM, 1 μ M og 10 μ M) anvendt som kobehandling med 30 mM glukose (HG). Figur 20 1A viser analyser for apoptose, vurdert ved flow cytometri etter Annexin V/PI-farging, som viste at overlevelsesforholdene for HRECs (Q3) var 99,3 %, 83,2 %, 84,3 %, 90,7 %, 92,8 % og 94,3 %, 24 timer etter behandling. Figur 1B er en grafisk representasjon av overlevelsesforholdet for HRECs. Data for SS-31-konsentrasjonene på 100 nM, 1 μ M og 10 μ M var betydelig høyere enn det som fremkommer med høy 25 glukoseeksponerte celler i fravær av kobehandling med SS31. * $p < 0,05$ vs. 30 mM høy glukosebehandlet gruppe.

Figurene 2A-2F er en serie av mikrografer som viser kobehandling med SS-31-reduerte intracellulære reaktive oksygenarter (ROS) i HRECs eksponert for 30 mM 30 glukose i 24 t og 48 t. Intracellulær ROS ble målt ved anvendelse av dihydroetidium. 2A, 2D normale kulturmedier; 2B, 2E 30 mM glukose; og 2C, 2F 30 mM glukose + SS-31 (100 nM) ved 24 og 48 t.

Figurene 3A og 3B viser at SS-31 forebygger mitokondrie potensielt tap av HRECs 35 behandlet med høy glukose. Figur 3A. $\Delta\Psi_m$ til HRECs ble målt ved flow cytometri etter JC-1 fluorescensprobefarging. Høy glukose (30 mM) behandling resulterte i et hurtig tap av mitokondriemembranpotensialet av dyrkede HRECs ved 24 og 48 timer. I

kontrast til dette viste flow cytometrianalyser at 30 mM glukose kobehandlet med SS-31 økte $\Delta\Psi_m$ sammenliknet med gruppen med kun høy glukose. Figur 3B. Kvantitativ analyse av $\Delta\Psi_m$ i høy glukose HRECs kobehandlet med SS-31 i 24 og 48 timer. Kun høy glukose påvirker $\Delta\Psi_m$ negativt. I kontrast til dette gjenopprettet SS-31 $\Delta\Psi_m$ til kontrollnivåene. Verdier representerer gjennomsnittlig $\pm$ SD av seks separate eksperimenter utført i triplikat. $*P<0,05$.

Figurene 4A og 4D er konfokale mikroskopiske avbildninger som viser at HRECs i den normale glukosegruppen, og SS-31 kobehandlet gruppe har mer nøyaktig overlappende cytokrom c farging og HSP60-farging ved 24 og 48 timer, som indikerer kolokalisering av cytokrom c og mitokondrier. 24 og 48 timer etter behandling ble cytokrom c betydelig øket i cytoplasma til HRECs behandlet med 30 mM glukose. Figurene 4B og 4E viser cytokrom c-innholdet i mitokondrier og cytoplasma bestemt ved Western blot. Figurene 4C og 4F viser kvantitativ analyse av prosentandelen av cytokrom c-innholdet i mitokondrier og cytoplasma av HRECs kobehandlet med høy glukose og SS-31 i 24 og 48 t.

Figurene 5A og figur 5B viser forøket ekspresjon av caspase-3 i HRECs behandlet med høy glukose (HG) ble redusert med SS-31 kobehandlet som detektert ved Western blot. Caspase-3-ekspresjonen var normalisert til ekspresjonen av β -aktin. Figurene 5C-E viser at SS-31 øker ekspresjonen av Trx2 i høy glukosebehandlede HRECs. Figur 5C viser mRNA-nivået av Trx2 i HRECs eksponert for 30 mM glukose behandlet med SS-31 i 24 t og 48 t. Figur 5D viser nivået av Trx2-proteinekspresjon målt ved Western blot. Figur 5E viser kvantitativ analyse av proteinnivået av Trx2 i HRECs 24 og 48 t etter høy glukose med eller uten SS-31 kobehandling.

Figur 6 er et fotografi av effekten av SS-31 på linsene til rotter med diabetes. Øverste rad: linser oppnådd fra rotter med diabetes; bunnraden: linser oppnådd fra diabetesrotter behandlet med SS-31 eller SS-20.

Figur 7 er en serie fotografier som viser effektene av SS-31 og SS-20 på linsene til diabetesrotter. Diabetes ble indusert ved høy fettdiett og streptozotocin (HFD/STZ) (øverste rad) eller streptozotocin (STZ) alene (nederste rad).

Figur 8 er en serie av mikrografer som viser linseepitel fra normale rotter, diabetesrotter og diabetesrotter behandlet med SS-31. Diabetes ble indusert ved HFD/STZ.

Figur 9 er en serie mikrografer som viser lenseepitel fra normale rotter, diabetesrotter og diabetesrotter behandlet med SS-31. Diabetes ble induisert ved HFD/STZ.

5 Figur 10 er en serie diagrammer som viser integriteten av blodnetthinnebarrierer til normale rotter (NRC), diabetesrotter og diabetesrotter behandlet med SS-20 eller SS-31, som analysert ved Evans blå ekstravasasjon. (A) diabetes induisert av STZ; (B) diabetes induisert av HFD/STZ.

10 Figur 11 er en serie av mikrografer som viser retinamikrokar til normale rotter (NRC), diabetesrotter (HFD/STZ) og diabetesrotter behandlet med SS-31.

Figur 12 er en serie mikrografer som viser netthinnemikrokar til normale rotter, diabetesrotter (STZ), og diabetesrotter behandlet med SS-31.

15

Figurene 13A-13D er en serie av mikrografer som viser fordelingen av "tight junction" proteinet claudin-5 i retinale mikrokår i normale rotter (A), STZ-rotter (B), STZ/SS-20-behandlede rotter (C), eller STZ/SS-31-behandlede rotter (D).

20 Figur 14 er et diagram som viser mangelen på cytotoxisitet til SS-31 på "trabecular meshwork" celler fra ikke-sykdomsindivider (HTM) og "trabecular mashwork" celler fra glaukompasienter (GTM) administrert SS-31.

Figur 15 er en serie av konfokale mikrografer som viser kobehandling med SS-31 doseavhengig inhiberte reduksjonen i mitokondriepotensiale ($\Delta\Psi_m$) utløst av 200 μM H_2O_2 i "trabecular meshwork" celler fra glaukompasienter (GTM).

25

Figur 16 er en serie diagrammer som viser kobehandling med SS-31 inhiberte reduksjonen i miktokondriemembranpotensialet ($\Delta\Psi_m$), målt ved TMRM og flow cytometri, i "trabecular meshwork" celler fra glaukompasienter (GTM) induisert av 200 μM H_2O_2 .

30

Figur 17 er et diagram som sammenlikner mitokondriell membranpotensiale ($\Delta\Psi_m$) i GTM og HTM-celler.

35

Figur 18 er en serie mikrografer som viser de morfologiske forandringene i GTM-cellene i respons til SS-31-behandling sett ved anvendelse av invertert fasekontrastmikroskopi.

- 5 Figur 19 er en serie mikrografer som viser kobehandling med SS-31 reduserer tapet av mitokondriemembranpotensialet i GTM-celler forårsaket av 400 μM H_2O_2 på en doseavhengig måte sett ved anvendelse av konfokal mikroskopi.

- 10 Figur 20 er en serie mikrografer som viser kobehandling med SS-31 reduserte tapet av mitokondriemembranpotensialet ($\Delta\Psi\text{m}$) i GTM-celler forårsaket av 400 μM H_2O_2 sett ved TMRM og konfokal mikroskopi (200x forstørrelse).

- 15 Figur 21 er en serie mikrografer som viser de morfologiske forandringene i TGTM-cellene i respons til SS-31-behandling sett ved anvendelse av invertert fasekontrastmikroskopi.

Figur 22 er et diagram som viser at SS-31 ikke hadde noen effekt på levedyktigheien til primære humane netthinnepigmentepitelial (RPE) celler (målt ved MTT-analyse).

- 20 Figur 23A er et diagram som viser effekten av forskjellige konsentrasjoner av tBHP på levedyktigheten (målt i en MTT-analyse) av RPE-celler. Figur 23B er et diagram som viser effektene av forskjellige konsentrasjoner av SS-31 på cellelevedyktigheten når eksponert for økende konsentrasjoner av tBHP.

- 25 Figurene 24A-24C er en serie av mikrografer som illustrerer de patologiske effektene i en koroidal neovaskularisering (CNV) musemodell. Figur 24D er en graf som viser CNV-området i behandlede og kontrollgrupper.

- 30 Figur 25 er en serie mikrografer som illustrerer forskjellige patologiske funn i en oksygenindusert retinopati (OIR) musemodell. Merk områder med avaskularisert og ny vaskularisering i en P17 OIR-mus sammenliknet med en P17 normal mus.

- 35 Figurene 26A-26D er en serie mikrografer som viser effekten av administrering av SS-31 i OIR-musemodellen. Figur 26E er en graf som viser det neovaskulære området til kontroll og behandlede grupper. SS-31 reduserte det avaskulære området.

Figur 27A er et diagram som viser effekten av forskjellige doser av tBHP på cellelevedyktigheten til en 661W stavcellelinje avledet fra en musenetthinnetumor. Figur 27B er et diagram som viser effekten av 1 μ M SS-31 i redusering av tBHP-indusert 661W celledød.

5

Figur 28 er en serie mikrografer som viser tykkelsen til netthinne ytre nukleære lag (ONL) i en musemodell på netthinne degenerasjon i kontroll og SS-31-behandlede mus.

10

Figur 29 er en serie mikrografer som viser stavcelletettheten i netthinneplateoppstillinger ("flat mounts") farget med peanøttagglutinin (PNA), som selektivt farger stavcelle indre og ytre segmenter i kontroll og SS-31-behandlede mus.

15

Figur 30 er en serie mikrografer som viser farging for akolein, en markør for oksidativ lipidskade i en musemodell for netthinne degenerasjon.

20

Figur 31 er en serie grafer som viser fluorescensintensiteten til intracellulær ROS-produksjon i tre grupper av RPE-celler ved anvendelse av FACS-analyser. Figur 31A viser ROS-produksjonen i kontroll RPE-celler; Figur 31B viser ROS-produksjonen i RPE-celler behandlet med 500 μ M tBHP i 3 t; Figur 31C viser ROS-produksjon i RPE-celler behandlet med 500 μ M tBHP i 3 t og 1 μ M SS-31.

25

Figur 32 er en serie grafer som viser analyse av MMP merket med JC-1 i en FACS-analyse. Tre forskjellige konsentrasjoner av SS-31-grupper ble analysert.

30

Figurene 33A-33C er en serie grafer som viser effekten av 1 μ M SS-31 på MMP-reduksjon induert av tBHP. Figur 33A: kontrollgruppe; Figur 33B: 500 μ M tBHP i 3 t gruppen; figur 33C: 1 μ M SS-31 i 4 t + 500 μ M tBHP i 3 t gruppen. Figur 33D er et diagram som sammenlikner fluorescensforholdet for forskjellige grupper. $*P < 0,01$, C vs. B.

35

Figurene 34A-34C er en serie grafer som viser effekten av SS-31 på celleapoptose induert av 250 μ M tBHP i 24 t. Figur 34A: kontrollgruppe; Figur 34B: 250 μ M tBHP i 24 t gruppen; Figur 34C: 1 μ M SS-31 i 4 t + 250 μ M tBHP for 24 t gruppen. Figur 34D er et diagram som sammenlikner fluorescensforholdet til forskjellige grupper. $*P < 0,05$ C vs. B.

Figur 35 er et diagram som viser MDA-nivået induisert av tBHP i 3 grupper av RPE-celler. *P<0,05, 1 μ M SS-31 i 4 t + 250 μ M tBHP i 24 t gruppe vs 250 μ M tBHP i 24 t.

Figur 36 er en graf som viser fluorescensintensiteten til TMRM til GTM- og HTM-celler i kontroll og SS-31-behandlede grupper, målt ved anvendelse av FACS-analyse.

Figur 37 er en graf som viser fluorescensintensiteten til ROS til GTM- og THM-celler i kontroll og SS-31-behandlede grupper, målt ved anvendelse av FACS-analyser.

Figur 38 er en serie grafer som viser celleapoptose til kontroll og SS-31-behandlede grupper vurdert ved prosentandel av celler i Q2+Q4-kvadranten.

Figur 39 er en serie grafer som viser at SS-31 reduserte intracellulær ROS-produksjon i GTM3- og iHTM-celler behandlet med H₂O₂.

Figur 40 er en serie grafer som viser at SS-31 beskyttet overfor H₂O₂-indusert mitokondriedepolarisering av GTM3- og iHTM-celler.

Detaljert beskrivelse

Det er å bemerke at visse aspekter, metoder, utførelsesformer, variasjoner og trekk ved oppfinnelsen er beskrevet nedenfor i forskjellige detaljnivåer for å tilveiebringe en vesentlig forståelse av foreliggende oppfinnelse.

Ved praktisering av foreliggende oppfinnelse blir mange konvensjonelle teknikker innen molekylærbiologi, proteinbiokjemi, cellebiologi, immunologi, mikrobiologi og rekombinant DNA anvendt. Disse teknikkene er velkjente og forklart i f.eks. *Current Protocols in Molecular Biology*, bind I-III, Ausubel, red. (1997); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, andre utgave (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, bind I og II, Glover, red. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, red. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, red. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, red. (1984); *Animal cell Culture*, Freshney, red. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; seriene, *Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, red. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); og *Meth. Enzymol.*, bind 154 og 155, Wu & Grossman, og Wu, red.

Definisjonene av visse angivelser som anvendt i denne beskrivelsen er angitt nedenfor. Hvis ikke definert på annen måte, har alle tekniske og vitenskapelige termer anvendt heri generelt den samme betydningen som er vanlig forstått av fagfolk innenfor dette området som denne oppfinnelsen hører til.

5

Som anvendt i denne beskrivelsen og tilhørende krav, angir entallsformene "en", "et" og "det" flertallsangivelser hvis ikke innholdet klart indikerer noe annet. For eksempel inkluderer referansen til "en celle" en kombinasjon av to eller flere celler, og liknende.

10

Som anvendt heri vil "omtrent" bli forstått av personer innenfor dette fagområdet, og vil variere i en viss grad avhengig av sammenhengen hvor det blir anvendt. Dersom det er anvendelser av termen som ikke er klar for personer innenfor dette fagområdet, gitt sammenhengen hvor den blir anvendt, vil "omtrent" bety opp til pluss eller minus 10 % av den angitte verdi.

15

Som anvendt heri inkluderer "administrering" av et middel, medikament eller et peptid til et individ en hvilken som helst vei for introdusering eller levering til et individ en forbindelse for å utføre den omtalte funksjonen. Administreringen kan bli utført ved en hvilken som helst egnet vei, inkludert oralt, intraokulært, intranasalt, parenteralt (intravenøst, intramuskulært, intraperitonealt, eller subkutant), eller topisk. Administrering inkluderer selvadministrering og administrering av andre.

20

Som anvendt heri, inkluderer betegnelsen "aminosyre" naturlig forekommende aminosyrer og syntetiske aminosyrer, samt aminosyreanaloger og aminosyreetterlikninger som virker på en måte som likner de naturlig forekommende aminosyrene. Naturlig forekommende aminosyrer er de som blir kodet av den genetiske koden, samt de aminosyrene som senere blir modifisert, f.eks. hydrokstyprolin, γ -karboksylglutamat, og O-fosfoserin. Aminosyreanaloger refererer til forbindelser som har den samme grunnleggende kjemiske strukturen som en naturlig forekommende aminosyre, dvs. et α -karbon som er bundet til et hydrogen, en karboksylgruppe, en aminogruppe, og en R-gruppe, f.eks. homoserin, norleucin, metioninsulfoksid, metioninmetylsulfonium. Slike analoger har modifiserte R-grupper (f.eks. norleucin) eller modifiserte peptidskjelett, men beholder den samme grunnleggende kjemiske strukturen som en naturlig forekommende aminosyre.

Aminosyreetterlikninger refererer til kjemiske forbindelser som har en struktur som er forskjellig fra den generelle kjemiske strukturen til en aminosyre, men som virker på en måte som er lik en naturlig forekommende aminosyre. Aminosyrer kan bli referert

35

til heri ved enten deres vanlig kjente tre bokstavsymboler, eller ved én-bokstavsymboler anbefalt av IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Som anvendt heri angir betegnelsen "effektiv mengde" en mengde tilstrekkelig for å
 5 oppnå en ønsket terapeutisk og/eller profylaktisk effekt, f.eks. en mengde som resulterer i forebygging av, eller en reduksjon av, symptomene assosiert med den oftalmiske tilstanden. Mengden av en sammensetning administrert til individet vil avhenge av typen og hvor alvorlig sykdommen er, og av trekkene til individet, så som generell helsetilstand, alder, kjønn, kroppsvekt og toleranse overfor medikamenter.
 10 Det vil avhenge av grad, alvorlighet og type sykdom. Fagfolk innenfor dette området vil kunne bestemme hensiktsmessige doseringer avhengig av disse og andre faktorer. Sammensetningene kan også bli administrert i kombinasjon med én eller flere ytterligere terapeutiske forbindelser. I fremgangsmåtene beskrevet heri kan de aromatisk-kationiske peptidene bli administrert til et individ som har én eller flere tegn
 15 eller symptomer på en oftalmisk tilstand. For eksempel menes en "terapeutisk effektiv mengde" av de aromatisk-kationiske peptidene nivåene hvorved de fysiologiske effektene til en oftalmisk tilstand er, i et minimum, lindret.

Et "isolert" eller "renset" polypeptid eller peptid er vesentlig fri for cellulært materiale
 20 eller andre kontaminerende polypeptider fra cellen eller vevskilden hvorifra midlet er avledet, eller vesentlig fri for kjemiske forløpere eller andre kjemikalier når syntetisert kjemisk. For eksempel vil et isolert aromatisk-kationisk peptid være fri for materialer som vil interferere med de diagnostiske eller terapeutiske anvendelsene av midlet. Slike interfererende materialer kan inkludere enzymer, hormoner og andre
 25 proteinholdige og ikke-proteinholdige oppløste stoffer.

Som anvendt heri, blir betegnelsene "polypeptid", "peptid" og "protein" anvendt om hverandre heri, for å bety en polymer som omfatter to eller flere aminosyrer koblet til hverandre med peptidbindinger eller modifiserte peptidbindinger, dvs. peptidisosterer.
 30 Polypeptid refererer til både korte kjeder, vanlige referert til som peptider, glykopeptider eller oligomerer, og også lengre kjeder, generelt referert til som proteiner. Polypeptider kan inneholde aminosyrer forskjellig fra de 20 genkodede aminosyrene. Polypeptider inkluderer aminosyresekvenser modifisert enten ved naturlige prosesser, så som post-translasjonell prosessering, eller ved kjemiske
 35 modifikasjonsteknikker som er velkjente innenfor fagområdet.

Som anvendt heri, refererer betegnelsen "simultan" terapeutisk anvendelse til administreringen av minst to aktive ingredienser ved samme vei og samtidig eller vesentlig samtidig.

- 5 Som anvendt heri, angir betegnelsen "separat" terapeutisk anvendelse av en administrasjon av minst to aktive ingredienser samtidig eller vesentlig samme tidspunkt ved forskjellige veier.

- 10 Som anvendt heri, angir betegnelsen "sekvensiell" terapeutisk anvendelse administrering av minst to aktive ingredienser ved forskjellige tidspunkter, idet administreringsveien er identisk eller forskjellig. Mer spesielt refererer sekvensiell anvendelse hele administreringen av én av de aktive ingrediensene før administrering av den andre eller andre begynner. Det er dermed mulig å administrere én av de aktive ingrediensene over flere minutter, timer eller dager før administrering av det andre aktive ingredienset eller ingrediensene. Det er ingen simultan behandling i dette tilfellet.

- 20 Som anvendt heri, angir betegnelsene "behandling" eller "behandlingen" eller "lindring" både terapeutisk behandling og profylaktisk eller forebyggende tiltak, hvor hensikten er å forebygge eller redusere (gjøre mindre) den målsøkte patologiske tilstanden eller forstyrrelsen. Et individ blir vellykket "behandlet" for en oftalmisk tilstand dersom den etter mottak av en terapeutisk mengde av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge fremgangsmåtene beskrevet heri, individet viser observerbare og/eller målbar reduksjon i eller fravær av én eller flere tegn og symptomer på en oftalmisk tilstand. Det er også å bemerke at de forskjellige metodene for behandling eller forebygging av medisinske tilstander som beskrevet, er ment å være "vesentlige", som inkluderer total, men også mindre enn total behandling eller forebygging, og hvor et visst biologisk eller medisinsk relevant resultat blir oppnådd.

- 30 Som anvendt heri, refererer "forebygging" eller "forebyggende" av en forstyrrelse eller tilstand en forbindelse som, i en statistisk prøve, reduserer forekomsten av forstyrrelsen eller tilstanden i den behandlede prøven i forhold til en ubehandlet kontrollprøve, eller forsinker begynnelsen eller reduserer alvorligheten av ett eller flere symptomer på forstyrrelsen eller tilstanden i forhold til den ubehandlede kontrollprøven.

Aromatiske-kationiske peptider

Foreliggende teknologi vedrører behandling eller forebygging av en oftalmisk tilstand ved administrering av visse aromatisk-kationiske peptider. Uten å ønske å være begrenset av noen teori, kan aromatisk-kationiske peptider behandle eller forebygge oftalmiske sykdommer eller tilstander ved redusering av alvorligheten eller forekomsten av oksidativ skade i øyet. De aromatisk-kationiske peptidene er vannoppløselige og meget polare. Til tross for disse egenskapene, kan peptidene lett penetrere cellemembranene. De aromatisk-kationiske peptidene inkluderer typisk et minimum av tre aminosyrer eller minimum av fire aminosyrer, kovalentlig koblet av peptidbindinger. Det maksimale antall aminosyrer tilstede i de aromatisk-kationiske peptidene er omtrent 20 aminosyrer kovalentlig koblet av peptidbindinger. Fortrinnsvis er det maksimale antall aminosyrer omtrent tolv, mer foretrukket omtrent ni, og mest foretrukket omtrent seks.

Aminosyrene til de aromatisk-kationiske peptidene kan være en hvilken som helst aminosyre. Som anvendt heri blir betegnelsen "aminosyre" anvendt for å referere til et hvilket som helst organisk molekyl som inneholder minst én aminogruppe, og minst én karboksylgruppe. Typisk er minst én aminogruppe i α -posisjonen i forhold til en karboksylgruppe. Aminosyrene kan være naturlig forekommende. Naturlig forekommende aminosyrer inkluderer, f.eks., de tyve mest vanlige venstredreie (L) aminosyrer normalt funnet i pattedyrproteiner, dvs. alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), asparaginsyre (Asp), cystein (Cys), glutamin (Gln), glutaminsyre (Glu), glysin (Gly), histidin (His), isoleucin (Ile), leucin (Leu), lysin (Lys), metionin (Met), fenylalanin (Phe), prolin (Pro), serin (Ser), treonin (Thr), tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr), og valin (Val). Andre naturlig forekommende aminosyrer inkluderer, f.eks., aminosyrer som blir syntetisert i metabolske prosesser som ikke er assosiert med proteinsyntese. F.eks. blir aminosyrene ornitin og sitrullin syntetisert i pattedyrmetabolisme i løpet av produksjonen av urea. Et annet eksempel på en naturlig forekommende aminosyre inkluderer hydroksyprolin (Hyp).

Peptidene inneholder eventuelt én eller flere ikke-naturlig forekommende aminosyrer. Fortrinnsvis har peptidet ingen aminosyrer som er naturlig forekommende. Ikke-naturlig forekommende aminosyrer kan være venstredreie (L-), høyredreie (D-), eller blandinger derav. Ikke-naturlig forekommende aminosyrer er de aminosyrene som typisk ikke blir syntetisert i normale metabolske prosesser i levende organismer, og oppstår ikke naturlig i proteiner. I tillegg, blir de ikke-naturlig forekommende aminosyrene fortrinnsvis ikke gjenkjent av vanlige proteaser. De ikke-naturlig

forekommende aminosyrene kan være tilstede i en hvilken som helst posisjon i peptidet. For eksempel kan de ikke-naturlig forekommende aminosyrene være ved den N-terminale enden, C-terminale enden, eller ved en hvilken som helst posisjon mellom den N-terminale enden og C-terminale enden.

5

Ikke-naturlig forekommende aminosyrer kan f.eks. omfatte alkyl-, aryl- eller alkylarylgrupper som ikke finnes i naturlige aminosyrer. Noen eksempler på ikke-naturlige alkylaminosyrer inkluderer α -aminosmørsyre, β -aminosmørsyre, γ -aminosmørsyre, δ -aminovalerinsyre, og ϵ -aminokaproinsyre. Noen eksempler på ikke-naturlige arylaminosyrer inkluderer orto-, meta- og para-aminobenzosyre. Noen eksempler på ikke-naturlige alkylarylaminosyrer inkluderer orto-, meta- og para-aminofenyddiksyre, og γ -fenyl- β -aminosmørsyre. Ikke-naturlig forekommende aminosyrer inkluderer derivater av naturlig forekommende aminosyrer. Derivater av naturlig forekommende aminosyrer kan f.eks. inkludere tilsetning av én eller flere kjemiske grupper til den naturlig forekommende aminosyren.

15

For eksempel kan én eller flere kjemiske grupper bli tilsatt til én eller flere av 2'-, 3'-, 4'-, 5'- eller 6'-posisjonene av den aromatiske ringen til et fenylalanin eller tyrosinresidie, eller 4'-, 5'-, 6'- eller 7'-posisjonen av benzoringen til et tryptofanresidie. Gruppen kan være en hvilken som helst kjemisk gruppe som kan bli tilsatt til en aromatisk ring. Noen eksempler på slike grupper inkluderer forgrenet eller uforgrenet C₁-C₄-alkyl, så som metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, eller t-butyl, C₁-C₄-alkyloksy (dvs. alkoksy), amino, C₁-C₄-alkylamino og C₁-C₄-dialkylamino (f.eks. metylamino, dimetylamino), nitro, hydroksyl, halo (dvs. fluor, klor, brom eller jod). Noen spesifikke eksempler på ikke-naturlig forekommende derivater av naturlig forekommende aminosyrer inkluderer norvalin (Nva) og norleucin (Nle).

20

25

Et annet eksempel på en modifikasjon av en aminosyre i et peptid er derivatisering av en karboksylgruppe av en asparginsyre eller en glutaminsyrerest av peptidet. Ett eksempel på derivatisering er amidering med ammoniakk eller med et primært eller sekundært amin, f.eks. metylamin, etylamin, dimetylamino eller dietylamino. Et annet eksempel på derivatisering inkluderer forestring med f.eks. metyl eller etylalkohol. En annen slik modifikasjon inkluderer derivatisering av en aminogruppe av et lysin-, arginin- eller histidinresidie. For eksempel kan slike aminogrupper bli acylert. Noen egnede acylgrupper inkluderer f.eks. en benzylgruppe eller en alkanoylgruppe, omfattende hvilke som helst av C₁-C₄-alkylgruppene nevnt ovenfor, så som acetyl- eller propionylgruppe.

30

35

De ikke-naturlig forekommende aminosyrene er fortrinnsvis resistente, og mer foretrukket insensitive overfor vanlige proteaser. Eksempler på ikke-naturlig forekommende aminosyrer som er resistente eller insensitive overfor proteaser inkluderer den høyredreide (D-) formen av en hvilken som helst av overnevnte naturlig forekommende L-aminosyrene, samt L- og/eller D-ikke-naturlig forekommende aminosyrer. D-aminosyrene oppstår vanligvis ikke normalt i proteiner, til tross for at de er funnet i visse peptidantibiotika som blir syntetisert ved midler som er forskjellige fra det normale ribosomale proteinsyntesemaskineriet til cellene. Som anvendt heri, er D-aminosyrene betraktet å være ikke-naturlig forekommende aminosyrer.

For å minimalisere proteasesensitiviteten, bør peptidene ha mindre enn fem, fortrinnsvis mindre enn fire, mer foretrukket mindre enn tre, og mest foretrukket, mindre enn to tilgrensende L-aminosyrer gjenkjent av vanlige proteaser, uansett om aminosyrene er naturlige eller ikke-naturlig forekommende. Det er foretrukket at peptidet har kun D-aminosyrer, og ingen L-aminosyrer. Dersom peptidet inneholder proteasesensitive sekvenser av aminosyrene, er minst én av aminosyrene fortrinnsvis en ikke-naturlig forekommende D-aminosyre, for derved å tilveiebringe proteaseresistens. Et eksempel på en proteasesensitiv sekvens inkluderer to eller flere påfølgende basiske aminosyrer som lett blir spaltet av vanlige proteaser, så som endopeptidaser og trypsin. Eksempler på basiske aminosyrer inkluderer arginin, lysin og histidin.

De aromatisk-kationiske peptidene bør ha et minimalt antall av netto positive ladninger ved fysiologisk pH sammenliknet med det totale antallet aminosyreresidier i peptidet. Det minimale antallet av netto positive ladninger ved fysiologisk pH vil bli referert til nedenfor som (p_m). Det totale antall aminosyreresidier i peptidet vil bli referert til nedenfor som (r). Det minimale antallet av netto positive ladninger diskutert nedenfor er alle ved fysiologisk pH. Betegnelsen "fysiologisk pH" som anvendt heri, refererer til den normale pH i cellene til vevene og organene av pattedyrkroppen. Blant annet er den fysiologiske pH til et menneske normalt omtrent 7,4, mens normal fysiologisk pH i pattedyr kan være en hvilken som helst pH fra omtrent 7,0 til omtrent 7,8.

"Netto ladning" som anvendt heri, refererer til balansen av antallet positive ladninger, og antallet negative ladninger båret av aminosyrene tilstede i peptidet. I denne

beskrivelsen er det underforstått at nettoladninger blir målt ved fysiologisk pH. De naturlig forekommende aminosyrene som er positivt ladet ved fysiologisk pH, inkluderer L-lysin, L-arginin og L-histidin. De naturlig forekommende aminosyrene som er negativt ladet ved fysiologisk pH, inkluderer L-asparaginsyre og L-glutaminsyre.

Typisk har et peptid en positiv ladet N-terminal aminogruppe, og en negativt ladet C-terminal karboksylgruppe. Ladningene kansellerer hverandre ut ved fysiologisk pH. Som et eksempel på beregning av netto ladning, har peptidet Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg én negativt ladet aminosyre (dvs. Glu) og fire positivt ladede aminosyrer (dvs. to Arg-residier, ett Lys og ett His). Derfor har overnevnte peptid en netto positiv ladning på tre.

I én utførelsesform har de aromatisk-kationiske peptidene et forhold mellom det minimale antall av netto positive ladninger ved fysiologisk pH (p_m) og det totale antallet av aminosyreresidier (r), hvor $3p_m$ er det største antallet som er mindre enn eller lik $r + 1$. I denne utførelsesformen er forholdet mellom det minimale antallet av netto positive ladninger (p_m) og det totale antall aminosyreresidier (r) som følger:

Tabell 1. Aminosyreantall og netto positive ladninger ($3p_m \leq p+1$)

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

I en annen utførelsesform har de aromatisk-kationiske peptidene et forhold mellom det minimale antallet av netto positive ladninger (p_m) og det totale antallet av aminosyreresidier (r), hvor $2p_m$ er det største antallet som er mindre enn eller lik $r + 1$. I denne utførelsesformen er forholdet mellom det minimale antall av netto positive ladninger (p_m) og det totale antall aminosyreresidier (r) som følger:

Tabell 2. Aminosyreantall og netto positive ladninger ($2p_m \leq p+1$)

(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

I én utførelsesform er det minimale antallet netto positive ladninger (p_m) og det totale antall aminosyreresidier (r) like. I en annen utførelsesform har peptidene tre eller fire

aminosyreresidier og et minimum av én netto positiv ladning, fortrinnsvis, et minimum av to netto positive ladninger, og mer foretrukket et minimum av tre netto positive ladninger.

- 5 Det er også viktig at de aromatisk-kationiske peptidene har et minimumsantall av aromatiske grupper sammenliknet med det totale antall av netto positive ladninger (p_t). det minimale antall av aromatiske grupper vil bli referert til nedenfor som (a). Naturlig forekommende aminosyrer som har en aromatisk gruppe inkluderer aminosyrene histidin, tryptofan, tyrosin og fenylalanin. For eksempel har
- 10 heksapeptidet Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp en netto positiv ladning på to (gitt av lysin og argininresidiene), og tre aromatiske grupper (gitt av tyrosin-, fenylalanin- og tryptofanresidiene).

- 15 De aromatisk-kationiske peptidene bør også ha et forhold mellom det minimale antall aromatiske grupper (a) og det totale antallet netto positive ladninger ved fysiologisk pH (p_t) hvor $3a$ er det største antallet som er mindre enn eller lik $p_t + 1$, med unntakelse av at når p_t er 1, kan a også være 1. I denne utførelsesformen er forholdet mellom det minimale antallet av aromatiske grupper (a) og det totale antall netto positive ladninger (p_t) som følger:

20

Tabell 3. Aromatiske grupper og netto positive ladninger ($3a \leq p_t + 1$ eller $a = p_t = 1$)

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

- 25 I en annen utførelsesform har de aromatisk-kationiske peptidene et forhold mellom det minimale antall aromatiske grupper (a) og det totale antall netto positive ladninger (p_t) hvor $2a$ er det største antall som er mindre enn eller til $p_t + 1$. I denne utførelsesformen er forholdet mellom det minimale antall aromatiske aminosyreresidier (a) og det totale antall netto positive ladninger (p_t) som følger:

- 30 **Tabell 4. Aromatiske grupper og netto positive ladninger ($2a \leq p_t + 1$ eller $a = p_t = 1$)**

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

I en annen utførelsesform er antallet aromatiske grupper (a) og det totale antallet netto positive ladninger (p_t) like.

Karboksylder, spesielt den terminale karboksylgruppen til en C-terminal
 5 aminosyre, er fortrinnsvis amidert med, f.eks., ammoniakk for å danne det C-terminale amidet. Alternativt kan den terminale karboksylgruppen til den C-terminale aminosyren bli amidert med et hvilket som helst primært eller sekundært amin. Det primære eller sekundære aminet kan f.eks. være en alkyl, spesielt en forgrenet eller ikke-forgrenet C_1 - C_4 -alkyl, eller et arylamin. Følgelig kan aminosyren ved den C-
 10 terminale enden av peptidet bli omdannet til en amido, N-metylamido, N-etylamido, N,N-dimetylamido, N,N-dietylamido, N-metyl-N-etylamido, N-fenylamido eller N-efnyl-N-etylamidogruppe. De frie karboksylatgruppene til asparagin, glutamin, asparaginsyre og glutaminsyreresidier som ikke oppstår ved den C-terminale enden av de aromatisk-kationiske peptidene kan også bli amidert, hvor enn de oppstår innenfor peptidet.
 15 Amidering ved disse indre posisjonene kan være med ammoniakk, eller hvilke som helst av de primære eller sekundære aminene beskrevet ovenfor.

I én utførelsesform er det aromatisk-kationiske peptidet et tripeptid som har to netto positive ladninger, og minst én aromatisk aminosyre. I en spesiell utførelsesform er
 20 det aromatisk-kationiske peptidet et tripeptid som har to netto positive ladninger, og to aromatiske aminosyrer.

Aromatisk-kationiske peptider inkluderer, men er ikke begrenset til, følgende peptideksempler:

25 Lys-D-Arg-Tyr-NH₂
 Phe-D-Arg-His
 D-Tyr-Trp-Lys-NH₂
 Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂
 30 Tyr-His-D-Gly-Met
 Phe-Arg-D-His-Asp
 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂
 Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg
 D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg
 35 Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂
 Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His
 Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂

Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂
 Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys
 Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂
 Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys
 5 Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂
 D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂
 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-NH₂
 10 Phe-Try-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-NH₂
 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-NH₂
 15 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-NH₂
 Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-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-
 20 Arg-Tyr-Lys-NH₂

I én utførelsesform har et peptid som har mu-opioidreseptoragonistaktivitet formelen
 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (referert til heri som "SS-01"). SS-01 har en netto positiv
 ladning på tre, bidratt av aminosyrene tyrosin, arginin og lysin, og har to aromatiske
 25 grupper gitt av aminosyrene fenylalanin og tyrosin. Tyrosinet til SS-01 kan være et
 modifisert derivat av tyrosin, så som 2',6'-dimetyltyrosin for å produsere forbindelsen
 som har formelen 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (referert til heri som "SS-02"). SS-02
 har en molekylvekt på 640, og bærer en netto tre positiv ladning ved fysiologisk pH.
 SS-02 penetrerer lett plasmamembranen til flere pattedyrcelletyper på en
 30 energiavhengig måte (Zhao et al., *J. Pharmacol Exp Ther.* 304: 425-432, 2003).

Peptider som ikke har mu-opioidreseptoragonistaktivitet har generelt ikke et
 tyrosinresidie eller et derivat av tyrosin ved den N-terminale enden (dvs.
 aminosyreposisjon 1).

35

Aminosyren ved den N-terminale enden kan være en hvilken som helst naturlig
 forekommende eller ikke-naturlig forekommende aminosyre forskjellig fra et tyrosin. I

én utførelsesform er aminosyren ved den N-terminale enden fenylalanin eller derivat derav. Eksempelvisse derivater av fenylalanin inkluderer 2'-metylfenylalanin (Mmp), 2',6'-dimetylfenylalanin (2',6'-Dmp), N,2',6'-trimetylfenylalanin (Tmp), og 2'-hydroksy-6'-metylfenylalanin (Hmp).

5

Et eksempel på et aromatisk-kationisk peptid som ikke har mu-opioidreseptoragonistaktivitet har formelen Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (referert til heri som "SS-20"). Alternativt kan N-terminal fenylalanin være et derivat av fenylalanin så som 2',6'-dimetylfenylalanin (2',6'-Dmp). SS-01 inneholdende 2',6'-dimetylfenylalanin ved aminosyreposisjon 1, har formelen 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂. I én utførelsesform er aminosyresekvensen til SS-02 rearrangert slik at Dmt ikke er ved den N-terminale enden. Et eksempel på et slikt aromatisk-kationisk peptid som ikke har mu-opioidreseptoragonistaktivitet, har formelen D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31).

15

SS-01, SS-20, SS-31 og deres derivater, kan videre inkludere funksjonelle analoger. Et peptid er betraktet å være en funksjonell analog av SS-01, SS-20 eller SS31, dersom analogen har samme funksjon som SS-01, SS-20 eller SS-31. Analogen kan f.eks. være en substitusjonsvariant av SS-01, SS-20 eller SS-31, hvor én eller flere aminosyrer er substituert med en annen aminosyre.

20

Egnede substitusjonsvarianter av SS-01, SS-20 eller SS31 inkluderer konservative aminosyresubstitusjoner. Aminosyrer kan bli gruppert ifølge deres fysiologiske karaktertrekk som følger:

25

- (a) Upolare aminosyrer: Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C);
- (b) Sure aminosyrer: Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);
- (c) Basiske aminosyrer: His(H) Arg(R) Lys(K);
- (d) Hydrofobe aminosyrer: Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V); og
- (e) Aromatiske aminosyrer: Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His(H).

30

Substitusjoner av en aminosyre i et peptid med en annen aminosyre i den samme gruppen blir referert til som en konservativ substitusjon, og kan konservere de fysiokjemiske karaktertrekkene til det opprinnelige peptidet. I kontrast til dette, er substitusjoner av en aminosyre i et peptid med en annen aminosyre i en annen gruppe generelt mer sannsynlig å endre karaktertrekkene til det opprinnelige peptidet.

35

I noen utførelsesformer har det aromatisk-kationiske peptidet en formel som vist i tabell 5.

Tabell 5. Peptidanaloger med Mu-opioidaktivitet

Aminosyre-posisjon 1	Aminosyre-posisjon 2	Aminosyre-posisjon 3	Aminosyre-posisjon 4	C-terminal modifikasjon
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-dns	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys NH(CH ₂) ₂ -NH-atn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-aminoheptansyre)	NH ₂
Bio-2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap	NH ₂

2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn	NH ₂

3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg	NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn	NH ₂

Hmt	D-Arg	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg	NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg	NH ₂

Dab = diaminosmørsyre

Dap = diaminopropionsyre

Dmt = dimetyltyrosin

5 Mmt = 2'-metyltyrosin

Tmt = N, 2',6'-trimetyltirosin

Hmt = 2'-hydroksy,6'-metyltirosin

dnsDap = β -dansyl-L- α,β -diaminopropionsyre

atnDap = β -antraniloyl-L- α,β -diaminopropionsyre

5 Bio = biotin

Eksempler på andre aromatisk-kationiske peptide som ikke aktiverer mu-opioidreseptorer inkluderer, men er ikke begrenset til, de aromatisk-kationiske peptidene vist i tabell 6.

10

Tabell 6. Peptidanaloger som mangler Mu-opioidaktivitet

Aminosyre posisjon 1	Aminosyre posisjon 2	Aminosyre posisjon 3	Aminosyre posisjon 4	C-terminal modifikasjon
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys	NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt	NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys	NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe	NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt	NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg	NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt	NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys	NH ₂
Phe	Dmt	Lys	D-Arg	NH ₂
Lys	Phe	D-Arg	Dmt	NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg	NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe	NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg	NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt	NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr	NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp	NH ₂

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

Cha = sykloheksylalanin

Aminosyrene til peptidene vist i tabell 5 og 6 kan være i enten L- eller D-konfigurasjon.

5

Peptidene kan bli syntetisert ved hvilke som helst av metodene som er velkjente innenfor fagområdet. Egnede metoder for kjemisk syntetisering av proteinet inkluderer, f.eks., de som er beskrevet av Stuart og Young i *Solid Phase Peptide Synthesis*, andre utgave, Pierce Chemical Company (1984), og i *Methods Enzymol.* 289, Academic Press, Inc., New York (1997).

10

Profylaktiske og terapeutiske anvendelser av aromatisk-kationiske peptider

De aromatisk-kationiske peptidene beskrevet heri er nyttige for å forebygge eller behandle sykdom. Spesielt tilveiebringer beskrivelsen både profylaktiske og terapeutiske metoder for behandling av et individ med risiko for (eller mottakelig for) en oftalmisk sykdom eller tilstand. Følgelig tilveiebringer fremgangsmåtene beskrevet heri forebygging og/eller behandling av en oftalmisk tilstand i et individ ved administrering av en effektiv mengde av et aromatisk-kationisk peptid til et individ som trenger det. For eksempel kan individet bli administrert aromatiske-kationiske peptidsammensetninger i et forsøk på å forbedre én eller flere av faktorene som bidrar til en oftalmisk sykdom eller tilstand.

15

20

Ett aspekt av teknologien inkluderer metoder for å redusere en oftalmisk tilstand til et individ for terapeutiske formål. I terapeutiske applikasjoner blir sammensetninger eller medikamenter administrert til et individ mottakelig for, eller som allerede lider av en

25

slik sykdom i en mengde som er tilstrekkelig for å helbrede, eller i det minste delvis hemme, symptomene på sykdom, inkludert komplikasjonene og mellomliggende patologiske fenotyper ved utvikling av sykdommen. Følgelig tilveiebringer beskrivelsen metoder for behandling av et individ påvirket av en oftalmisk tilstand. I noen

5 utførelsesformer tilveiebringer teknologien en metode for behandling eller forebygging av spesifikke oftalmiske forstyrrelser, så som diabetisk retinopati, katarakter, retinitt pigmentosa, glaukom, koroidal neovaskularisering, netthindegenerasjon, og oksygenindusert retinopati i et pattedyr ved administrering av et aromatisk kationisk peptid.

10 I én utførelsesform blir det aromatiske-kationiske peptid administrert til et individ for å behandle eller forebygge diabetisk retinopati. Diabetisk retinopati er karakterisert ved kapillær mikroanerysmer og flekkhemorragier. Deretter forårsaker mikrovaskulære obstruksjoner dannelse av "cotton wool" flekker på netthinnen. Videre

15 kan netthinneødem og/eller harde ekstrudater dannes i individer med diabetisk retinopati grunnet øket vaskulær hyperpermeabilitet. Deretter fremkommer neovaskularisering, og netthinneløsning blir forårsaket ved traksjon av bindevevet som vokser inn i glasslegemet ("vitreous body"). Iris rubeosis og neovaskulært glaukom kan også oppstå, som igjen kan føre til blindhet. Symptomer på diabetisk

20 retinopati inkluderer, men er ikke begrenset til, vanskeligheter med lesing, utydelig syn, plutselig tap av syn i det ene øyet, ser ringer rundt lys, ser svarte flekker og/eller ser blinkende lys.

I én utførelsesform blir et aromatisk-kationisk peptid administrert til et individ for å

25 behandle eller forebygge katarakter. Katarakter er en kongenital eller ervervet sykdom kjennetegnet ved en reduksjon i naturlig linseklarhet. Individer med katarakter kan utvise ett eller flere symptomer, inkludert, men ikke begrenset til, slørethet på overflaten av linsen, slørethet på innsiden av linsen, og/eller svelling av linsen. Typiske eksempler på kongenital kataraktassosierte sykdommer er

30 pseudokatarakter, membrankatarakter, hornhinnekatarakter, lamellære katarakter, punktuatkatarakter, og filamentære katarakter. Typiske eksempler på ervervede kataraktassosierte sykdommer er geriatriske katarakter, sekundære katarakter, "browning katarakter", kompliserte katarakter, diabetiske katarakter og traumatiske katarakter. Ervervede katarakter er også induserbare ved elektrisk sjokk, bestråling,

35 ultralyd, medikamenter, systemiske sykdommer, og næringsmessige forstyrrelser. Ervervede katarakter inkluderer videre postoperative katarakter.

- I én utførelsesform blir det aromatisk-kationiske peptidet administrert til et individ for å behandle eller forebygge retinitt pigmentosa. Retinitt pigmentosa er en forstyrrelse som er karakterisert ved stav og/eller stavcelleskade. Tilstedeværelse av mørk linje i netthinnen er typisk hos individer som lider av retinitt pigmentosa. Individer med
- 5 retinitt pigmentosa som også har forskjellige symptomer inkluderer, men er ikke begrenset til, hodepine, nummenhet eller prikking i ekstremiteter, lysblink og/eller visuelle forandringer. Se f.eks. Heckenlively et al., *Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. Am J Ophthalmol.* 105(5): 504-511 (1988).
- 10 I én utførelsesform blir et aromatisk-kationisk peptid administrert til et individ for å behandle eller forebygge glaukom. Glaukom er en genetisk sykdom kjennetegnet ved en økning i det intraokulære trykket, som fører til en reduksjon i synet. Glaukom kan komme fra forskjellige oftalmiske tilstander som allerede er tilstede i et individ, så som sår, kirurgi, og andre strukturelle malformasjoner. Til tross for at glaukom kan
- 15 oppstå ved en hvilken som helst alder, kommer det ofte hos eldre individer, og fører til blindhet. Glaukompasienter har typisk et intraokulært trykk over 21 mmHg. Derimot kan normal tensjon glaukom, hvor glaukomatøse endringer finnes i det visuelle området og optisk papilla, bestå i fravær av et slikt forøket intraokulært trykk, dvs. høyere enn 21 mmHg. Symptomer på glaukom inkluderer, men er ikke begrenset
- 20 til, uklart syn, alvorlig øyesmerte, hodepine, det å se ringer rundt lys, kvalme og/eller oppkast.
- I én utførelsesform blir et aromatisk-kationisk peptid administrert til et individ for å behandle eller forebygge makulær degenerasjon. Makulær degenerasjon er typisk en
- 25 aldersrelatert sykdom. De generelle kategorier av makulær degenerasjon inkluderer våt, tørr og ikke-aldersrelatert makulær degenerasjon. Tørr makulær degenerasjon, som oppstår i omtrent 80-90 % av alle tilfellene, er også kjent som atropisk, ikke-eksudativ, eller drusenoid makulær degenerasjon. Med tørr makulær degenerasjon akkumulerer typisk druser under netthinnepigmentepitellev. Deretter følger synstap
- 30 når drusen interfererer med funksjonen til fotoreseptorer i makula. Symptomer på tørr makulær degenerasjon inkluderer, men er ikke begrenset til, utydelig syn, midtsynsvikt, lys- eller mørkeavvik, og/eller forandringer i opplevelse av farge. Tørr makulær degenerasjon kan resultere i gradvis tap av synet.
- 35 Våt makulær degenerasjon er også kjent som neovaskularisering, subretinal neovaskularisering, eksudativ eller diskiform degenerasjon. Med våt makulær degenerasjon, vokser unormale blodårer under makula. Blodårene lekker væske inn i

makula, og skader fotoreseptorcellene. Våt makulær degenerasjon kan utvikle seg hurtig, og forårsake alvorlig skade på sentralsynet. Våt og tørr makulær degenerasjon har identiske symptomer. Ikke-aldersrelatert makulær degenerasjon er derimot sjeldent, og kan være koblet til arvelighet, diabetes, næringsmessige mangler, skade, infeksjon eller andre faktorer. Symptomer på ikke-aldersrelatert makulær degenerasjon inkluderer også, men er ikke begrenset til, mangelfullt syn, sentersynsvikt, lys- eller mørgesvikt, og/eller forandringer i opplevelse av farge.

I én utførelsesform blir det ariomatisk-kationiske peptidet administrert til et individ for å behandle eller forebygge koroidal neovaskularisering. Koroidal neovaskularisering (CNV) er en sykdom karakterisert ved utvikling av nye blodårer i choroidlaget til øyet. De nylig dannede blodcellene vokser i choroide, gjennom Bruch-membranen, og invaderer det subretinale rommet. CNV kan føre til reduksjon av syn, eller fullstendig tap av syn. Symptomer på CNV inkluderer, men er ikke begrenset til, det å se flakkende, blinkende lys, eller grå flekker i det påvirkede øyet eller øynene, utydelig syn, redusert syn og/eller tap av syn.

I én utførelsesform blir det aromatisk-kationiske peptidet administrert til et individ for å behandle eller forebygge netthinne degenerasjon. Netthinne degenerasjon er en genetisk sykdom som er relatert til nedbrytning av netthinnen. Netthinnevevet kan degenereres av forskjellige grunner så som, arterie- eller veneokklusjon, diabetisk retinopati, retinopati ved premature tilfeller, og/eller retrolental fibroplasi. Retinal degenerasjon inkluderer generelt retinoschisis, "lattice" degenerasjon, og er relatert til progressiv makulær degenerasjon. Symptomene på netthinne degradering inkluderer, men er ikke begrenset til, redusert syn, tap av syn, nattblindhet, tunnelsyn, tap av perifert syn, netthinneløsning og/eller lyssensitivitet.

I én utførelsesform blir et aromatisk-kationisk peptid administrert til et individ for å behandle eller forebygge oksygenindusert retinopati. Oksygenindusert retinopati (OIR) er en sykdom kjennetegnet ved mikrovaskulær degenerasjon. OIR er en etablert modell for studering av retinopati ved prematurhet. OIR er assosiert med vaskulær celledskade som kulminerer i unormal neovaskularisering. Mikrovaskulær degenerasjon fører til ischemi, som bidrar til de fysiske forandringene assosiert med OIR. Oksidativt stress spiller også en viktig rolle i vasoobliterasjon av OIR hvor endotelcellene er mottakelige for peroksidativ skade. Pericytter, glatte muskelceller, og perivaskulære astrocytter er derimot generelt resistente overfor peroksidativ skade. Se f.eks. Beuchamp et al., *Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in*

oxygen-induced retinopathy, J Appl Physiol. 90: 2279-2288 (2001). OIR, inkludert retinopati ved prematuritet, er generelt asymptomatisk. Derimot kan øyebevegelser, kryssede øyne, alvorlig nærsynthet og/eller leukokoria, være tegn på OIR eller retinopati ved prematuritet.

5

Oppfinnelsen tilveiebringer et peptid representert ved formel D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ eller Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ for anvendelse ved behandling eller forebygging av en oftalmisk tilstand, hvor den oftalmiske tilstanden er valgt fra gruppen bestående av: retinitt pigmentosa, koroidal neovaskularisering, og oksygenindusert retinopati.

10

Individer med risiko for en oftalmisk tilstand kan bli identifisert ved f.eks. hvilken som helst eller en kombinasjon av diagnostiske eller prognostiske analyser som beskrevet heri. I profylaktiske applikasjoner blir farmasøytiske sammensetninger eller medikamenter av aromatisk-kationiske peptider administrert til et individ som er mottakelig for, eller på annen måte har risiko for en sykdom eller tilstand i en mengde som er tilstrekkelig for å eliminere eller redusere risikoen, gjøre alvorlighetsgraden mindre, eller forsinke begynnelsen av sykdommen, inkludert biokjemiske, histologiske og/eller atferdsmessige symptomer på sykdom, dets komplikasjoner og mellomliggende patologiske fenotyper tilstede i løpet av utviklingen av sykdommen. Administrering av en profylaktisk aromatisk-kationisk kan oppstå før manifestering av symptomene karakteristiske for avvik, så som med sykdom eller forstyrrelse blir forebygget eller alternativt forsinket i progresjonen derav. Avhengig av type avvik, kan f.eks. et aromatisk-kationisk peptid som virker slik at det forøker eller forbedrer mitokondriefunksjonen, eller reduserer den oksidative skaden, bli anvendt for å behandle individet. Den hensiktsmessige forbindelsen kan bli bestemt basert på

15

20

25

Bestemmelse av den biologiske effekten til aromatisk-kationisk peptidbasert

terapeutisk middel. I forskjellige utførelsesformer blir egnede in vitro eller in vivo analyser utført for å bestemme effekten av et spesifikt aromatisk-kationisk

30

peptidbasert terapeutisk middel, og om administrering derav er indikert for behandling. I forskjellige utførelsesformer kan in vitro analyser bli utført med representative celler av type(r) involvert i individets forstyrrelse, for å bestemme om et gitt aromatisk-kationisk peptidbasert terapeutisk middel utøver den ønskede effekten på celletypen(e). Forbindelser for anvendelse i terapi kan bli testet i egnede dyremodellsystemer inkludert, men ikke begrenset til, rotter, mus, kyllinger, kuer, aper, kaniner og liknende, før testing i humane individer. Likeledes, for in vivo testing, kan hvilke som helst av dyremodellsystemet kjent innenfor fagområdet bli anvendt før

35

administrering til humane individer. I én utførelsesform vil administreringen av et aromatisk-kationisk peptid til et individ som utviser symptomer assosiert med en oftalmisk tilstand forårsake en forbedring i ett eller flere av disse symptomene.

5 **Metoder for administrering av effektive doseringer**

En hvilken som helst metode kjent for fagfolk innenfor dette området for kontakting av en celle, et organ, eller vev med et peptid, kan bli anvendt. Egnede metoder inkluderer in vitro, ex vivo eller in vivo metoder. In vivo metoder inkluderer typisk administrering av et aromatisk-kationisk peptid, så som de beskrevet ovenfor, til et pattedyr, fortrinnsvis et menneske. Når anvendt in vivo for terapi, blir de aromatisk-kationiske peptidene administrert til individet i effektive mengder (dvs. mengder som har ønsket terapeutisk effekt). Dosen og doseringsregimet vil avhengig av graden av den oftalmiske tilstanden i individet, karaktertrekkene ved det bestemte aromatisk-kationiske peptidet som blir anvendt, f.eks., dets terapeutiske indeks, individ og individets historie.

Den effektive mengden kan bli bestemt i løpet av de pre-kliniske forsøkene og kliniske forsøk ved metoder kjente for leger og klinikere. En effektiv mengde av et peptid nyttig i fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, fortrinnsvis i en farmasøytisk sammensetning, kan bli administrert til et pattedyr som trenger det, ved hvilke som helst av et antall velkjente metoder for administrering av farmasøytiske sammensetninger. I noen utførelsesformer kan peptidet bli administrert systemisk, topisk eller intraokulært.

De aromatisk-kationiske peptidene beskrevet heri kan bli inkorporert i de farmasøytiske sammensetningene for administrering, enkeltvis eller i kombinasjon, til et individ for behandling eller forebygging av en forstyrrelse beskrevet heri. Slike sammensetninger inkluderer typisk det aktive midlet og en farmasøytisk akseptabel bærer. Som anvendt heri, angir betegnelsen "farmasøytisk akseptabel bærer" saltvann, løsningsmidler, dispersjonsmedium, belegg, antibakterielle og anti-soppmidler, isotopniske og absorpsjonsforsinkende midler, og liknende, kompatible med farmasøytisk administrering. Videre kan tilleggsaktive forbindelser også bli inkorporert i sammensetningene.

Farmasøytiske sammensetninger blir typisk formulert for å være kompatible med den antatte administreringsveien. Eksempler på administreringsveier inkluderer parenteral (f.eks. intravenøs, intradermal, intraperitoneal eller subkutan), oral, inhalering,

transdermal (topisk), intraokulær, iontoforetisk og transmukosal administrering. Løsninger eller suspensjoner anvendt for parenteral, transdermal eller subkutan applikasjon kan inkludere følgende komponenter: sterilt fortynningsmiddel så som vann for injeksjon, saltvannsløsning, fikserte oljer, polyetylenglykoler, glyserin, propylenglykol, eller andre syntetiske løsningsmidler; antibakterielle midler så som benzylalkohol eller metylparabener; antioksidanter så som askorbinsyre eller natriumbisulfitt; gelateringsmidler så som etylendiamintetraeddiksyre; buffere så som acetater, sitrater eller fosfater, og midler for justering av tonisiteten så som natriumklorid eller dekstrose. pH kan bli justert med syrer eller baser, så som saltsyre eller natriumhydroksid. Den parenterale prepareringen kan bli innesluttet i ampuller, engangssprøyter eller multippel dosebeholdere dannet av glass eller plast. For hensiktsmessighet til pasienten eller behandlende lege, kan doseringsformuleringen bli tilveiebrakt i et sett inneholdende alt nødvendig utstyr (f.eks. beholdere med medikament, beholdere med fortynningsmiddel, sprøyter og nåler) for et behandlingsformål.

Farmasøytiske sammensetninger egnet for injiserbar bruk, kan inkludere sterile vandige løsninger (hvor vannoppløselig) eller dispersjoner og sterile pulvere for den ekstemporære prepareringen av sterile injiserbare løsninger eller dispersjon. For intravenøs administrering inkluderer egnede bærere fysiologisk saltvann, bakteriostatisk vann, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) eller fosfatbufret saltvann (PBS). I alle tilfellene må en sammensetning for parenteral administrering være steril, og bør være fluid i den grad at det oppnås lett sprøytbarhet. Den bør være stabil under betingelser for fremstilling og lagring, og må være bevart overfor den kontaminerende virkningen av mikroorganismer så som bakterier og sopp.

De aromatisk-kationiske peptidsammensetningene kan inkludere en bærer, som kan være et løsningsmiddel eller dispersjonsmedium inneholdende, f.eks., vann, etanol, polyol (for eksempel glyserol, propylenglykol og flytende polyetylenglykol, og liknende), og egnede blandinger derav. Den viktige fluiditeten kan bli opprettholdt, f.eks., ved anvendelse av et belegg som lecitin, ved opprettholdelse av den nødvendige partikkelstørrelsen når det gjelder dispersjon, og ved anvendelse av overflateaktive midler. Forebygging av virkningen av mikroorganismer kan bli oppnådd ved forskjellige antibakterielle og antisoppmidler, f.eks., parabener, klorbutanol, fenol, askorbinsyre, tiomerasol og liknende. Glutation og andre antioksidanter kan bli inkludert for å forebygge oksidasjon. I mange tilfeller kan det være ønskelig å inkludere isotone midler, f.eks. sukre, polyalkoholer så som mannitol, sorbitol eller

natriumklorid i sammensetningen. Forlenget absorpsjon av de injiserbare sammensetningene kan bli oppnådd ved inkludering i sammensetningen et middel som forsinket absorpsjon, for eksempel, aluminiummonostearat eller gelatin.

5 Sterile injiserbare løsninger kan bli dannet ved inkorporering av den aktive forbindelsen i den nødvendige mengden i et hensiktsmessig løsningsmiddel med én eller en kombinasjon av ingredienser angitt ovenfor, etter behov, etterfulgt av filtersterilisering. Generelt blir dispersjoner dannet ved inkorporering av den aktive forbindelsen inn i en steril bærer, som inneholder et grunnleggende
10 dispersjonsmedium og de nødvendige andre ingrediensene fra de som er angitt ovenfor. Når det gjelder sterile pulvere for fremstilling av sterile injiserbare løsninger, inkluderer typiske metoder for fremstilling vakuumtørking og frysetørking, som kan tilveiebringe et pulver av det aktive ingredienset pluss et hvilket som helst ytterligere ønsket ingrediens fra en tidligere sterilfiltrert løsning derav.

15 For oftalmiske applikasjoner blir den terapeutiske forbindelsen formulert i løsninger, suspensjoner, og salver hensiktsmessig for anvendelse i øyet. For oftalmiske formuleringer generelt, se Mitra (red.), *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. (1993) og også Havener, W. H., *Ocular Pharmacology*, C.
20 V. Mosby Co., St. Louis (1983). Oftalmiske farmasøytiske sammensetninger kan bli tilpasset for topisk administrering til øyet i form av løsninger, suspensjoner, salver, kremer eller som et faststoffinnskudd. For en enkeltdose kan fra mellom 0,1 ng til 5000 µg, 1 ng til 500 µg, eller 10 ng til 100 µg av de aromatisk-kationiske peptidene bli applisert på det menneskelige øyet.

25 Den oftalmiske prepareringen kan inneholde ikke-toksiske tilleggssubstanser så som antibakterielle komponenter som er ikke-skadelige ved bruk, f.eks., timerosal, benzalkoniumklorid, metyl- og propylparaben, benzyldodeciniumbromid, benzyalkohol, eller fenyletanol; buffringsingredienser så som natriumklorid,
30 natriumborat, natriumacetat, natriumcitrat eller glukonatbuffere; og andre konvensjonelle ingredienser så som sorbitanmonolaurat, trietanolamin, polyoksyetylsorbitanmonopalmitat, etylendiamintetraeddiksyre, og liknende.

Den oftalmiske løsningen eller suspensjonen kan bli administrert så ofte som
35 nødvendig for å opprettholde et akseptabelt nivå av det aromatisk-kationiske peptidet i øyet. Administrering til pattedyrøyet kan foregå omtrent én eller to ganger daglig.

Orale sammensetninger inkluderer generelt et inert løsningsmiddel eller en spiselig bærer. For formålet med oral terapeutisk administrering kan den aktive forbindelsen bli inkorporert med eksipienter, og anvendt i form av tabletter, trosjeer eller kapsler, f.eks. gelatinkapsler. Farmasøytisk kompatible bindingsmidler og/eller adjuvante materialer kan bli inkludert som del av sammensetningen. Tabletter, piller, kapsler, trosjeer og liknende kan inneholde hvilke som helst av følgende ingredienser, eller forbindelser med den liknende natur: et bindemiddel så som mikrokrystallinsk cellulose, gummitragakant eller gelatin; en eksipient så som stivelse eller laktose, et oppløsningsmiddel så som alginsyre, primogel eller maisstivelse; et smøremiddel så som magnesiumstearat eller sterotes; et glidemiddel så som kolloidal silisiumdioksid; et søtningsmiddel så som sukrose eller sakkarin; eller et smaksmiddel så som peppermynte, metylsalisylat eller appelsinsmak.

For administrering ved inhalering, kan forbindelsene bli levert i form av en aerosolspray fra en trykkbelastet beholder eller dispenser som inneholder et egnet drivmiddel, f.eks. en gass, så som karbondioksid, eller en forstøver. Slike metoder inkluderer de som er beskrevet i US patent nr. 6 468 798.

Systemisk administrering av en terapeutisk forbindelse som beskrevet heri kan også være ved transmukosale eller transdermale metoder. For transmukosal eller transdermal administrering, kan penetreringsmidler hensiktsmessig for barriere som skal bli gjennomtrengt bli anvendt i formuleringen. Slike penetreringsmidler er generelt kjent innenfor fagområdet, og inkluderer, f.eks., for transmukosal administrering, detergenter, gallesalter og fusidinsyrederivater. Transmukosal administrering kan bli oppnådd gjennom anvendelse av nasalsprayer. For transdermal administrering blir de aktive forbindelsene formulert i salver, geler eller kremer, som generelt kjent innenfor fagområdet. I én utførelsesform kan transdermal administrering bli utført ved iontoforese.

Et terapeutisk protein eller peptid kan bli formulert i et bærersystem. Bæreren kan være et kolloidalt system. Det kolloidale systemet kan være et liposom, et fosfolipidbilagbærer. I én utførelsesform blir det terapeutiske peptidet innkapslet i et liposom, mens peptidintegriteten opprettholdes. Som kjent for fagfolk innenfor dette området, er det mange forskjellige metoder for å fremstille liposomer. (Se Lichtenberg et al., *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462 (1988); Anselem et al., *Liposome Technology*, CRC Press (1993)). Liposomale formuleringer kan forsinke fjerning og øke cellulært opptak (se Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8): 915-923 (2000)). Et aktivt

middel kan også bli applisert på en partikkel dannet fra farmasøytisk akseptable ingredienser inkludert, men ikke begrenset til, oppløselige, uoppløselige, permeable, impermeable, biodegraderbare eller gastroretentive polymerer eller liposomer. Slike partikler inkluderer, men er ikke begrenset til, nanopartikler, biodegraderbare nanopartikler, mikropartikler, biodegraderbare mikropartikler, nanosfærer, biodegraderbare nanosfærer, mikrosfærer, biodegraderbare mikrosfærer, kapsler, emulsjoner, liposomer, miceller og virale vektorsystemer.

Bæreren kan være en polymer, f.eks. en biodegraderbar, biokompatibel polymermatriks. I én utførelsesform kan det terapeutiske peptidet være innesluttet i polymermatriksen, mens proteinintegriteten opprettholdes. Polymeren kan være naturlig, så som polypeptider, proteiner eller polysakkarider, eller syntetisk, så som poly- α -hydrokysyrer. Eksempler inkluderer bærere dannet av f.eks. kollagen, fibronectin, elastin, celluloseacetat, cellulosenitrat, polysakkarid, fibrin, gelatin, og kombinasjoner derav. I én utførelsesform er polymeren polymelkesyre (PLA) eller kopoly melke/glykolsyre (PGLA). Polymermatriksen kan bli dannet og isolert i forskjellige former og størrelser, inkludert mikrosfærer og nanosfærer. Polymerformuleringene kan føre til forlenget varighet av den terapeutiske effekten (se Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34 (7-8): 915-923 (2000)). En polymerformulering for humant veksthormon (hGH) er blitt anvendt i kliniske forsøk. (Se Kozarich og Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552 (1998)).

Eksempler på polymermikrosfære vedvarende frigjøringsformuleringer er beskrevet i PCT-publikasjon WO 99/15154 (Tracy et al.), US patenter nr. 5 674 534 og 5 716 644 (begge til Zale et al.), PCT-publikasjon WO 96/40073 (Zale et al.), og PCT-publikasjon WO 00/38651 (Shah et al.). US patenter nr. 5 674 534 og 5 716 644 og PCT-publikasjon WO 96/40073 beskriver en polymermatrise inneholdende partikler av erythropoietin som er stabilisert overfor aggregasjon med et salt.

I noen utførelsesformer blir de terapeutiske forbindelsene dannet med bærere som vil beskytte de terapeutiske forbindelsene overfor hurtig eliminering fra kroppen, som en formulering med kontrollert frigjøring, inkludert implantater og mikroinnkapslede leveringssystemer. Biodegraderbare, biokompatible polymerer kan bli anvendt, så som etylenvinylacetat, polyanhydrider, polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkesyre. Slike formuleringer kan bli dannet ved anvendelse av kjente teknikker. Materialene kan også bli oppnådd kommersielt, f.eks. fra Alza Corporation og Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (inkludert liposomer målsøkt til

spesifikke celler med monoklonale antistoffer til cellespesifikke antigener) kan også bli anvendt som farmasøytisk akseptable bærere. Disse kan bli dannet ifølge metoder kjent for fagfolk innenfor dette området, for eksempel, som beskrevet i US patent nr. 4 522 811.

5

De terapeutiske forbindelsene kan også bli formulert for å forøke den intracellulære leveringen. For eksempel er liposomale leveringssystemer kjent innenfor fagområdet, se f.eks. Chonn og 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); og 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), beskriver anvendelse av fusogene liposomer for å levere et protein til cellene både in vivo og in vitro.

15

Dosering, toksisitet og terapeutisk effektivitet til de terapeutiske midlene kan bli bestemt ved standard farmasøytiske prosedyrer i cellekulturer eller eksperimentelle dyr, f.eks. for bestemmelse av LD50 (dose dødelig for 50 % av populasjonen) og ED50 (dosen som er terapeutisk effektiv i 50 % av populasjonen). Doseforholdet mellom de toksiske og terapeutiske effektene er den terapeutiske indeksen, og kan bli uttrykt som forholdet LD50/ED50. Forbindelser som utviser høye terapeutiske indekser er foretrukket. Mens forbindelser som utviser toksiske bieffekter kan bli anvendt, skal man være forsiktig med å konstruere et leveringssystem som målsøker slike forbindelser til setet for påvirket vev for å minimalisere den potensielle skaden på uinfiserte celler, og dermed, redusere bieffekter.

25

Data oppnådd fra cellekulturanalyser og dyrestudier kan bli anvendt for formulering av en rekke doseringer for anvendelse i mennesker. Doseringen av slike forbindelser ligger fortrinnsvis innenfor området av sirkulerende konsentrasjoner som inkluderer ED50 med liten eller ingen toksisitet. Doseringen kan variere innenfor dette området avhengig av doseringsformen anvendt, og veien for administrering som blir anvendt. For en hvilken som helst forbindelse anvendt i metodene kan den terapeutiske effektive dose bli beregnet innledningsvis fra cellekulturanalyser. En dose kan bli formulert i dyremodeller for å oppnå et sirkulerende plasmakonsentrasjonsområde som inkluderer IC50 (dvs. konsentrasjonen av testforbindelse som oppnår en halv-

35

maksimal inhibisjon av symptomene) som bestemt i cellekultur. Slik informasjon kan

bli anvendt for å mer nøyaktig bestemme nyttige doser i mennesker. Nivåer i plasma kan bli målt, for eksempel, ved høytytelse væskekromatografi.

Typisk varierer en effektiv mengde av de aromatisk-kationiske peptidene, tilstrekkelig
 5 for oppnåelse av en terapeutisk eller profylaktisk effekt, område fra omtrent 0,000001
 mg pr. kilogram kroppsvekt pr. dag, til omtrent 10000 mg pr. kilogram kroppsvekt pr.
 dag. Fortrinnsvis er doseområdene fra omtrent 0,0001 mg pr. kilogram kroppsvekt pr.
 dag, til omtrent 100 mg pr. kilogram kroppsvekt pr. dag. For eksempel kan
 doseringene være 1 mg/kg kroppsvekt eller 10 mg/kg kroppsvekt hver dag, hver to
 10 dager, eller hver tre dager, eller innenfor området på 1-10 mg/kg hver uke, hver to
 uker, eller hver tre uker. I én utførelsesform varierer en enkelt dosering av peptidet
 fra 0,1-10000 mikrogram pr. kg kroppsvekt. I én utførelsesform er aromatisk-
 kationiske peptidkonsentrasjoner i en bærer fra 0,2-2000 mikrogram pr. levert
 milliliter. Et eksempelvis behandlingsregime omfatter administrering én gang pr. dag
 15 eller én gang i uken. Intervaller kan også være ujevne, som indikert ved måling av
 blodnivåene av glukose eller insulin i individet, og justering av doseringen ved
 administreringen deretter. I terapeutiske applikasjoner er en relativt høy dosering
 med relativt korte intervaller noen ganger nødvendig, helt til progresjonen av
 sykdommen er indusert eller avsluttet, og fortrinnsvis til individet viser delvis eller
 20 fullstendig lindring av symptomer på sykdom. Deretter kan pasienten bli administrert
 et profylaktisk regime.

I noen utførelsesformer kan en terapeutisk effektiv mengde av et aromatisk-kationisk
 peptid bli definert som en konsentrasjon av peptidet ved målvevet på 10^{-11} til 10^{-6}
 25 molar, f.eks. omtrent 10^{-7} molar. Denne konsentrasjonen kan bli levert ved
 systemiske doser på 0,001 til 100 mg/kg, eller ekvivalent dose ved
 kroppsområdeareal. Skjemaet for dosene vil bli optimalisert for å opprettholde den
 terapeutiske konsentrasjonen ved målvevet, mest foretrukket ved enkelt daglig eller
 ukentlig administrering, men inkluderer også kontinuerlig administrering (f.eks.
 30 parenteral infusjon eller transdermal applikasjon).

I noen utførelsesformer er doseringen av det aromatisk-kationiske peptidet
 tilveiebrakt i et "lavt", "middels" eller "høyt" dosenivå. I én utførelsesform er den lave
 dosen tilveiebrakt fra omtrent 0,0001 til omtrent 0,5 mg/kg/t, egnet fra omtrent 0,01
 35 til omtrent 0,1 mg/kg/t. I én utførelsesform er midtdosen tilveiebrakt fra omtrent 0,1
 til omtrent 1,0 mg/kg/t, fortrinnsvis fra omtrent 0,1 til omtrent 0,5 mg/kg/t. I én

utførelsesform er den høye dosen tilveiebrakt fra omtrent 0,5 til omtrent 10 mg/kg/t, fortrinnsvis fra omtrent 0,5 til omtrent 2 mg/kg/t.

5 Fagfolk innenfor dette området vil vite at visse faktorer kan innvirke på doseringen og tidsberegningen nødvendig for å effektivt behandle et individ, inkludert men ikke begrenset til, hvor alvorlig sykdommen eller forstyrrelsen er, tidligere behandlinger, generell helsetilstand og/eller alder til individet, og andre sykdommer som er tilstede. Videre kan behandling av et individ med en terapeutisk effektiv mengde av de terapeutiske sammensetningene beskrevet heri, inkludere en enkel behandling eller en 10 serie med behandlinger.

Pattedyret behandlet i henhold til foreliggende metoder kan være et hvilket som helst pattedyr, inkludert f.eks. gårsdyr, så som sauer, griser, kuer og hester; kjæledyr, så som hunder og katter; laboratoriedyr, så som rotter, mus og kaniner. I en foretrukket 15 utførelsesform er pattedyret et menneske.

Kombinasjonsterapi med et aromatisk-kationisk peptid og andre terapeutiske midler

I visse tilfeller kan det være hensiktsmessig å administrere minst én av de aromatisk- 20 kationiske peptidene beskrevet heri (eller et farmasøytisk akseptabelt salt, ester, amid, promedikament eller solvat) i kombinasjon med et annet terapeutisk middel. Som et eksempel hvis én bieffekt som en pasient opplever ved mottak av én av de aromatisk-kationiske peptidene beskrevet her, er inflammasjon, da kan det være hensiktsmessig å administrere et anti-inflammatorisk middel i kombinasjon med det 25 opprinnelige terapeutiske midlet. Eller, kun som et eksempel, kan den terapeutiske effektiviteten til én av forbindelsene beskrevet heri bli forøket ved administrering av en adjuvant (dvs. i seg selv kan adjuvanten kun ha minimal terapeutisk fordel, men i kombinasjon med et annet terapeutisk middel, blir den totale terapeutiske fordelen for pasienten forøket). Eller, som et eksempel, kan fordelen som en pasient opplever bli 30 forøket ved administrering av én av forbindelsene beskrevet heri, med et annet terapeutisk middel (som også inkluderer et terapeutisk regime) som også har den terapeutiske fordelen at den forebygger eller behandler oftalmiske tilstander. Som kun et eksempel, ved behandling av makulær degenerasjon som involverer administrering av én av de aromatisk-kationiske peptidene beskrevet heri, kan øket terapeutisk 35 fordel oppstå ved også å tilveiebringe pasienten med andre terapeutiske midler eller terapier for makulær degenerasjon. I ethvert tilfelle, uansett oftalmisk sykdom, forstyrrelse eller tilstand som blir behandlet, kan den totale fordelen som pasienten

opplever ganske enkelt være additivt av de to terapeutiske midlene, eller pasienten kan oppleve en synergistisk fordel.

5 Spesifikt inkluderer ikke-begrensede eksempler på mulige kombinasjonsterapier
anvendelse av minst ett aromatisk-kationisk peptid med nitrogenoksid (NO) indusere,
statiner, negativt ladede fosfolipider, antioksidanter, mineraler, antiinflammatoriske
midler, anti-angiogene midler, matriksmetalloproteonaseinhibitorer og karotenoider. I
flere tilfeller kan egnede kombinasjonsmidler falle inn under multiple kategorier (kun
som eksempel, er lutein en antioksidant og et karotenoid). Videre kan de aromatisk-
10 kationiske peptidene også bli administrert med ytterligere midler som kan tilveiebringe
en fordel til pasienten, inkludert som eksempel kun syklosporin A.

I tillegg kan de aromatisk-kationiske peptidene også bli anvendt i kombinasjon med
prosedyrer som kan tilveiebringe ytterligere eller synergistisk fordel til pasienten,
15 inkludert, kun som eksempel, anvendelse av ekstrakorporeal reoferese (også kjent
som membrandifferensialfiltrering), anvendelse av implanterbare mineatyrteleskoper,
laserfotokoagulasjon av drusen, og mikrostimuleringsterapi.

Anvendelse av antioksidanter er blitt vist å være fordelaktig for pasienter med
20 makulær degenerasjon og dystrofier. Se f.eks. *Arch. Ophthalmol.*, 119: 1417-36
(2001); Sparrow, et al., *J. Biol. Chem.*, 278:18207-13 (2003). Eksempler på egnede
antioksidanter som kan bli anvendt i kombinasjon med minst ett aromatisk-kationisk
peptid inkluderer vitamin C, vitamin E, betakaroten og andre karotenoider, koenzym
Q, 4-hydroksey-2,2,6,6-tetrametylpiperidin-N-oksyd (også kjent som tempol), lutein,
25 butylert hydroksytoluen, reservatrol, en troloksanalog (PNU-83836-E), og
blåbærekstrakt.

Anvendelse av visse mineraler er også blitt vist å være nyttig for pasienter med
makulære degenerasjoner og dystrofier. Se f.eks. *Arch. Ophthalmol.*, 119: 1417-36
30 (2001). Eksempler på egnede mineraler kan bli anvendt i kombinasjon med minst ett
aromatisk-kationisk peptid inkluderer kobbeinnholdende mineraler, så som
kuprinoksid; sinkinnholdende mineraler, så som sinkoksid; og seleniuminnholdende
forbindelser.

35 Anvendelse av visse negativt ladede fosfolipider er også blitt vist å være nyttig for
pasienter med makulære degenerasjoner og dystrofier. Se f.eks. Shaban & Richter,
Biol. Chem., 383:537-45 (2002); Shaban, et al., *Exp. Eye Res.*, 75:99-108 (2002).

Eksempler på egnede negativt ladede fosfolipider som kan bli anvendt i kombinasjon med minst ett aromatisk-kationisk peptid inkluderer kardiolipin og fosfatidylglyserol. Positivt ladede og/eller nøytrale fosfolipider kan også tilveiebringe fordeler for pasienter med makulære degenerasjoner og dystrofier når anvendt i kombinasjon med

5 aromatisk-kationiske peptider.

Anvendelsen av visse karotenoider er blitt korrelert med opprettholdelse av fotobeskyttelsen nødvendig i fotoreseptorceller. Karotenoider er naturlig forekommende gule til røde pigmenter av terpenoidgruppen, og kan finnes i planter,

10 alger, bakterier og visse dyr, så som fugler og skaldyr. Karotenoider er en stor klasse av molekyler hvor mer enn 600 naturlig forekommende karotenoider er blitt identifisert. Karotenoider inkluderer hydrokarboner (karotener) og deres oksigenerte, alkoholderivater (xantofyller). De inkluderer aktinioerytrol, astaksantin, kantaksantin, kapsantin, kapsorubin, β -8'-apo-karotenal (apo-karotenal), β -12'-apo-karotenal, α -karoten, β -karoten, "karoten" (en blanding av α - og β -karotener), γ -karotener, β -kryptoxantin, lutein, lykopen, violerytrin, zeaxantin, og estere av hydroksyl- eller karboksylinnholdende medlemmer derav. Mange av karotenoidene oppstår i naturen som cis- og transisomere former, mens syntetiske forbindelser ofte er racemiske blandinger.

20 I mennesker akkumulerer netthinnen selektivt hovedsakelig to karotenoider: zeaxantin og lutein. Disse to karotenoidene antas å hjelpe til i beskyttelsen av netthinnen på grunn av at de er kraftfulle antioksidanter, og absorberer blått lys. Studier med vaktler ("quails") etablerte at grupper oppfostret på karotenoidmanglende

25 dietter hadde netthinner med lave konsentrasjoner av zeaxantin og led av alvorlig lysskade, som sett i et høyt antall av apoptotiske fotoreseptorceller, mens gruppen med høye zeaxantinkonsentrasjoner hadde normal skade. Eksempler på egnede karotenoider for i kombinasjon med minst ett aromatisk-kationisk peptid inkluderer lutein og zeaxantin, samt hvilke som helst av overnevnte karotenoider.

30 Egnede nitrogenoksidindusere inkluderer forbindelser som stimulerer endogen NO eller forhøyede nivåer av endogen endoteliumavledet relaxing faktor (EDRF) in vivo, eller er substrater for nitrogenoksid syntase. Slike forbindelser inkluderer f.eks. L-arginin, L-homoarginin, og N-hydroksy-L-arginin, inkludert deres nitroserte og nitrosylerte

35 analoger (f.eks. nitrosert L-arginin, nitrosylert L-arginin, nitrosert N-hydroksy-L-arginin, nitrosylert N-hydroksy-L-arginin, nitrosert L-homoarginin og nitrosylert L-homoarginin), forløpere av L-arginin og/eller fysiologisk akseptable salter derav,

inkludert f.eks. citrullin, ornitin, glutamin, lysin, polypeptider omfattende minst én av disse aminosyrene, inhibitorer av enzymet arginase (f.eks. N-hydrokxy-L-arginin og 2(S)-amino-6-boronheksansyre) og substrater for nitrogenoksid syntase, cytokiner, adenosin, bradykinin, kalretikulin, bisakodyl, og fenolftalein, EDRF er en vaskulær relaxing faktor utskilt av endotelet, og er blitt identifisert som nitrogenoksid eller et nært beslektet derivat derav (Palmer et al., *Nature*, 327:524-526 (1987); Ignarro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9265-9269 (1987)).

Statiner virker som lipidreduserende midler og/eller egnede nitrogenoksidindusere. I tillegg er et forhold blitt demonstrert mellom statinbruk og forsinket begynnelse eller utvikling av makulær degenerasjon. G. McGwin et al., *British Journal of Ophthalmology*, 87:1121-25 (2003). Statiner kan dermed tilveiebringe fordelen til en pasient som lider fra en oftalmisk tilstand (så som makulære degenerasjoner og dystrofier, og netthinnedystrofier) når administrert i kombinasjon med aromatisk-kationiske peptider. Egnede statiner inkluderer, kun som eksempel, rosuvastatin, pitivastatin, simvastatin, pravastatin, cerivastatin, mervastatin, velostatin, fluvastatin, kompaktin, lovastatin, dalvastatin, fluindostatin, atorvastatin, atorvastatinkalsium (som er hemikalsiumsaltet av atorvastatin), og dihydrokompaktin.

Egnede antiinflammatoriske midler som de aromatisk-kationiske peptidene kan bli anvendt inkluderer, kun som eksempel, aspirin og andre salicylater, kromoly, nedokromil, teofyllin, zileuton, zafirlukast, montelukast, pranlukast, indometacin og lipoksygenaseinhibitorer; ikke-steroidale antiinflammatoriske medikamenter (NSAIDs) (så som ibuprofen og naproksin); prednison, deksametason, syklooksygenaseinhibitorer (dvs. COX-1- og/eller COX-2-inhibitorer så som NaproxenTM eller CelebrexTM); statiner (kun som eksempel, rosuvastatin, pitivastatin, simvastatin, pravastatin, cerivastatin, mevastatin, velostatin, fluvastatin, kompaktin, lovastatin, dalvastatin, fluindostatin, atorvastatin, atorvastatinkalsium (som er hemikalsiumsaltet av atorvastatin), og dihydrokompaktin); og disassosierte steroider.

Egnede matriksmetalloproteinase (MMP) inhibitorer kan også bli administrert i kombinasjon med aromatisk-kationiske peptider for å behandle oftalmiske tilstander eller symptomer assosiert med makuklære eller retinale degenerasjoner. MMP er kjent for å hydrolysere de fleste komponentene i den ekstracellulære matriks. Disse proteinasene spiller en sentral rolle i mange biologiske prosesser, så som remodellering av normalt vev, embryogenese, leging av sår og angiogenese. Derimot er omfattende ekspresjon av MMP blitt observert i mange sykdomstilstander, inkludert

makulær degenerasjon. Mange MMP er blitt identifisert, idet de fleste er multidomenesinkendopeptidaser. Et antall metalloproteinaseinhibitorer er kjent (se f.eks. beskrivelsen av MMP-inhibitorer av Whittaker M. et al., *Chemical Reviews* 99(9): 2735-2776 (1999)). Representative eksempler på MMP-inhibitorer inkluderer

5 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) (f.eks. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 eller TIMP-4), α -2-makroglobulin, tetrasyklinder (f.eks. tetrasyklin, minosyklin og doksosyklin), hydroksamater (f.eks. BATIMASTAT, MARIMISTAT og TROCADE), gelatorer (f.eks. EDTA, cystein, acetylcystein, D-penicillamin, og gullsalter), syntetiske MMP-fragmenter, suksinylmerkaptopuriner, fosfonamidater og hydroksaminsyrer.

10 Eksempler på MMP-inhibitorer som kan bli anvendt i kombinasjon med aromatisk-kationiske peptider inkluderer, kun som eksempel, hvilke som helst av overnevnte inhibitorer.

Anvendelse av antiangiogene eller anti-VEGF-medikamenter er også blitt vist å tilveiebringe fordel for pasienter med makulære degenerasjoner og dystrofier.

15 Eksempler på egnede antiangiogene eller anti-VEGF-medikamenter som kan bli anvendt i kombinasjon med minst ett aromatisk-kationisk peptid inkluderer Rhufab V2 (LucentisTM), tryptofanyl-tRNA-syntetase (TrpRS), Eye001 (Anti-VEGF pegylert aptamer), skvalamin, RetaaneTM 15 mg (anekortavacetat for depotsuspensjon; Alcon, Inc.), Combretastatin A4 Prodrug (CA4P), MacugenTM, MifeprexTM (mifepriston-ru486),

20 subtenontriamcinolonacetamid, intravitreal krystallinsk triamcinolonacetamid, Prinomastat (AG3340-syntetisk matrise metalloproteinaseinhibitor, Pfizer), fluocinolonacetamid (inkludert fluocinolon intraokulær implantat, Bausch & Lomb/Control Delivery Systems), VEGFR-inhibitorer (Sugen), og VEGF-Trap

25 (Regeneron/Aventis).

Andre farmasøytiske terapier som er blitt anvendt for å lindre visuell avvik kan bli anvendt i kombinasjon med minst ett aromatisk-kationisk peptid. Slike behandlinger inkluderer, men er ikke begrenset til, midler så som VisudyneTM med anvendelse av en

30 ikke-termal laser, PKC 412, Endovion (NeuroSearch A/S), nevrotrofiske faktorer, inkludert som eksempel glialavledet nevrotrofisk faktor og ciliær nevrotrofisk faktor, diatazem, dorzolamid, fototrop, 9-cis-retinal, øyemedisinering (inkludert ekkoterapi) inkludert fosfolinjodid eller ekkotiofat eller karbonanhydraseinhibitorer, AE-94 (AEterna Laboratories, Inc.), Sima-027 (Sima Therapeutics, Inc.), pegatanib (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), nevrotrofiner (inkludert, kun som eksempel, NT-4/5, Genentech), Cand5 (Acuity Pharmaceuticals), ranibizumab (Genentech), INS-37217 (Inspire Pharmaceuticals), integrinantagonister (inkludert de fra Jerini AG og

35

Abbott Laboratories), EG-3306 (Ark Therapeutics Ltd.), BDM-E (BioDiem Ltd.), talidomid (som anvendt, for eksempel, av EntreMed, Inc.), kardiotrofin-1 (Genentech), 2-metoksyøstradiol (AllerganOculer), DL-8234 (Toray Industries), NTC-200 (Neurotech), tetratiomolybdat (University of Michigan), LYN-002 (Lynkeus Biotech),
 5 mikroalgalforbindelse (Aquasearch/Albany, Mera Pharmaceuticals), D-9120 (Celltech Group plc), ATX-S10 (Hamamatsu Photonics), TGF-beta 2 (Genzyme/Celtrix), tyrosinkinaseinhibitorer (Allergan, SUGEN, Pfizer), NX-278-L (NeXstar Pharmaceuticals/Gilead Sciences), Opt-24 (OPTIS France SA), netthinnecellegangliom nevrobeskyttende midler (Cogent Neurosciences), N-nitropirazolderivater (Texas A&M
 10 University System), KP-102 (Krenitsky Pharmaceuticals), og syklosporin A.

I ethvert tilfelle kan multiple terapeutiske midler bli administrert i en hvilken som helst rekkefølge, eller til og med samtidig. Hvis samtidig, kan de multiple terapeutiske midlene bli tilveiebrakt i en enkelt, enhetlig form, eller i multiple former (kun som
 15 eksempel, enten som en enkelt løsning eller som to separate løsninger). Ett av de terapeutiske midlene kan bli gitt i multiple doser, eller begge kan bli gitt som multiple doser. Om ikke samtidig, kan timingen mellom de multiple dosene variere fra mer enn null uker til mindre enn omtrent fire uker, mindre enn omtrent seks uker, mindre enn omtrent to måneder, mindre enn omtrent fire måneder, mindre enn omtrent seks
 20 måneder, eller mindre enn omtrent ett år. I tillegg skal kombinasjonsmetodene, sammensetningene og formuleringene ikke være begrenset til anvendelse av kun to midler. Bare som et eksempel kan et aromatisk-kationisk peptid bli tilveiebrakt med minst én antioksidant, og minst ett negativt ladet fosfolipid; eller et aromatisk-kationisk peptid kan bli tilveiebrakt med minst én antioksidant og minst én induser av
 25 nitrogenoksidproduksjonen; eller et aromatisk-kationisk peptid kan bli tilveiebrakt med minst én induser av nitrogenoksidproduksjoner, og minst ett negativt ladet fosfolipid; og så videre.

I tillegg kan et aromatisk-kationisk peptid også bli anvendt i kombinasjon med
 30 prosedyrer som kan tilveiebringe ytterligere eller synergistiske fordeler for pasienten. Prosedyrer som er kjente, foreslått eller betraktet å lindre visuell svekkelse, inkluderer, men er ikke begrenset til, "begrenset netthinnetranslokasjon", fotodynamisk terapi (inkludert, kun som eksempel, reseptomålsøkt PDT, Bristol-Myers Squibb, Co.; porfimeronatrium for injeksjon med PDT; verteporfin, QLT Inc.;
 35 rostoporfin med PDT, Miravent Medical Technologies; talaporfinnatrium med PDT, Nippon Petroleum; motexafin lutetium, Pharmacyclics, Inc.), antisensoligonukleotider (inkludert, som eksempel, produkter testet av Novagali Pharma SA og ISIS-13650,

Isis Pharmaceuticals), laserfotokoagulasjon, drusenlasering, makulær hullkirurgi, makulær translokasjonskirurgi, implanterbare mineatyrteleskoper, Phi-Motion Angiografi (også kjent som mikrolaserterapi og Feeder Vessel Treatment), Proton Beam terapi, mikrostimuleringsterapi, netthinnelesning og glasslegemekirurgi, skleral
 5 Buckle, submakulær kirurgi, transpupillær termoterapi, fotosystem I terapi, anvendelse av RNA interference (RNAi), ekstrakorporeal reoferese (også kjent som membrandifferensialfiltrering og reoterapi), mikrochipimplantering, stamcelleterapi, generstatningsterapi, ribozymgenterapi (inkludert genterapi for hypoksia responselement, Oxford Biomedica; Lentipak, Genetix; PDEF-genterapi, GenVec),
 10 fotoreseptor/netthinnecelletransplantasjon (inkludert transplanterbar netthinneepitelceller, Diacrin, Inc.; retinal celletransplantat, Cell Genesys, Inc.), og akupunktur.

Ytterligere kombinasjoner som kan bli anvendt for å være til fordel for et individ,
 15 inkluderer anvendelse av genetisk testing for å bestemme om det individet er en bærer av et mutantgen som er kjent for å være korrelert med visse oftalmiske tilstander. Kun som eksempel er defekter i humant ABCA4-gen antatt å være assosiert med fem bestemte netthinnefenotyper inkludert Stargardt-sykdom, cone-rod-dystrofi, aldersrelatert makulær degenerasjon, og retinitt pigmentosa. Se f.eks. Allikmets et
 20 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*, 11 1:546-553 (2004). I tillegg blir en autosomal dominant form av Stargardt Disease forårsaket av mutasjoner i ELOV4-genet. Se Karan, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). Pasienter
 25 som innehar hvilke som helst av disse mutasjonene er ventet å ha terapeutisk og/eller profylaktisk fordel i metodene beskrevet heri.

EKSEMPLER

Foreliggende oppfinnelse er videre illustrert i følgende eksempler, som ikke skal være
 30 begrensende på noen måte.

Referanseeksempel 1 – Forebygging av høy glukoseindusert skade i humane netthinneepitelceller

Effekter av aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen er forebygging av høy
 35 glukoseindusert skade i humane netthinneepitelceller (HREC) ble undersøkt i dyrkede HRECs.

Metoder for HREC-dyrkning nyttige i studiene ifølge foreliggende oppfinnelse er kjente. Se generelt Li B, Tang SB, Zhang G, Chen JH, Li BJ. Culture and characterization of human retinal capillary endothelial cell. *Chin Ophthal Res* 2005; 23: 20-3; Premanand C, Rema M, Sameer MZ, Sujatha M, Balasubramanyam M. Effect of curcumin on proliferation of human retinal endothelial cells under in vitro conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2179-84.

Forklart i korte trek, HREC-celler ble delt inn i tre grupper: en normal kontrollgruppe; en gruppe administrert 30 mM glucose; og en gruppe administrert 30 mM glucose + SS-31. Overlevelsen av HRECs i høy glukose kobehandlet med forskjellige konsentrasjoner av SS-31 (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M) ble målt ved anvendelse av annexin V+PI-analyse og flow cytometri. Se generelt Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., og van Oers, M. H. J. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415; Homburg, C. H., de Haas, M., von dem Borne, A. E., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. P., og 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, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., og Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis – flow cytometric 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., og Henson, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J. Immunol.* 148: 2207.

Overlevelsen av HRECs i høy glukose kobehandlet med SS-31 ble testet ved 24 t og 48 t. Resultatene er vist i figur 1, og indikerer at overlevelsen av HRECs ble betydelig forbedret med administrering av SS-31, ved en reduksjon i apoptotiske og nekrotiske celler. Behandling av SS-31 reduserte også produksjonen av ROS (figur 2).

Vurdering av SS-31 som et beskyttelsesmiddel overfor mitokondrielt potensielt tap av HRECs behandlet med høyglukose ble undersøkt. For å bestemme om en mitokondriellmediert vei var viktig i SS-31 sin beskyttende effekt overfor høyglukoseindusert celledød, ble $\Delta\Psi_m$ målt ved flow cytometri. Etter behandling av HRECs med høyglukose uten SS-31 i 24 eller 48 t, ble et hurtig tap av mitokondriell membranpotensiale detektert ved JC-1 fluorescensprobe som indikert med en betydelig reduksjon i forholdet mellom rød og grønn fluorescens observert i

høyglukosegruppen. I kontrast til dette, $\Delta\Psi_m$ i 100 nM SS-31 kobehandlet gruppe, forble så å si uforandret, og var sammenliknbar med normal glukosekontrollgruppen (figur 3). Disse data foreslår at SS-31 forhindret mitokondriell membran potensielt tap forårsaket av eksponering for et høyglukosemiljø.

5

Glukose (30 mmol/L) induserte cytokrom c-friggjøring fra mitokondriet til HRECs. Fikserte HRECs ble immunmerket med et cytokrom c-antistoff og et mitokondrielt spesifikt proteinantistoff (HSP60). Konfokal mikroskopisk analyse viste at HRECs i normal kultur og i SS-31 kobehandlet med glukose har overlappende cytokrom c-farging og mitokondriefarging, som indikerer kolokalisering av cytokrom c og mitokondrier (figur 4). Etter behandling med 30 mmol/L glukose i 24 t eller 48 t, ble noe cytokrom c observert i cytoplasma til HRECs, som indikerer at glukose induserte frigjøring av cytokrom c fra mitokondrier til cytoplasma i HREC-celler, men SS-31 kan redusere en slik translokasjon mellom mitokondrier og cytoplasma.

15

Forebygging av cytokrom c-friggjøring fra mitokondrier resulterte i redusert kaspase-3-aktivitet. Som vist i figur 5, reduserte SS-31 proteinekspresjonen til kaspase-3 i høyglukosebehandlede HRECs. Nivået av spaltet kaspase-3-proteinekspresjon ble målt ved Western blot (figur 5A). Når HRECs ble eksponert for 30 mM glukose i 24 t og 48 t, økte nivået av kaspase-3-ekspressjon dramatisk. På samme tid, i SS-31 kobehandlet gruppe, utviste det en markert reduksjon i kaspase-3-proteinnivået (*p<0,05). Figur 5B viser en kvantitativ analyse nivået av kaspase-3-ekspressjon i HRECs i høyglukose kobehandlet med SS-31 i 24 og 48 t.

20

25

SS-31 økte ekspresjonen av Trx2 i høyglukosebehandlede HRECs. Figur 5C viser mRNA-nivået av Trx2 i HRECs eksponert for 30 mM glukose kobehandlet med SS-31 i 24 t og 48 t. mRNA-ekspressionsnivået til Trx2 ble målt ved kvantitativ real-time PCR. Relative mRNA-nivåer av Trx2 ble normalisert av 18S mRNA-nivåer (*p<0,05 vs. normal glukosemediumgruppe og 30 mM høyglukosebehandlede gruppe). Tre uavhengige prøver ble anvendt for hvert tidspunkt. Figur 5D viser nivået av Trx2-proteinekspresjon som målt ved Western blot. Proteinekspresjonen av Trx2 i høyglukose kobehandlet med SS-31-gruppen økte signifikant sammenliknet med normal glukosegruppen (*p<0,05). Figur 5E viser kvantitativ analyse av proteinnivået av Trx2 i HRECs 24 og 48 t etter høyglukose uten eller med SS-31-kobehandling.

30

35

Disse resultatene indikerer at SS-31 kan fremme overlevelsen av HREC-celler i et høyglukosemiljø. Følgelig kan SS-31 og andre aromatisk-kationiske peptider være nyttige i metoder for forebygging av diabetisk retinopati.

5 **Referanseeksempel 2 – Forebygging av diabetisk retinopati i rotter matet med diett med høyt fettinnhold**

Effektene av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen for forebygging av utviklingen av diabetisk retinopati ble undersøkt i en Sprague-Dawley rottemodell. Eksemplet beskriver resultatene av slike eksperimenter.

10

En rottemodell for diabetes ble etablert ved kombinasjon av 6-uke HFD og lav dose av STZ (30 mg/kg) injeksjon eller en enkelt høy dose av STZ (65 mg/kg) i SD-rotter. Se generelt K. Srinivasan, B. Viswanad, Lydia Asrat, C.L. Kaul og P. Ramaro, Combination of high-fag diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening, *Pharmacological Research*, 52(4): 313-320, 2005. Rotter fra samme batch matet med normalt fôr (NRC) ble anvendt som en kontroll. Tabellene 7-10 viser det terapeutiske skjemaet, og eksperimentell protokoll.

15

Tabell 7. Behandlingsgrupper – HFD/STZ-modell

Modell	Antall rotter	Modell	Behandling	Dosering og vei
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	Saltvann	Likt vol. s.c.
G	10	NRC	Saltvann	Likt vol- s.c.

20

Tabell 8. Terapeutisk skjema – HFD/STZ-modell

Varighet	Hensikt	Diabetiske grupper (A,B,C,D,E;F)	Kontrollgruppe (G)
1. uke	Akklimasjon	Normal rottefôr	
2.-7. uke	Diettmanipulering	Høy fettdiett	Normal rottefôr
Slutt av 7. uke	STZ-injeksjon	STZ 30 mg/kg, i.p. én gang	Sitratbuffer
8.-27. uke	Induksjon av	Høy fettdiett inntil	Normalt rottefôr

	diabetes	21. uke, deretter endret til normalt rottefôr	
28.-37. uke	Peptidbehandling	Peptidbehandling (se tabell 7)	Gruppe G: 2 mL/kg, s.c.
38. uke	Samlet 24 t urin og blodprøver og høstet vitale organer		

Tabell 9. Behandlingsgrupper – STZ-modell

Gruppe	Antall rotter	Modell	Behandling	Dosering og vei
A	11	Diabetes	SS-31	10 mg/kg s.c.
B	11	Diabetes	SS-20	10 mg/kg s.c.
C	10	Diabetes	Saltvann	Likt volum s.c.
D	10	Normal	Saltvann	Likt volum s.c.

5

Tabell 10. Terapeutisk skjema – STZ-modell

Varighet	Hensikt	Diabetiske grupper (A,B,C)	Kontrollgruppe (D)
1.-3. uke	Akklimasjon	Normal rottefôr	
Slutt av 3. uke	STZ-injeksjon	STZ 30 mg/kg, i.p. én gang	Sitratbuffer
4.-18. uke	Induksjon av diabetiske komplikasjoner	Normalt rottefôr	
19.-28. uke	Peptidbehandling	Peptidbehandling (se tabell 9)	Gruppe D: 2 mL/kg, s.c.
29. uke	Samlet 24 t urin og blodprøver og høstet vitale organer		

I henhold til den eksperimentelle protokollen som nå er beskrevet, ble effektene av aromatisk-kationiske peptider for behandling av tilstander assosiert med diabetes i en SD-rottemodell demonstrert. Administrering av SS-20 og SS-31 resulterte i forebygging eller reversering av kataraktdannelse i lensene til diabetesrotter (figurene 6 og 7, tabellene 11 og 12).

Tabell 11. HFD/STZ-rottemodell

15

Gruppe	Turbiditetsgrad					Prosent- andel opasitet (%)	Prosent- andel alvorlig opasitet (%)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	4	0	0	0	0	0	0
HFD/STZ	1	0	2	3	0	83,3	0
SS20 3 mg	1	1	1	0	1	75,0	15,0
SS20 10 mg	1	2	1	0	0	75,0	0
SS31 1 mg	1	1	1	0	0	67,7	0
SS31 3 mg	3	1	0	0	1	20,0	20,0
SS31 10 mg	6	1	0	0	0	14,3	0

-: gjennomsiktig;

+: svak opak;

++: opak;

+++ : moderat opak;

++++: alvorlig opak

5

Tabell 12. STZ-rottemodell

Gruppe	Opasitetsgrad					Prosent- andel opasitet (%)	Prosent- andel alvorlig opasitet (%)
	-	+	++	+++	++++		
NRC	6	0	0	0	0	0	0
STZ	1	0	0	1	3	80,0	60,0
SS20 10 mg	2	0	2	0	1	60,0	20,0
SS31 10 mg	2	2	0	0	1	60,0	20,0

Effekten av de aromatisk-kationiske peptidene på linseepitel i SD-rottemodell ble undersøkt. Administrering av SS-31 reduserte epitelcellulære forandringer i både STZ
 5 rottemodellen (figur 8) og HFD/STZ rottemodellen (figur 9).

Effekten av de aromatisk-kationiske peptidene på den indre blod-netthinnebarrierefunksjonen i SD-rottemodellen ble undersøkt. Administrering av SS-20 og SS-31 resulterte i forbedret indre blod-netthinnebarrierefunksjon sammenliknet
 10 med rotter på en HFD ikke administrert SS-20 eller SS31 (figur 10).

Effekten av de aromatisk-kationiske peptidene på netthinnemikrokar i SD-rottemodellen ble undersøkt (figur 11-12). Administrering av SS-31 reduserte netthinnemikrovaskulære forandringer observert i STZ- eller HFD/STZ-rotter.

15 Effekten av de aromatisk-kationiske peptidene på fordelingen av "tight junction" protein claudin-5 i netthinnemikroårer i SD-rottemodellen ble undersøkt. Fordelingen av "tight junction" protein claudin-5 ble detektert under et konfokalt mikroskop (figur 13). Claudin-5 ble fordelt blant netthinneårer glatt, lineært og jevnt i normale rotter
 20 (A), men den lineære formen ble brutt i STZ-rotten (B, pil). Fordeling av claudin-5 på netthinneårer i STZ-rotter behandlet med SS-20 (10 mg/kg) eller SS-31 (10 mg/kg) var lik den til normal rotte (henholdsvis panelene C og D).

Det kan oppsummeres med at disse funnene kollektivt etablerer at aromatisk-kationiske peptider enten forebygger eller kompenserer for de negative effektene ved
 25 diabetes i øyet, f.eks. katarakter og mikrovaskulaturen. Følgelig er administrering av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge foreliggende oppfinnelse nyttige i metoder for forebygging eller behandling av oftalmiske tilstander assosiert med diabetes i humane individer.

30

Referanseeksempel 3 – SS-31 forebygger oksidativt stress i glaukomatøse trabekulære nettverksceller

Effektene av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen for forebygging eller behandling av glaukom, ble undersøkt ved studering av effektene til peptidene i
 35 glaukomatøse trabekulære nettverksceller. Glaukom er den nest ledende årsaken til irreversibel blindhet over hele verden. Primær åpen-vinkel glaukom (POAG) er hovedsubtypen av glaukom. I POAG er det ingen synlig unormalitet ved det

trabekulære nettverket. Derimot antas det at evnen som cellene i det trabekulære nettverket har til å utføre deres normale funksjon, er redusert.

I dette eksemplet ble effektene av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen sammenliknet med trabekulære nettverks ("meshwork") celler fra POAG-pasienter (GTM) og trabekulære nettverksceller fra individer uten sykdom (HTM). Metoder nyttige i studiene ifølge foreliggende oppfinnelse er blitt beskrevet. Se generelt He Y, Ge J, Tombran-Tink J., Mitochondrial defects and dysfunction in calcium regulation in glaucomatous trabecular meshwork cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 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. GTM-cellene viser en betydelig svekkelse av mitokondriemembranpotensialet sammenliknet med HTM-cellene (figure 18).

Cellene ble delt inn i tre grupper: "Gruppe A"-cellene ble eksponert for hydrogenperoksid før administrering av SS-31. "Gruppe B"-cellene ble eksponert for SS-31 før administrering av hydrogenperoksid. "Gruppe C"-cellene ble administrert SS-31 og hydrogenperoksid simultant.

For å vurdere om SS-31 hadde cytotoksiske effekter på HTM- eller GTM-cellene ved forskjellige konsentrasjoner av SS-31 administrert til cellene, og cytotoksiteteten ble målt ved anvendelse av en LDH-analyse. En LDH-cytotoksitetsanalyse er en kolorimetrisk metode for analysering av cellulær cytotoksitet. Analysen måler kvantitativt det stabile, cytosole, laktatdehydrogenase (LDH) enzymet, som blir frigjort fra de skadede cellene. Frigjort LDH blir målt med en koblet enzymatisk reaksjon som resulterer i omdannelse av et tetrazoliumsalt (jodonitrotetrazolum (INT)) til en rødfarget formazan ved diaforase. Metoder for å detektere LDH fra celler nyttige i studiene ifølge foreliggende oppfinnelse er kjente. Se generelt 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. og Xu, J. (2005) *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 288: G447. LDH-aktiviteten blir bestemt som NADH-oksidasjon eller INT-reduksjon over en definert tidsperiode. Resultatene er vist i figur 14, og indikerer at SS-31 ikke påvirker levedyktigheten til HTM- og GTM-cellene.

Metoder for å måle mitokondrielt membranpotensiale ved anvendelse av TMRM benyttet i studiene ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet av Andrea Rasola og Massimo Geuna, A flow cytometry assay simultaneously detects independent apoptotic parameters, *Cytometry* 45:151-157, 2001; Mitoprobe™ JC-1 Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes, Invitrogen, USA. Figur 16 viser resultatene i GTM-cellene. Kollektivt etablerte disse resultatene at behandling med SS-31 forbedrer det mitokondrielle membranpotensialet til celler som ble eksponert for hydrogenperoksid for administrering av SS-31.

Gruppe A. Mitokondrielt membranpotensiale ($\Delta\Psi_m$) av HTM- og GTM-celler ble undersøkt når disse cellene ble eksponert for hydrogenperoksid før administrering av SS-31. Først ble det mitokondrielle membranpotensialet målt ved anvendelse av konfokal mikroskopi av celler merket med tetrametylrodaminmetylester (TMRM, 500 nM x 30 min.) (figur 15). Det mitokondrielle membranpotensialet ble også målt ved anvendelse av flow cytometri (figurer 16-17), ved merking av cellene med den mitokondrieselektive proben tetrametylrodaminmetylester (TMRM, 500 nM x 30 min.).

Gruppe B. Morfologien til GTM-cellene ble undersøkt når disse cellene ble eksponert for SS-31 før administrering av hydrogenperoksid. Figur 18 viser resultatene av invertert fase kontrastmikroskopi av celler administrert med forskjellige konsentrasjoner av SS-31. Resultatene indikerer at SS-31 beskytter cellene fra hydrogenperoksidmedierte morfologiske forandringer på en konsentrasjonsavhengig og tidsavhengig måte. Det vil si at hydrogenperoksidmediert celletap og "rounding" ble redusert i celler eksponert for SS-31-peptid. Mitokondriemembranpotensialet ($\Delta\Psi_m$) til HTM- og GTM-celler ble også undersøkt når disse cellene ble eksponert for SS-31 før administrering av hydrogenperoksid. Mitokondrielt membranpotensiale ble målt ved anvendelse av konfokal mikroskopi av celler merket med tetrametylrodaminmetylester (TMRM, 500 nM x 30 min.) (figurer 19-21). Disse resultatene viser at forbehandling med SS-31 doseavhengig forbedret mitokondriemembranpotensialet til cellene som ble eksponert for hydrogenperoksid. Følgelig tilveiebringer SS-31 en beskyttende effekt overfor oksidativt stress i GTM-cellene.

Effekter av SS-31 for mitigering av akutt oksidativ skade i GTM- og HTM-celler ble undersøkt. Figur 36 viser fluorescensintensiteten til TMRM til GTM- og HTM-cellene ved anvendelse av FACS-analyser. Prosentandel fluorescensintensitet sammenliknet med GTM-kontroll i H_2O_2 . SS-31 $10^{-6}M$, SS-31 $10^{-7}M$, SS-31 $10^{-8}M$ ble $35,2 \pm 2,12$ %, $35,2 \pm 2,12$ %, $35,2 \pm 2,12$ %.

56,2±4,04 %, 50,3±4,46 %, 47,5±2,82 % henholdsvis, n=4; HTM-gruppene var henholdsvis 37,4±0,725 %, 57,7±1,80 %, 50,6±3,06 %, 49,4±2,27 %, n=4. ** betyr P<0,01 sammenliknet med GTM H₂O₂-gruppen; * betyr P<0,05 sammenliknet med GTM H₂O₂-gruppen; ▲▲▲ betyr P<0,001 sammenliknet med HTM H₂O₂-gruppen.

5

Figur 37 viser fluorescensintensiteten av ROS til GTM- og HTM-cellene i kontroll- og SS-31 behandlede grupper ved anvendelse av FACS-analyser. Prosentandel intracellulær ROS-produksjon sammenliknet med GTM-kontrollen i GTM H₂O₂, SS-31 10⁻⁶M, SS-31 10⁻⁷M, SS-31 10⁻⁸M gruppene var henholdsvis 146,0±2,27 %, 84,5±8,75 %, 102,0±5,69 %, 133,0±5,17 % (n=3); HTM-gruppene var henholdsvis 153,0±3,46 %, 79±2,39 %, 91,8±3,49 %, 129,0±8,24 % (n=4). P<0,001 GTM- og HTM H₂O₂-gruppen sammenliknet med kontrollen; *** betyr P<0,001 sammenliknet med GTM H₂O₂-gruppen; ▲▲▲ betyr P<0,001 sammenliknet med HTM H₂O₂-gruppen; ▲▲ betyr P<0,01 sammenliknet med HTM H₂O₂-gruppen. Figur 38 viser at SS-31 reduserte mengden av celleapoptose induisert av H₂O₂.

15

Effekten av SS-31 på vedvarende oksidativ skade av GTM- og HTM-cellene ble undersøkt. Cellene ble forbehandlet med 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M av SS-31 i 1 t, og deretter inkubert med 200 µM H₂O₂ i 24 t for å undersøke den beskyttende effekten av SS-31 ved vedvarende oksidativt stress. Figur 39 og tabell 13 viser effektene av SS-31 på ROS-produksjonen fra vedvarende oksidativ skade av GTM- og HTM-cellene. Figur 40 og tabell 14 viser MMP-forandring i GTM- og HTM-cellene i hver behandlingsgruppe.

20

Tabell 13. ROS-produksjon i GTM3- og iHTM-celler behandlet med H₂O₂

	H ₂ O ₂ -Ktrl. (%)	SS-31		
		1 µM (%)	0,1 µM (%)	0,01 µM (%)
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***

25

Tabell 14. MMP-reduksjon i GTM3- og iHTM-cellene behandlet med H₂O₂

	H ₂ O ₂ -Ktrl. (%)	SS-31		
		1 µM (%)	0,1 µM (%)	0,01 µM (%)
GTM3	-39,67±2,33	-24,33±4,18*	-29,33±2,19*	-31,33±1,20*
iHTM	-69,53±2,01	-44,99±2,19***	-53,24±2,52**	-58,24±2,62*

Kollektivt demonstrerer disse resultatene at SS-31 har ingen cytotoksisitet ved 10^{-4}M for både GTM- og HTM-cellene, og at vedvarende og akutt oksidativt stress induisert av hydrogenperoksid kan bli forebygget av SS-31 ($>10^{-9}\text{M}$). Følgelig er de aromatisk-kationiske peptidene fra den foreliggende oppfinnelse nyttige i metoder for forebygging eller behandling av glaukom i humane individer.

Referanseeksempel 4 – SS-31 forebygger oksidativt stress i primære netthinnepigmentepitelceller

Primære netthinnepigmentepitel (RPE) celler ble dyrket for å undersøke effektene av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen for forebygging eller redusering av oksidativ skade i disse cellene. Metoder som er nyttige for studering av primære netthinnepigmentepitelceller er blitt beskrevet. Se Dunn et al., ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties, *Experimental Eye Research*, 1996, 62(2): 155-170. Først ble det vist at SS-31 ikke påvirker disse cellene negativt. Innledende dyrkede humane RPE-celler ble inkubert med forskjellige konsentrasjoner av SS-31 alene i en periode på 24 t, og cellelevedyktighet ble bestemt i en MTT-analyse (figur 22).

Deretter ble levedyktigheten til primære RPE-celler testet i nærvær av tBHP, og forskjellige konsentrasjoner av SS-31. Cellene ble sådd ut med 10000 celler pr. brønn i en 96-brønns plate og dyrket i 24 t, og deretter utsultet i 24 t. Etter dette ble cellene eksponert for økende konsentrasjoner av tBHP (figur 23A), eller preinkubert i 4 t med forskjellige konsentrasjoner av SS-31, deretter stimulert med tBHP i 6 t (figur 23B).

Disse resultatene indikerer at SS-31 forøket cellelevedyktigheten i respons til tBHP-administrasjon. Intracellulær ROS-produksjon i tre grupper av RPE-celler ble også undersøkt ved anvendelse av FACS-analyse. Figur 31A viser ROS-produksjon i kontroll RPE-celler; figur 31B viser ROS-produksjon i RPE-celler behandlet med $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP i 3 t; og figur 31C viser ROS-produksjon i RPE-celler behandlet med $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP i 3 t og $1\text{ }\mu\text{M}$ SS-31. Figur 32 viser MMP merket med JC-1 i en FACS-analyse. Tre forskjellige konsentrasjoner av SS-31-gruppene ble analysert. Forholdet mellom rød og grønn i $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP for 3 t gruppen er 1,08, forholdet mellom rød og grønn i 10 nM SS-31 for 4 t + $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP i 3 t gruppen er 1,25; forholdet mellom rød og grønn i 100 nM SS-31 for 4 t + $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP for 3 t gruppen er 1,4; og forholdet mellom rød og grønn i $1\text{ }\mu\text{M}$ SS-31 i 4 t + $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP for 3 t gruppen er 2,28. Figur 33 viser effekten av $1\text{ }\mu\text{M}$ SS-31 på MMP-reduksjon induisert av tBHP. Figur 33A: kontrollgruppen, R/G er $3,63\pm 0,24$; figur 33B: $500\text{ }\mu\text{M}$ tBHP for 3 t gruppen, R/G er

1,08±0,11; figur 33C: 1 µM SS-31 for 4 t + 500 µM tBHP for 3 t gruppen, R/G er 2,38±0,18. Figur 33D er et kart som sammenlikner fluorescensforholdet for forskjellige grupper. *P<0,01, C vs. B.

5 Figur 34 viser effekten av SS-31 på celleapoptose induisert av 250 µM tBHP i 24 t. Figur 34A: kontrollgruppe; (Q2+Q4)%=1,27±0,3 %; figur 34B: 250 µM tBHP for 24 t gruppen; (Q2+Q4)%=15,7±0,6 %; figur 34C: 1 µM SS-31 i 4 t + 250 µM tBHP for 24 t gruppen; (Q2+Q4)%=8,4±0,8 %. Figur 34D er et skjema som sammenlikner fluorescensforholdet for forskjellige grupper. *P<0,05 C vs. B. Figur 35 er et kart som
10 viser MDA-nivået induisert av tBHP i 3 grupper av RPE-celler. (*P<0,05).

Kollektivt demonstrerer disse resultatene av SS-31 forebygger oksidativt stress i primære netthinnepigmentepitelceller. Følgelig er aromatisk-kationiske peptider ifølge foreliggende oppfinnelse nyttige i metoder for forebygging eller behandling av skade
15 på netthinneceller i humane individer.

Eksempel 5 – Forebygging og behandling av koroidal neovaskularisering av aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen i en CNV musemodell

For å ytterligere demonstrere forebygging av koroidal neovaskularisering (CNV), og
20 behandling av CNV ble de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen testet på en musemodell av CNV (figur 24). CNV ble induisert i øyet med laserbrannså. Metodene nyttige i foreliggende studie er blitt beskrevet av Reich, *Mol Vis* 2003; 9:210-216.

25 Kort fortalt ble fem til seks uker gamle C57BL/6 hannmus bedøvd med kloralhydrat, og pupillene ble dilatert med tripikamid. Med et dekkglass anvendt som en kontaktlinse, ble fire laserflekker (532 nm, 260 mw, 0,01 s, 50 µm; Novus Spectra, Lumenis, USA) applisert på fundus i en sirkel rundt den optiske skiven i høyre øye. Daglige intraperitoneale injeksjoner av 1 mg/kg, 9 mg/kg SS-31 eller bærer ble
30 startet dagen før laserfotokoagulasjon.

Etter én uke ble musene dypt bedøvd og perfusert gjennom venstre ventrikel med 1 ml (50 mg/ml) av PBS-bufret fluoresceindekstran. Øynene ble gravd ut og fiksert i 4 % paraformaldehyd i 2 t. Øynene ble kuttet ved ekvator, og anteriorhalvdelen og
35 netthinnen ble fjernet. Posterior lyesegmentet inneholdende sklera og koroid ble dissektert i fire deler ved fire til fem radialkutt, og applisert på et objektglass. Alle flate deler ble undersøkt med et fluorescensmikroskop (AxioCam MRC; Carl Zeiss).

Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) ble anvendt for å måle området av hver CNV-lesjon.

Det var 48 tilstedeværelser av neovaskularisering i hver gruppe. Området med neovaskularisering ble beregnet ved anvendelse av IMAGE-PROLUS 6.0 programvare. Området med neovaskularisering i CNV-modellen, 1 mg/kg SS-31 og 9 mg/kg SS-31 grupper var henholdsvis $0,0130 \pm 0,0034$, $0,0068 \pm 0,0025$, $0,0067 \pm 0$. Disse resultatene indikerer at de to konsentrasjonene av SS-31 reduserte betydelig området med koroidal neovaskularisering ($P < 0,05$) (figur 24).

Eksempel 6 – Forebygging og behandling av oksygenindusert retinopati (OIR) til aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen i en OIR musemodell

For å ytterligere demonstrere forebygging av oksygenindusert retinopati (OIR), ble aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen testet på en musemodell av OIR (figur 25). I denne modellen ble 7 dager gamle museunger med delvis utviklet netthinnevaskulatur utsatt for hyperoksi (75 % oksygen) i 5 dager, som stopper netthinneårevekst, og forårsaker betydelig vasoobliterasjon. På postnatal dag 12, ble ungene returnert til romluft, og på postnatal dag 17, oppstod en florid kompensatorisk netthinneneovaskularisering. Denne modellen av patologisk neovaskularisering er ofte blitt brukt som en erstatning for proliferativ diabetisk retinopati (DR).

For å undersøke effektene av aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen for forebygging av OIR, ble OIR indusert i museunger, og musene ble samtidig administrert et aromatisk-kationisk peptid (f.eks. SS-20 eller SS-31) i omtrent 6 uker. Resultatene er vist i figur 26, og indikerer at behandling med SS-31 forebygger kompensatorisk netthinneneovaskularisering. Følgelig er de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen nyttige i metoder for forebygging av proliferativ diabetisk retinopati i pattedyrindivider.

Eksempel 7 – antioksidanter reduserer fotoreseptorcelledød i en modell av retinitt pigmentosa

En stavellcespesifikk linje 661W ble oppnådd fra en musenetthinnetumor. Metoder nyttige i foreliggende studier av 661W-celler er tidligere blitt beskrevet. Se generelt Gearóid Tuohy, Sophia Millington-Ward, Paul F. Kenna, Peter Humphries og 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. Disse cellene ble dyrket for å teste effektene av de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen I forebygging eller redusering av oksidativ skade I stavceller (figur 27). For det første ble det vist at tBHP påvirket overlevelsen til 661W-celler (figur 27A). Forskjellige doser av tBHP ble administrert til cellene i 3 t. Deretter ble det vist at forskjellige doser av SS-31 reduserte tBHP-indusert 661W celledød (figur 27B).

Potensialet til SS-31 for beskyttelse overfor tap av mitokondriell levedyktighet induert av tBHP, ble 100 nmol/L SS-31 administrert til kultur av 661W celler. Resultatene er vist i figur 30, og indikerer at SS-31 i betydelig grad forøker mitokondriell levedyktighet sammenliknet med celler ikke administrert SS-31, som vist i en JC-1-analyse.

Referanseeksempel 8 – Effekter av SS-31 i en musemodell for netthinne degenerasjon

For ytterligere å demonstrere forebygging av netthinne degenerasjon ble aromatisk-kationiske peptider ifølge oppfinnelsen testet i en musemodell på netthinne degenerasjon. CNV ble induert i øyet med laserbrenninger (se eksempel 5). Musemodeller for netthinne degenerasjon er blitt undersøkt i mange år for å forstå årsakene til fotoreseptorcelledød. Naturlig forekommende musemutanter som manifesterer degenerasjon av fotoreseptorer i netthinnen med bevaring av alle andre netthinne celler typer er blitt funnet: netthinne degenerasjon (tidligere *rd*, identisk med stavfrie netthinner, *r*, nå *Pde6b rd1*); Purkinje celledegenerasjon (*pcd*); nervøs (*nr*); netthinne degenerasjon sakte (*rds*, nå *Prph Rd2*); netthinne degenerasjon 3 (*rd3*); motornevron degenerasjon (*mnd*); netthinne degenerasjon 4 (*Rd4*); netthinne degenerasjon 5 (*rd5*); vitiligo (*vit*, nå *Mitf mi-vit*); netthinne degenerasjon 6 (*rd6*); netthinne degenerasjon 7 (*rd7*); nevronal ceroid lipofuscinosis (*nclf*); netthinne degenerasjon 8 (*rd8*); netthinne degenerasjon 9 (*Rd9*); netthinne degenerasjon 10 (*rd10*); og kjeglefotoreseptorfunksjonstap (*cpfl1*).

Figur 28 er en serie av mikrografer som viser tykkelsen til netthinne ytre nukleære lag (ONL) i en musemodell på netthinne degenerasjon i kontroll- og SS-31-behandlede mus. Resultatene indikerer at SS-31-behandlede mus beholdt et større antall rader av celler i ONL sammenliknet med ubehandlede mus. Netthinne flate oppstillinger farget med peanøttagglutinin (PNA), som selektivt farger kjerne indre og ytre segmenter, viser også at kjeglecelleintensiteten er høyere i SS-31-behandlede mus (figur 29). Disse resultatene indikerer at behandling med SS-31 forebygget den kompensatoriske

skaden på netthinne ytre nukleære lag i en musemodell for netthinne degenerasjon. Følgelig er de aromatisk-kationiske peptidene ifølge oppfinnelsen nyttige i metoder for forebygging av netthinne degenerasjon i pattedyrindivider.

5 EKVIVALENTER

Foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset med hensyn på de bestemte utførelsesformene beskrevet i denne søknaden, som er ment som en enkel illustrasjon av de individuelle aspektene ved oppfinnelsen. Mange modifikasjoner og variasjoner på denne oppfinnelsen kan bli gjort uten å avvike fra omfanget, som vil være innlysende av fagfolk innenfor dette området. Funksjonelle ekvivalente metoder og apparaturer i tillegg til de som er angitt heri, vil være innlysende for fagfolk innenfor dette området ut fra den foregående beskrivelsen. Foreliggende oppfinnelse må bare bli begrenset med hensyn på vedlagte krav. Det er underforstått at denne oppfinnelsen ikke er begrenset til de bestemte metodene, reagensene, forbindelsessammensetningene eller biologiske systemer, som selvfølgelig kan variere. Det er også underforstått at terminologien anvendt heri har det formålet å beskrive bestemte utførelsesformer, og ikke være begrensende.

I tillegg, når trekk eller aspekter av beskrivelsen er beskrevet med hensyn på Markush-grupper, vil fagfolk innenfor dette området oppdage at beskrivelsen også er beskrevet med hensyn på individuelle medlemmer eller subgruppe av medlemmer av Markush-gruppen.

Som kjent for fagfolk innenfor dette området, for hvilket som helst eller hvilke som helst formål, spesielt med hensyn på å tilveiebringe en skrevet beskrivelse, skal alle områder beskrevet heri også omfatte hvilke som helst eller alle mulige subområder og kombinasjoner av subområder derav. Hvilke som helst oppførte områder kan lett bli oppdaget som tilstrekkelig beskrivelse og muliggjøring av at det samme området blir brutt ned i minst like halvdeler, tredjedeler, firedeler, femtedeler, tiendedeler, osv. Som et ikke-begrensende eksempel, kan hvert område diskutert heri lett bli brutt ned inn i lavere tredjedel, midtre tredjedel og øvre tredjedel, osv. Også som kjent for fagfolk innenfor dette området, inkluderer ordlyder så som "opp til", "minst", "høyere enn", "mindre enn" og liknende, numre som er angitt og refererer til områder som deretter kan bli brutt ned i subområder som diskutert ovenfor. Til slutt, som kjent for fagfolk innenfor dette området, inkluderer et område hvert individuelle medlem. Følgelig angir f.eks. en gruppe som har 1-3 celler grupper som har 1, 2 eller 3 celler.

Likeledes, en gruppe som har 1-5 celler, refererer til grupper som har 1, 2, 3, 4 eller 5 celler, og så videre.

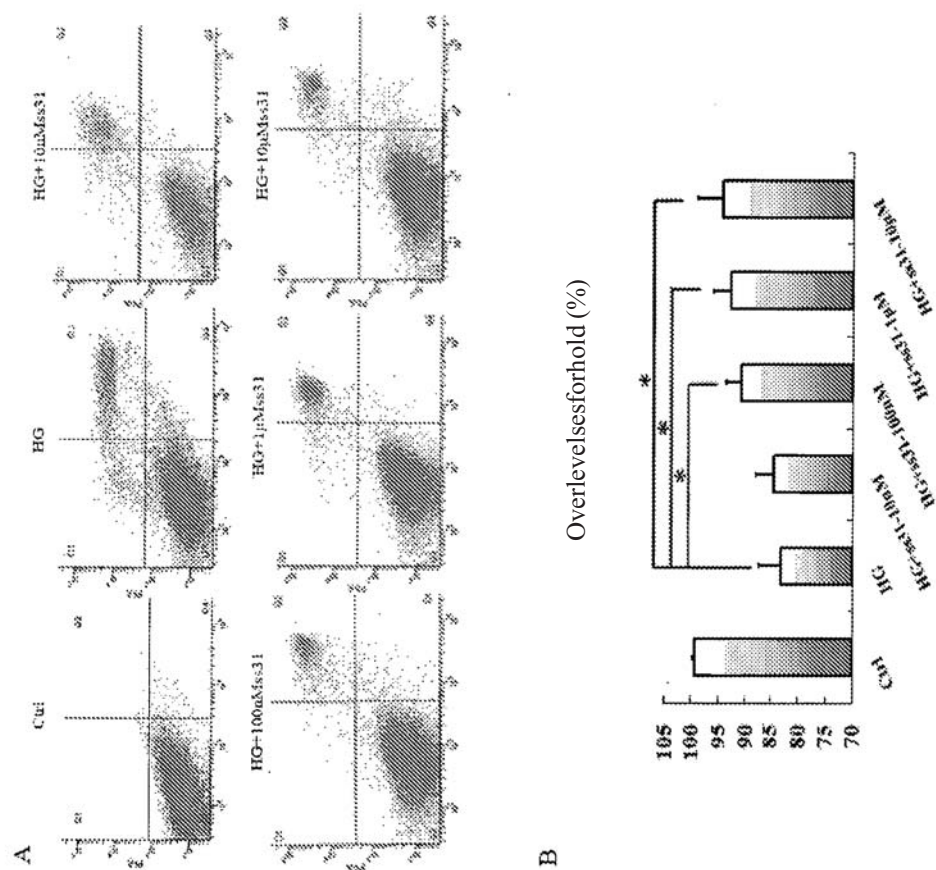
PATENTKRAV

1. Et peptid representert ved formelen D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₄ eller Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ for anvendelse for behandling eller forebygging av en oftalmisk tilstand, hvor den oftalmiske tilstanden er valgt fra gruppen bestående av: retinittpigmentosa, koroidal neovaskularisering, og oksygenindusert retinopati.
2. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor peptidet er D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂.
3. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor peptidet er Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂.
4. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor peptidet blir formulert for anvendelse med et menneske.
5. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor peptidet er formulert for å bli administrert intraokulært, iontoforetisk, oralt, topisk, systemisk, intravenøst, subkutan eller intramuskulært.
6. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor peptidet er formulert for administrering separat, etter hverandre eller samtidig med et andre aktivt middel.
7. Peptid for anvendelse ifølge krav 6, hvor det andre aktive midlet er valgt fra gruppen bestående av: et antioksidant, et metallkompleks, et anti-inflammatorisk medikament, et antibiotika, og et antihistamin.
8. Peptid for anvendelse ifølge krav 7, hvor antioksidanten er vitamin A, vitamin C, vitamin E, lysopen, selenium, α-lipoinsyre, koenzym Q, glutation, eller et karotenoid.
9. Peptid for anvendelse ifølge krav 6, hvor det andre aktive midlet er valgt fra gruppen bestående av: aceclidin, acetazolamid, anekortav, apraklonidin, atropin, azapentacen, azelastin, bakitracin, befunolol, betametason, betaxolol, bimatoprost, brimonidin, brinzolamid, karbachol, karteolol, celecoxib, kloramfenicol, klortetrasyklin, ciprofloxacin, kromoglykat, kromolyn, syklopentolat, syklosporin, dapiprazol, demekarium, deksametason, diklofenak, diklorfenamid, dipivefrin, dorzolamid, ekotiofat, emedastin, epinastin, epinefrin, erytromycin, etokszolamid, eukatropin,

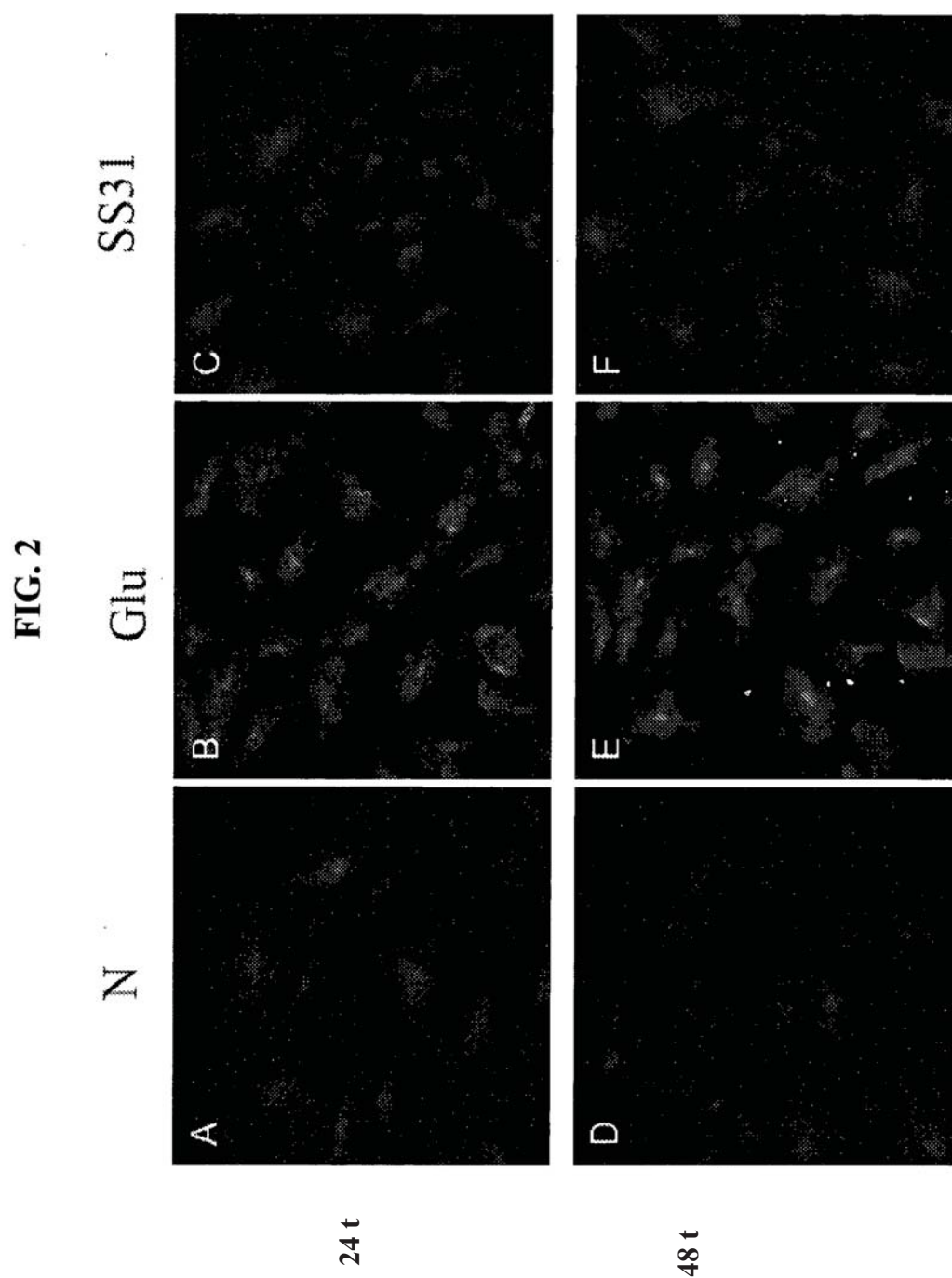
fludrokortison, fluormetolon, flurbiprofen, formivirsen, framycetin, ganciklovir, gatifloksacin, gentamycin, homatropin, hydrokortison, idoksuridin, indometacin, isoflurofat, ketorolak, ketotifen, latanoprost, levobetaksolol, levobunolol, levokabastin, levofloksacin, lodoksamid, loteprednol, medryson, metazolamid, metipranolol, 5 moksifloksacin, nafazolin, natamycin, nedokromil, neomycin, norfloksacin, ofloksacin, olopatadin, oksymetazolin, pemirolast, pegaptanib, fenylefrin, fysostigmin, pilokarpin, pindolol, pirenoxin, polymyxin B, prednisolon, proparakain, ranibizumab, rimeksolon, skopolamin, sezolamid, skvalamin, sulfacetamid, suprofen, tetrakain, tetrasyklin, tetrahydrozolin, tetryzolin, timolol, tobramycin, travoprost, triamcinulon, 10 trifluormetazolamid, trifluridin, trimetoprim, tropikamid, unoproston, vidarabin, xylometazolin, farmasøytisk akseptable salter derav, og kombinasjoner derav.

1/41

FIG. 1



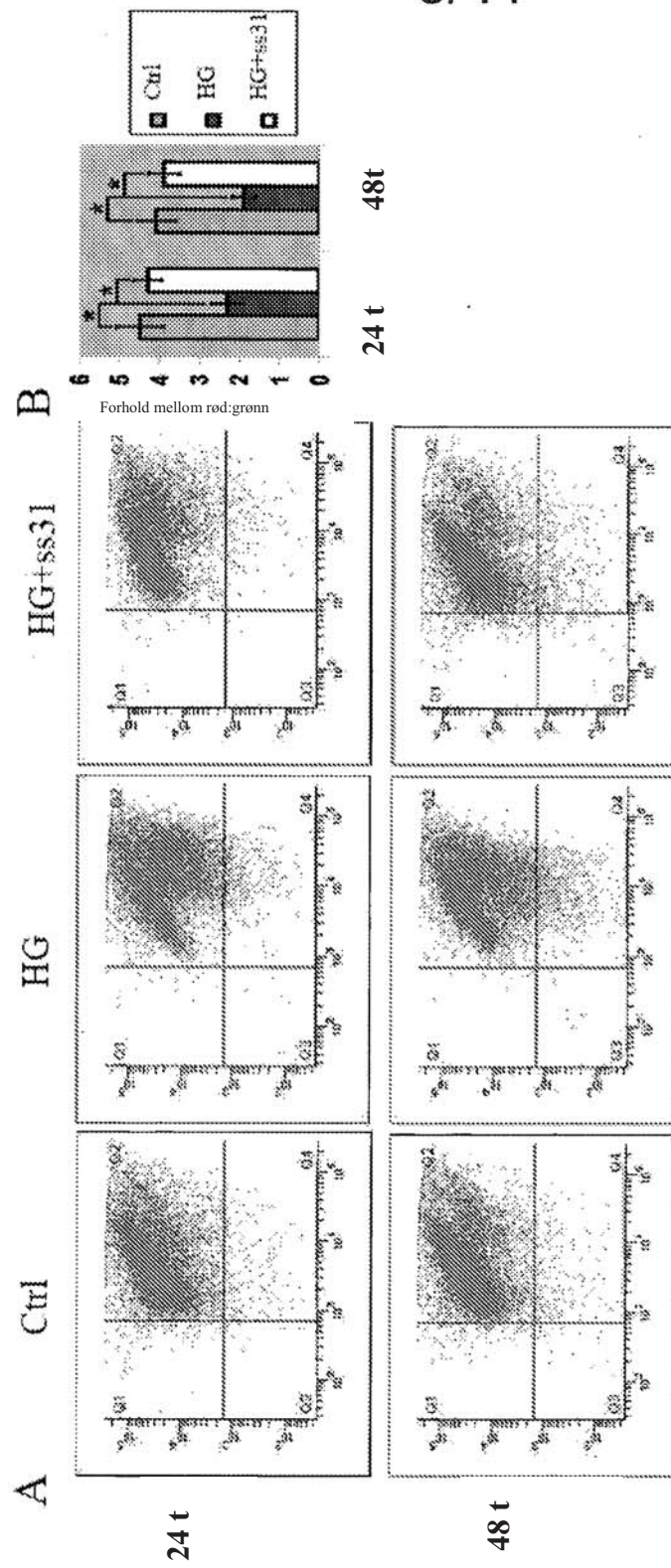
2/41



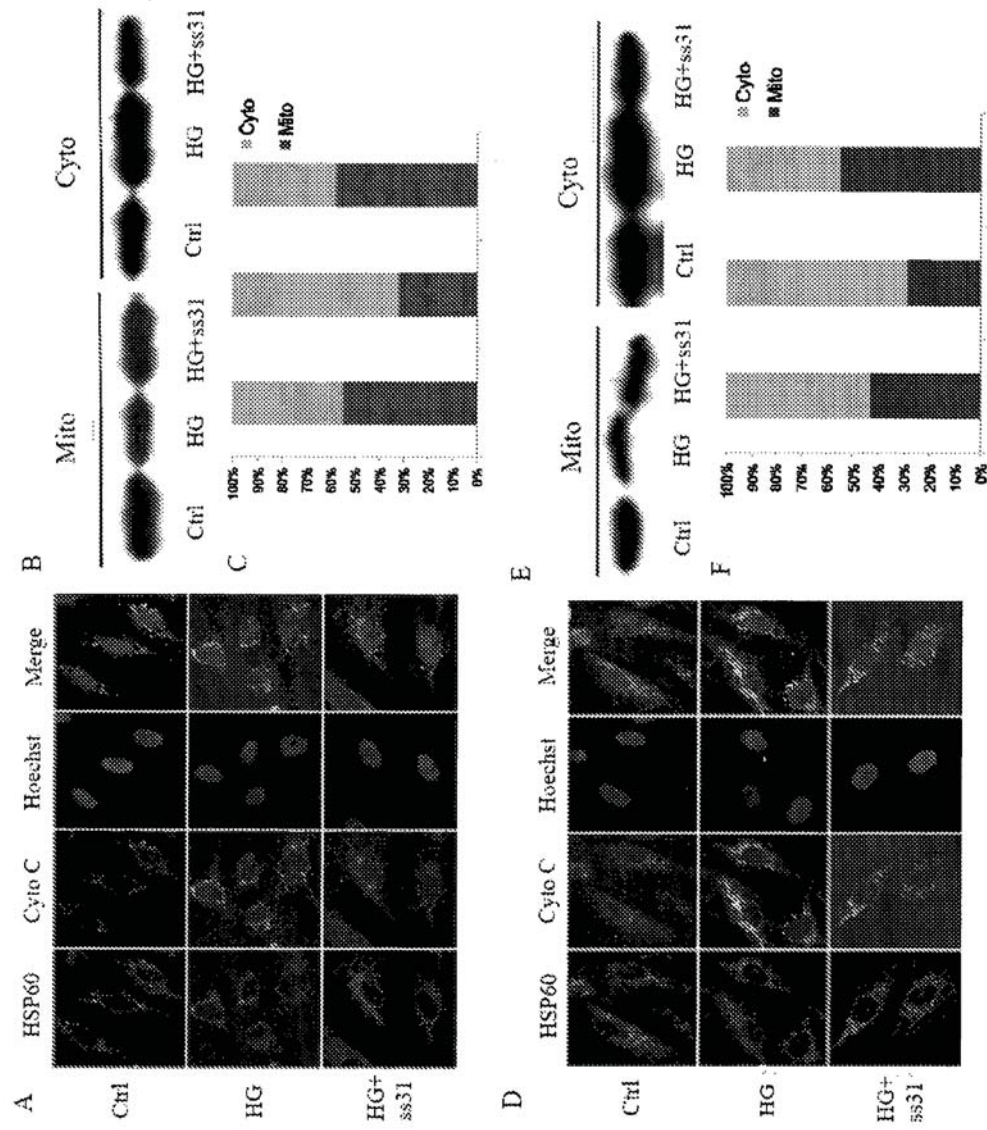
24 t

3/41

FIG. 3

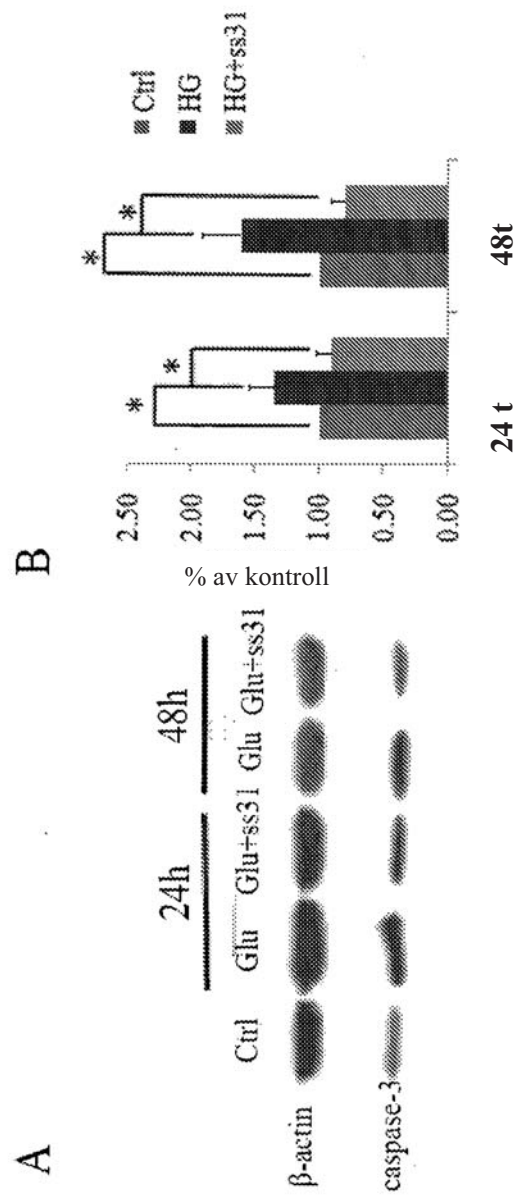


4/41

FIG. 4

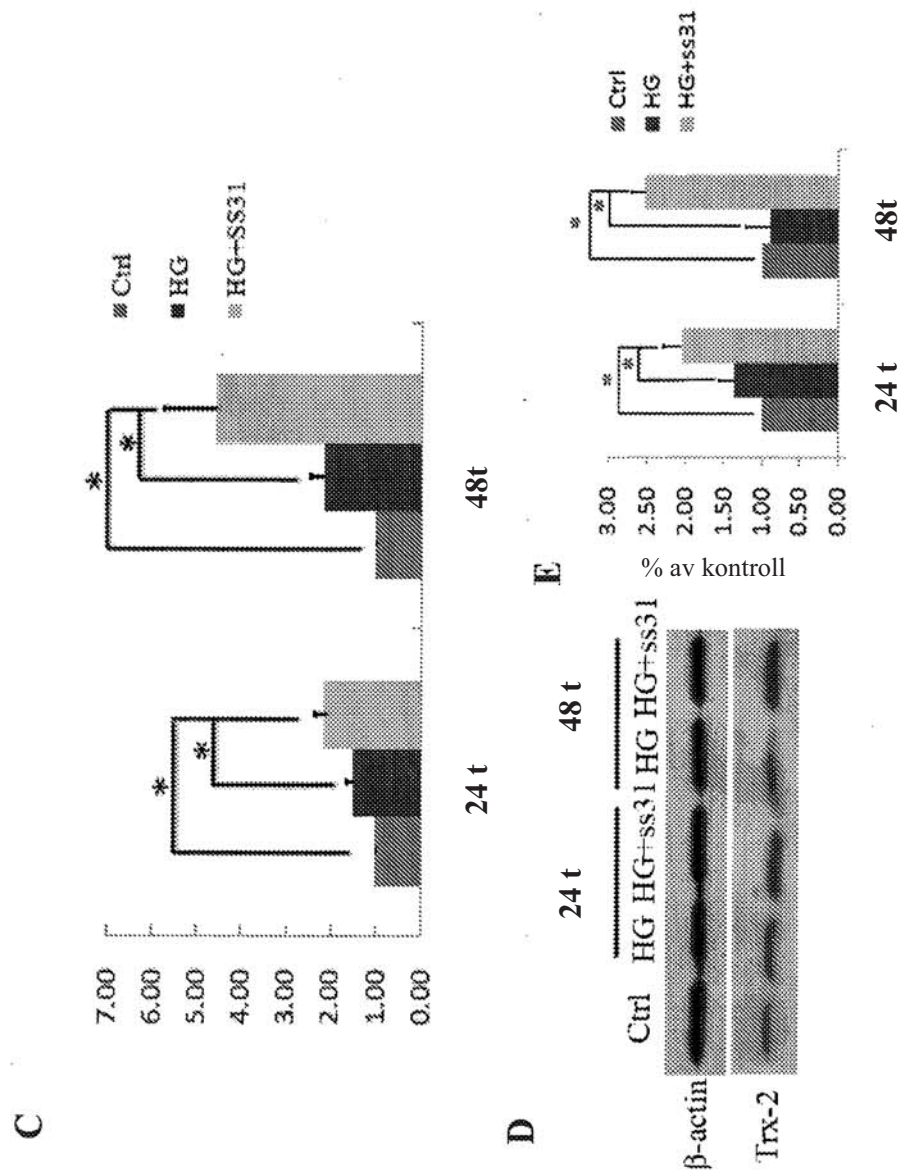
5/41

FIG. 5



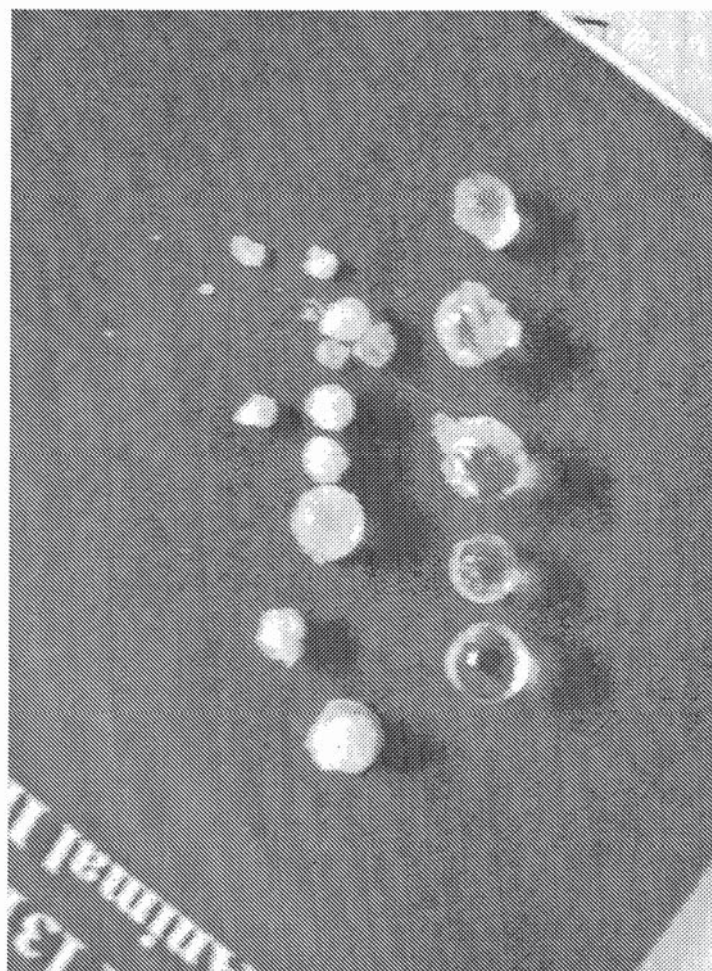
6/41

FIG 5 (FORTS.)



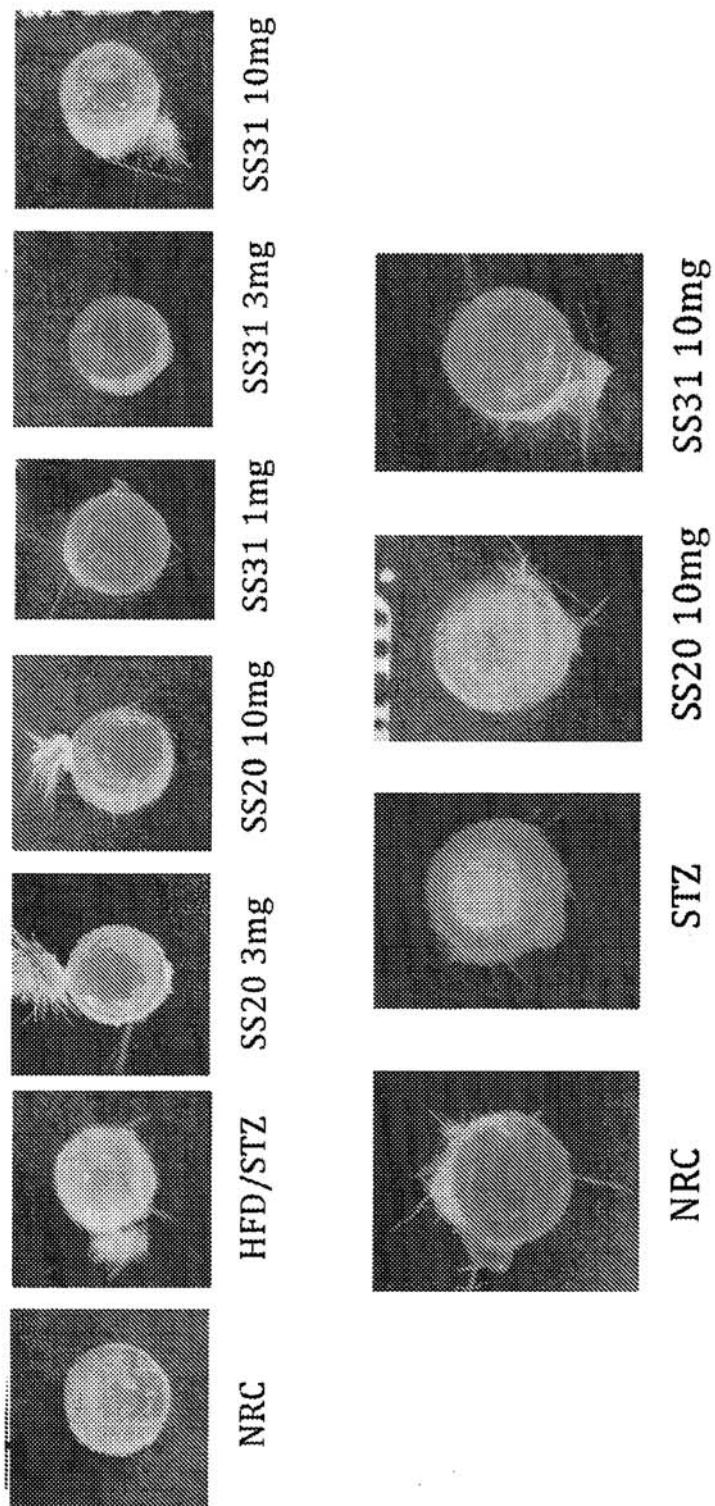
7/41

FIG. 6

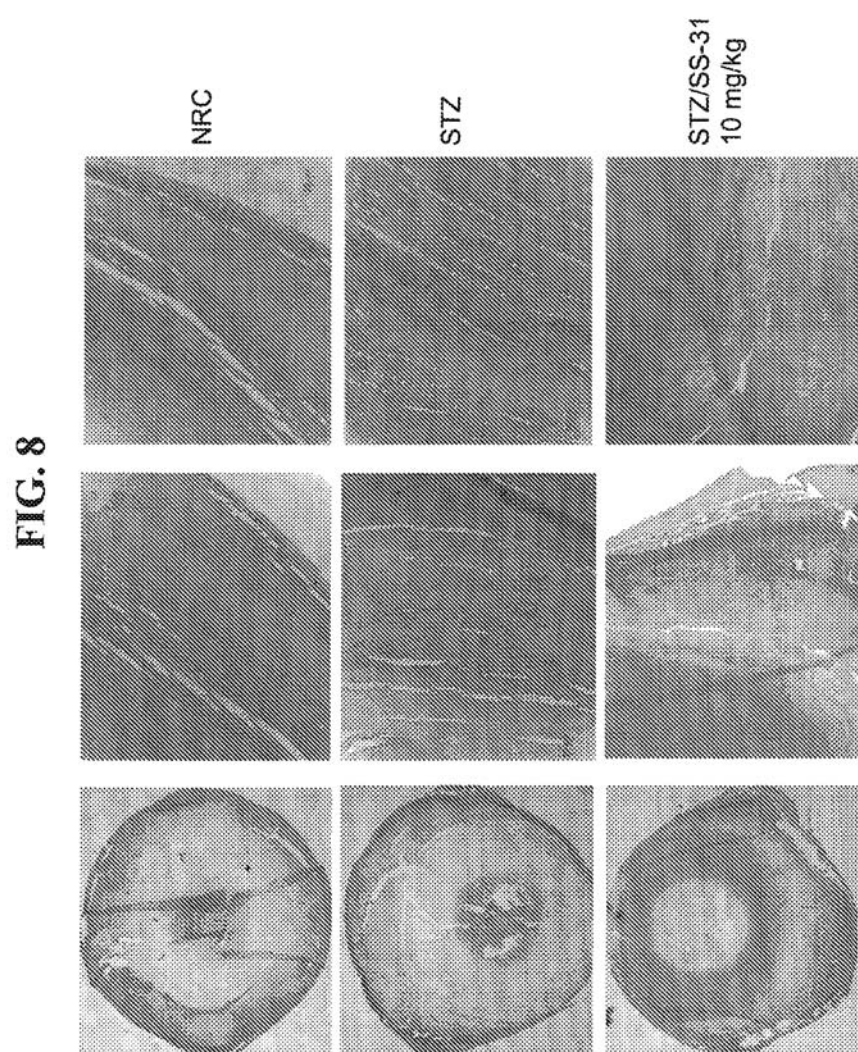


8/41

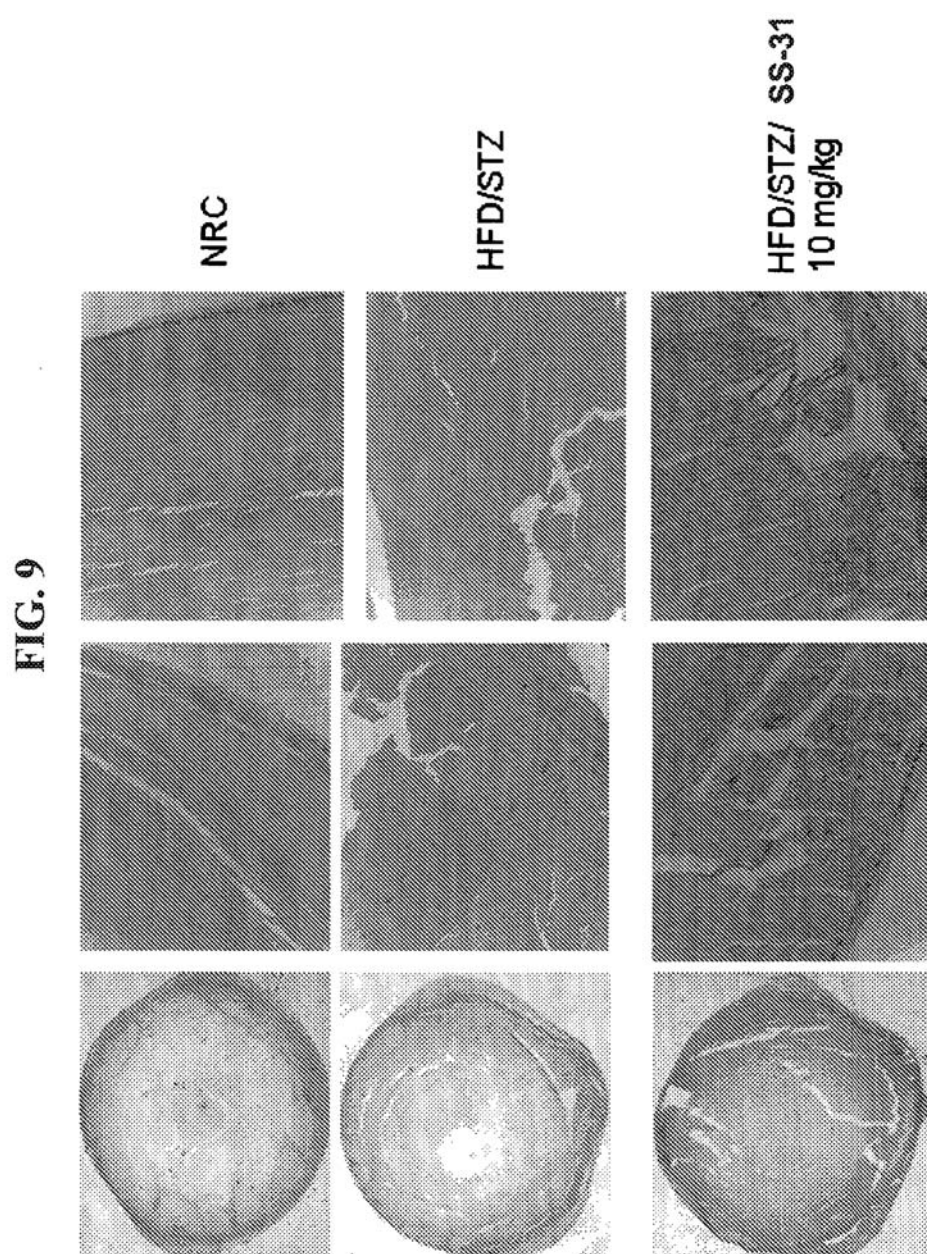
FIG. 7



9/41

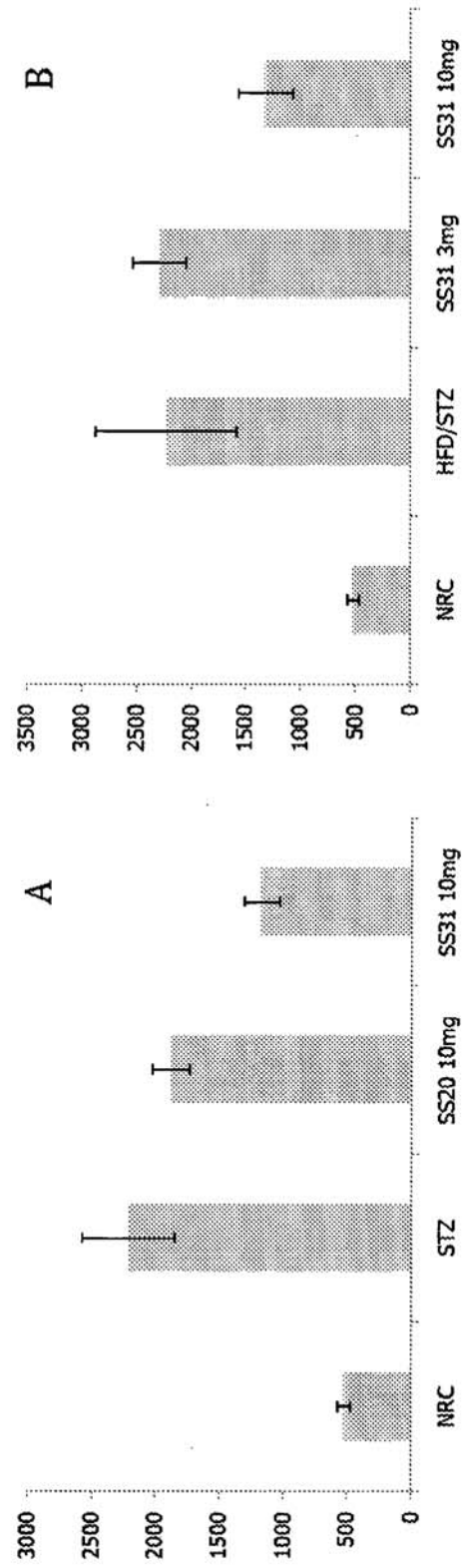


10/41



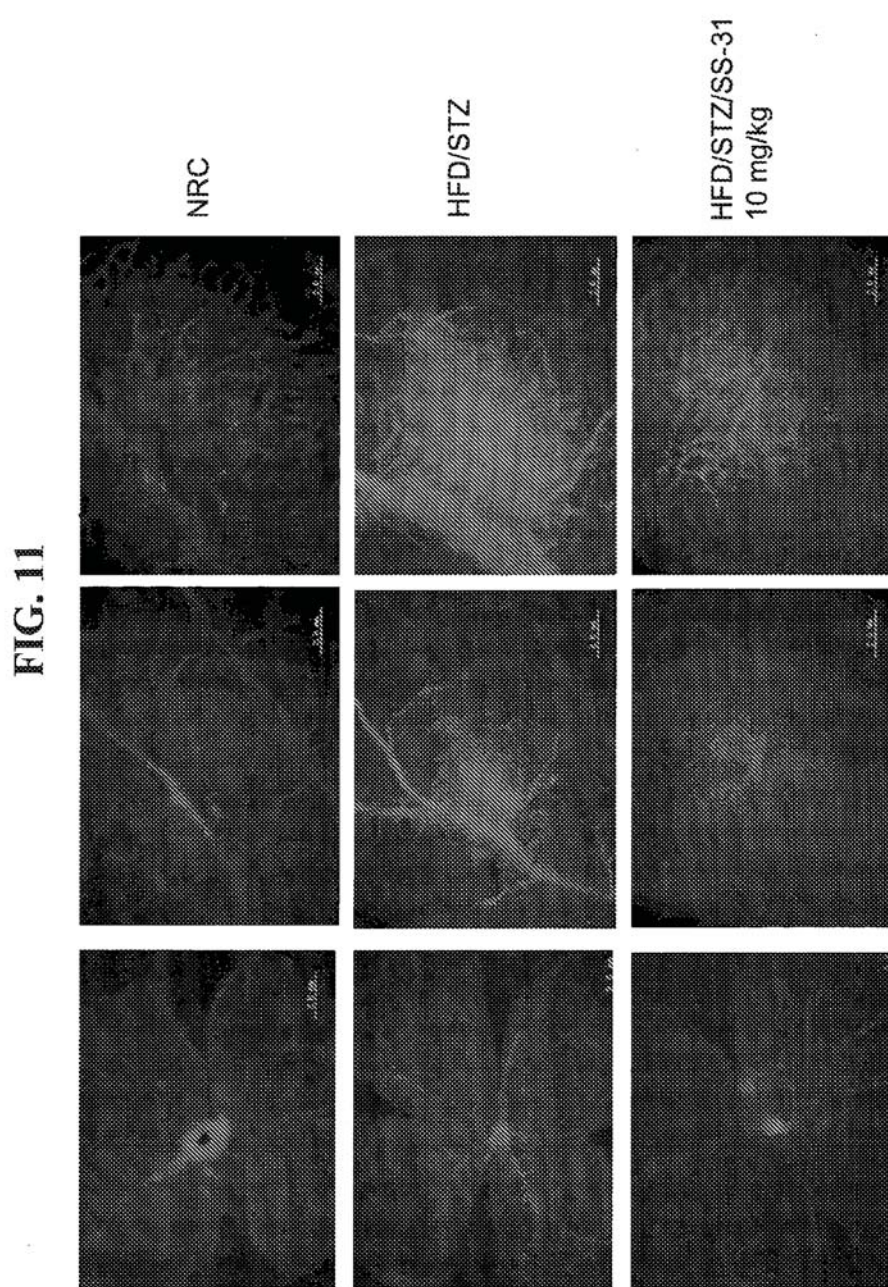
11/41

FIG. 10

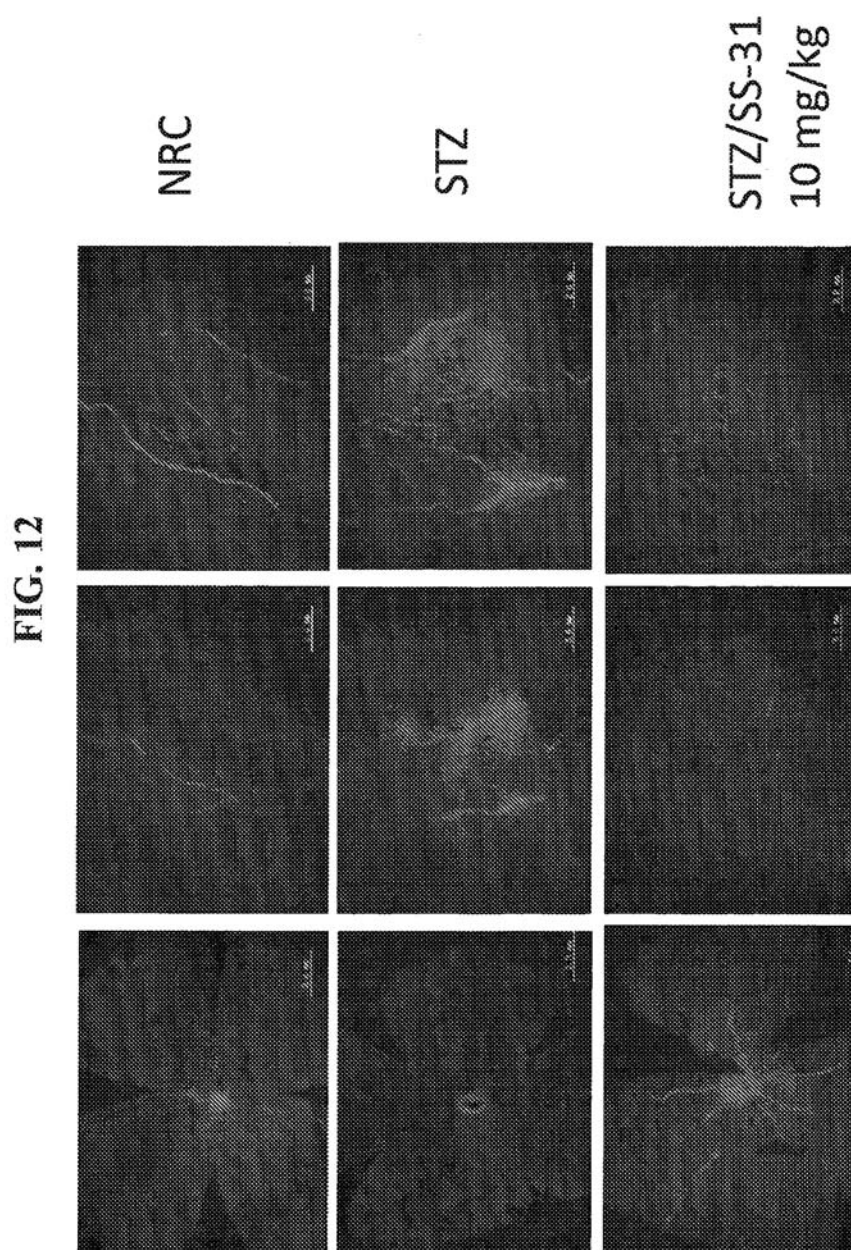


A: STZ rottemodell;
B: HFD/STZ rottemodell

12/41



13/41



14/41

FIG. 13

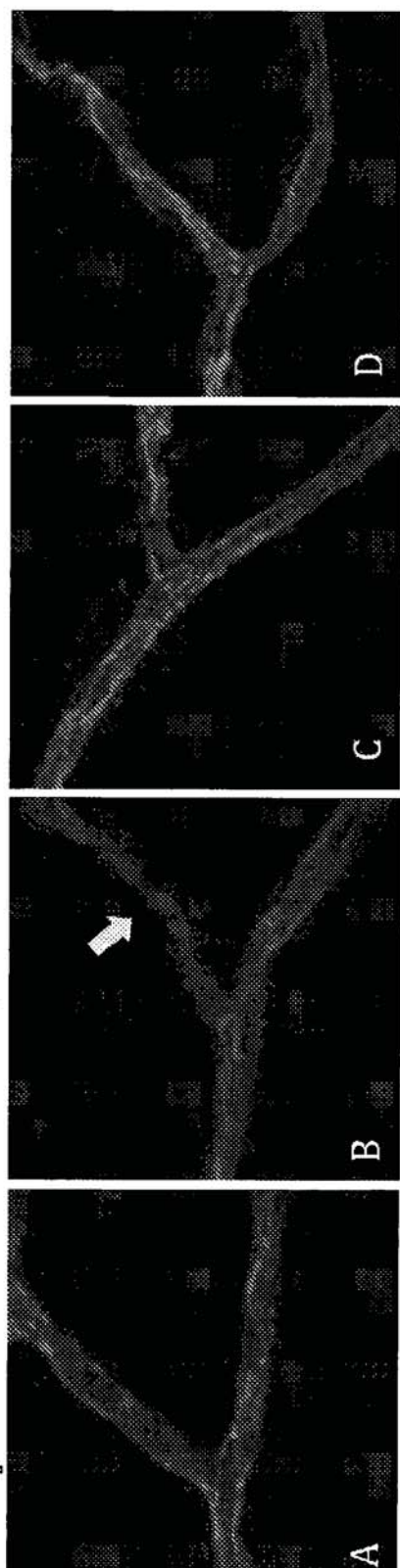
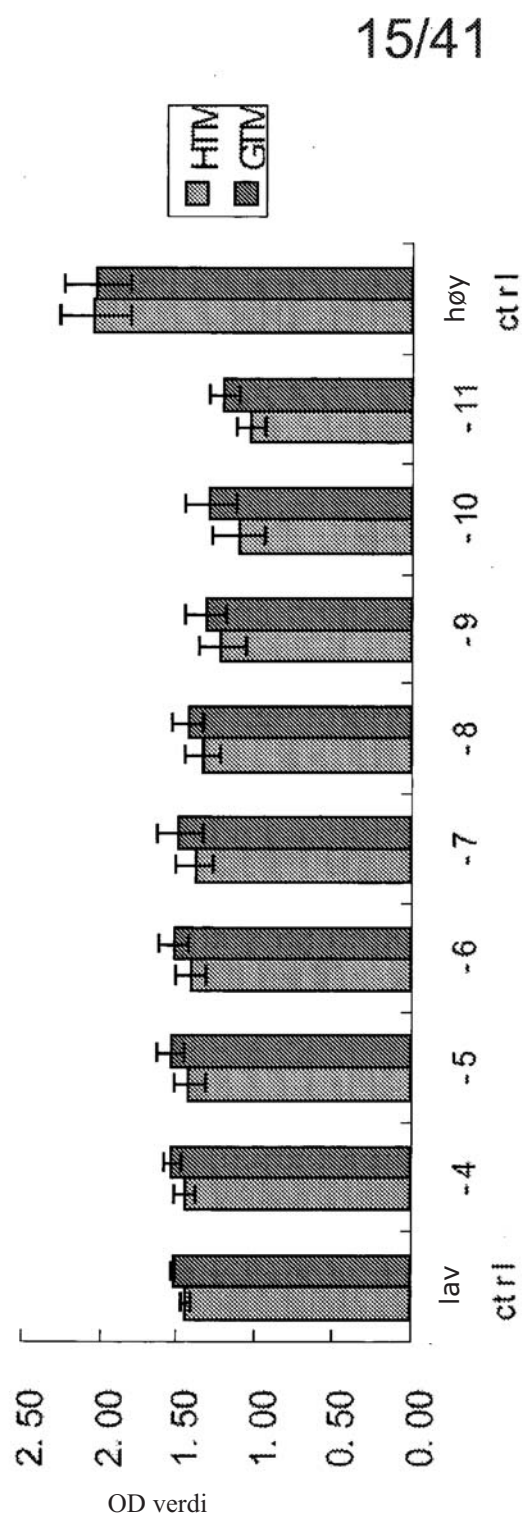
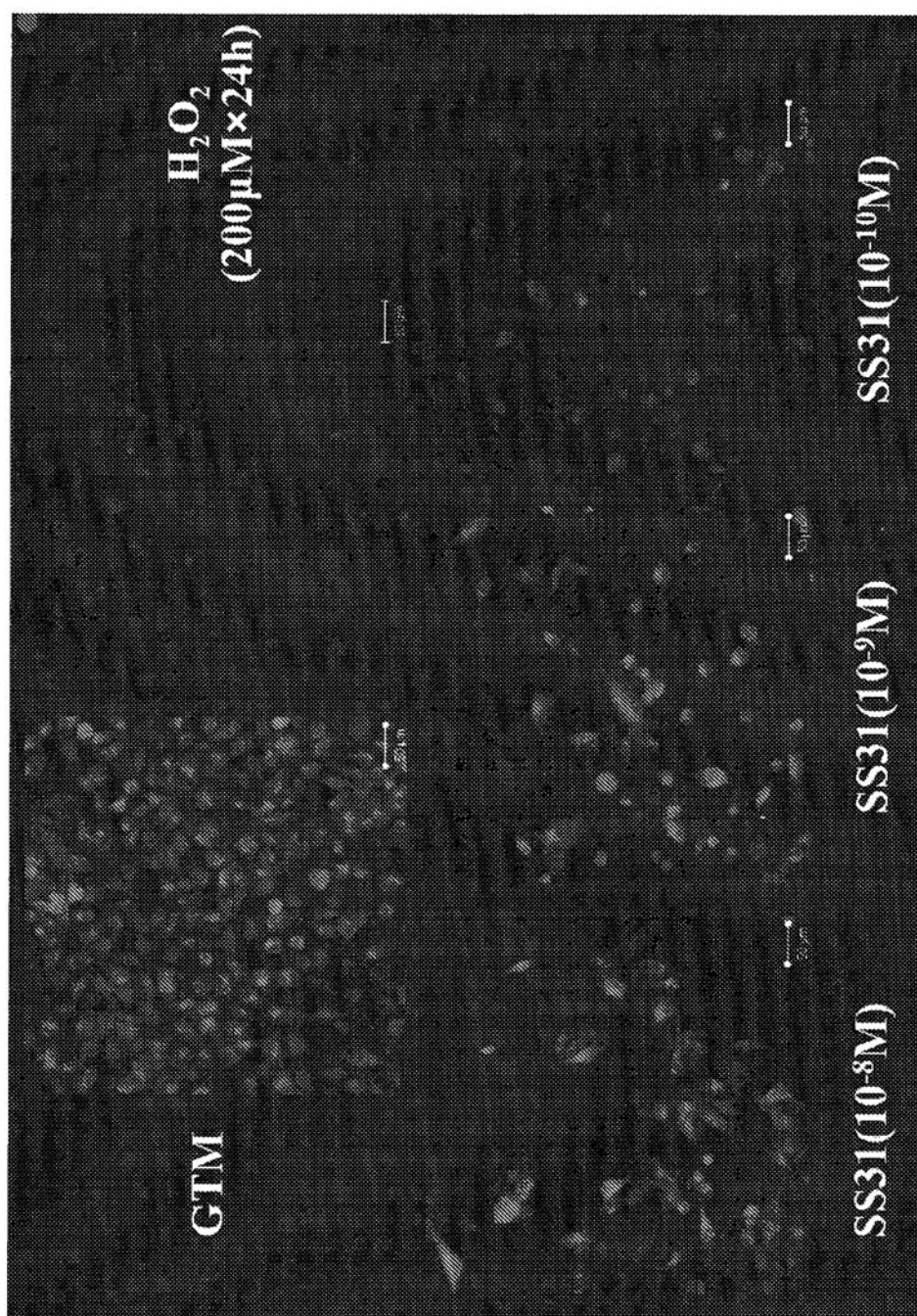


FIG. 14



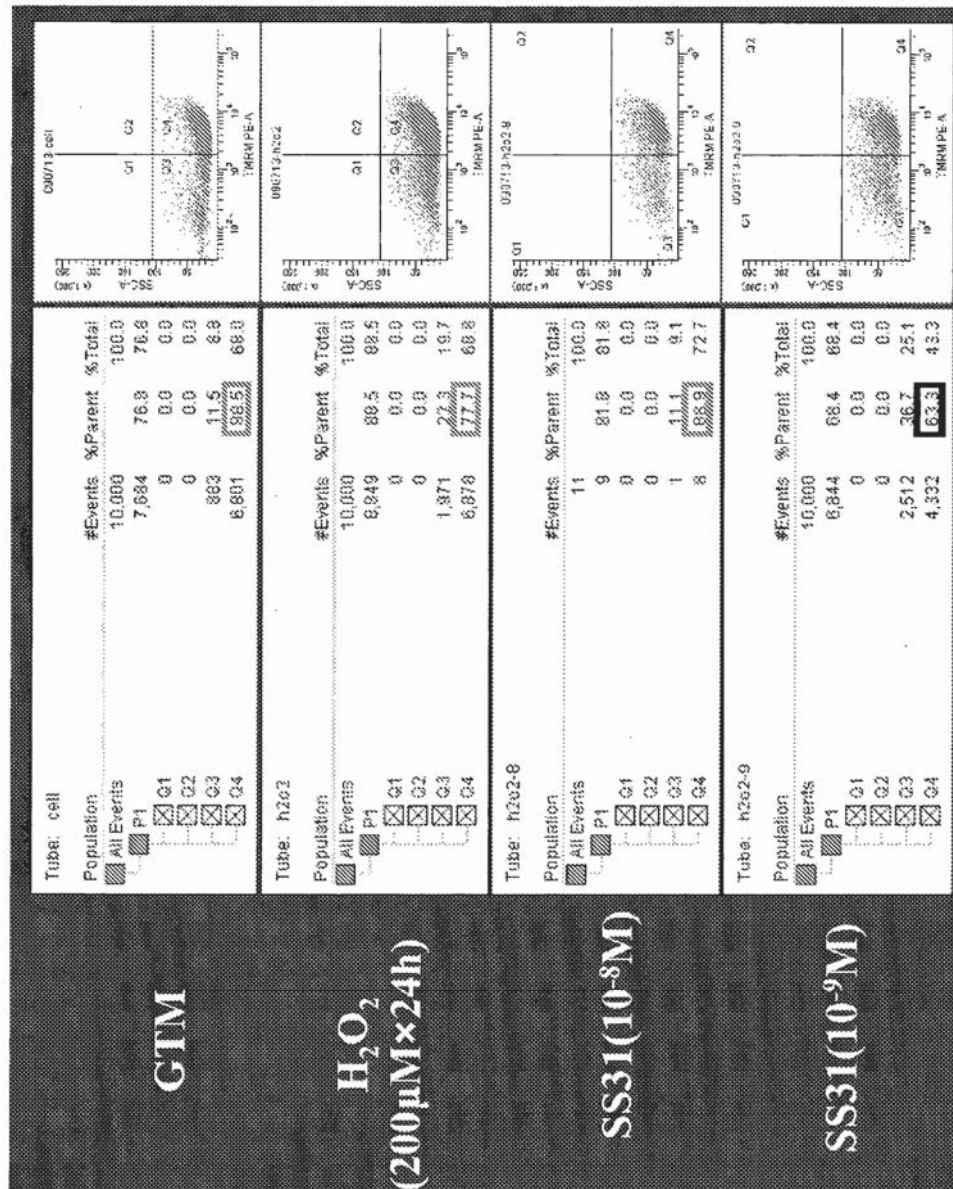
16/41

FIG. 15



17/41

FIG. 16



Oversettelse:

Tube = rør

Cell = celle

Population = populasjon

All Events = alle hendelser

Events = hendelser

Parent = opphav

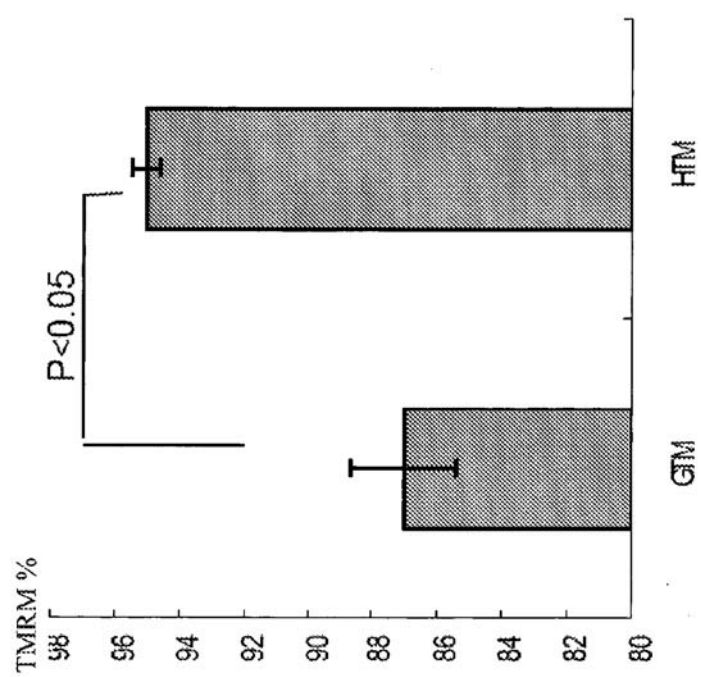
Total = totalt

5

10

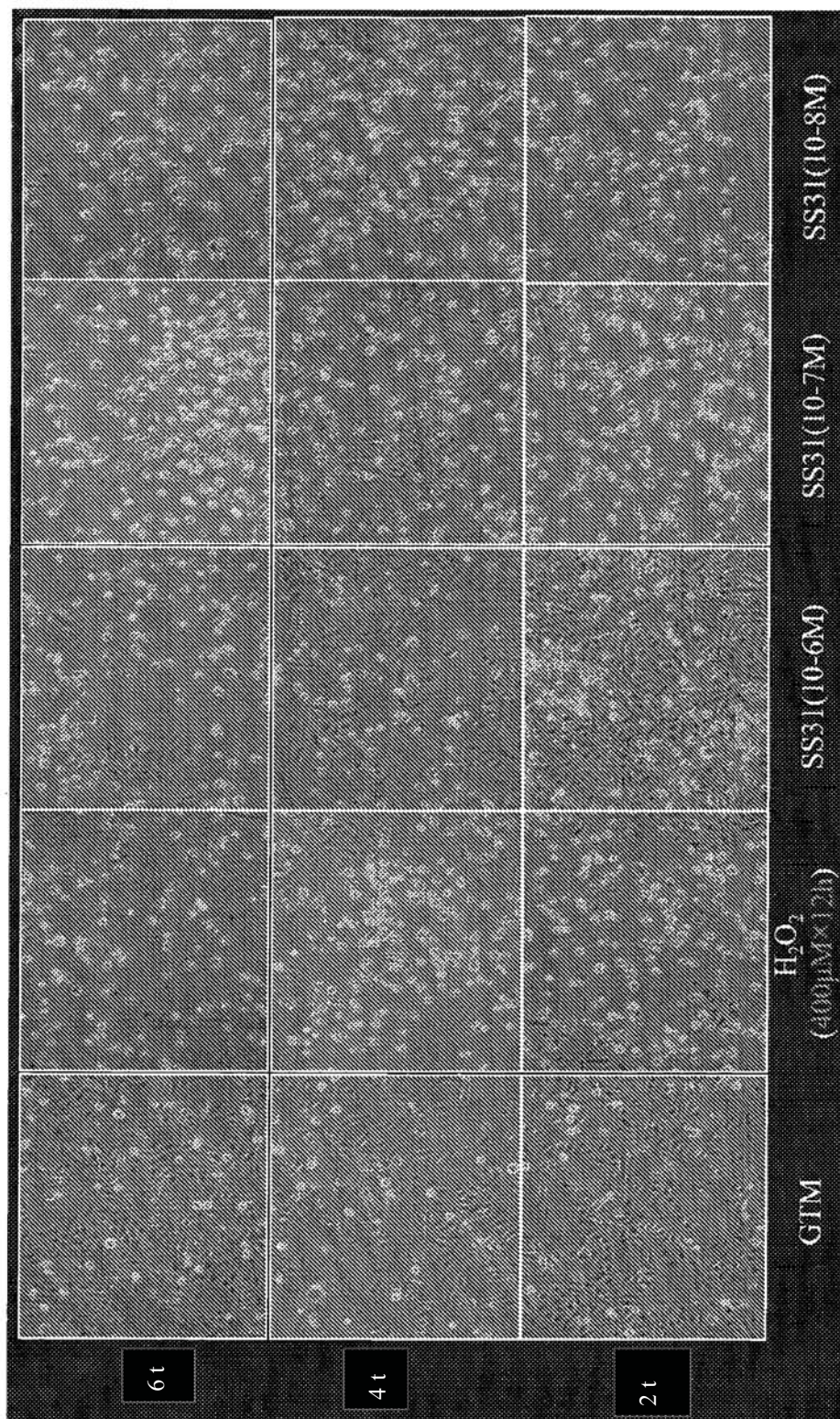
18/41

FIG. 17



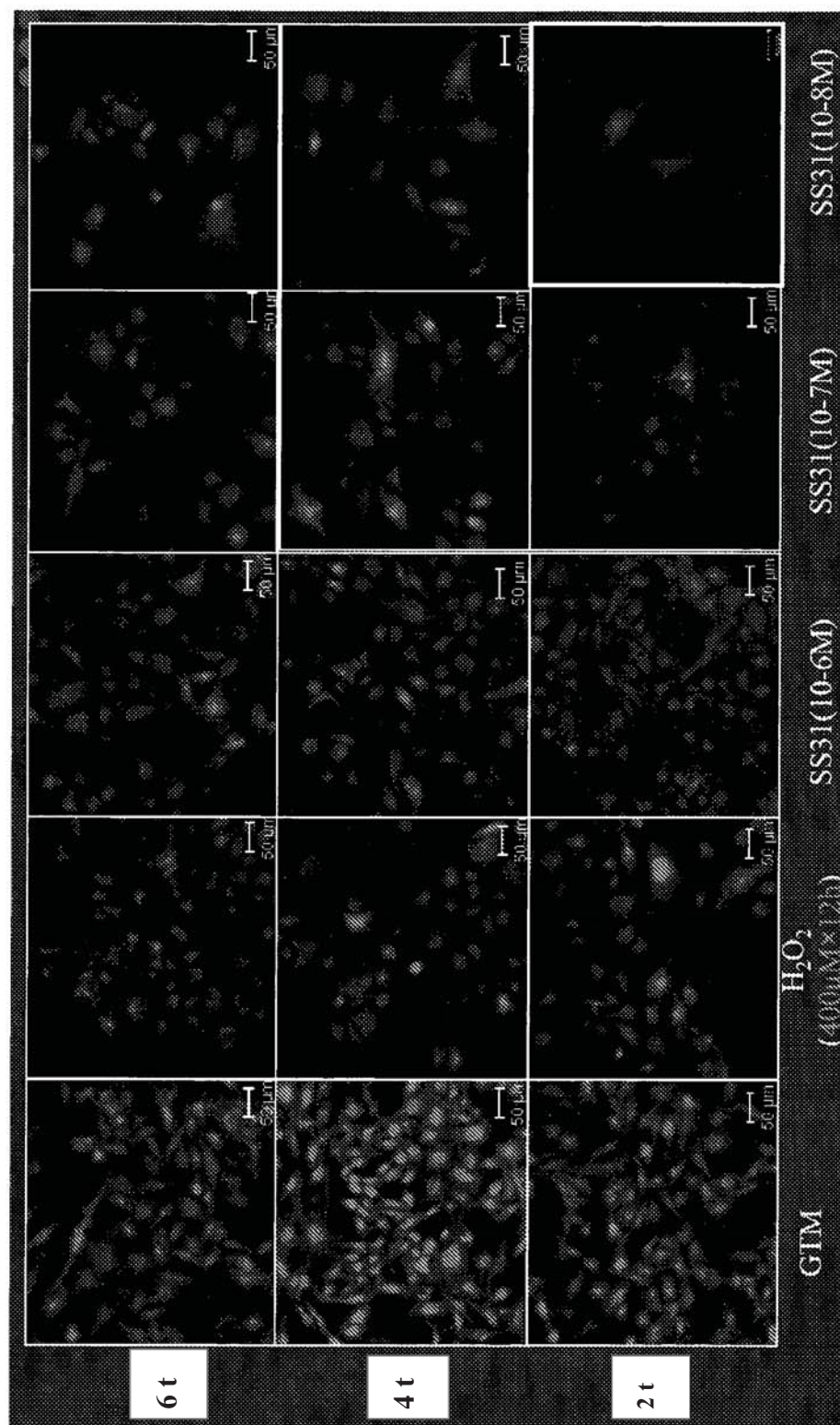
19/41

FIG. 18



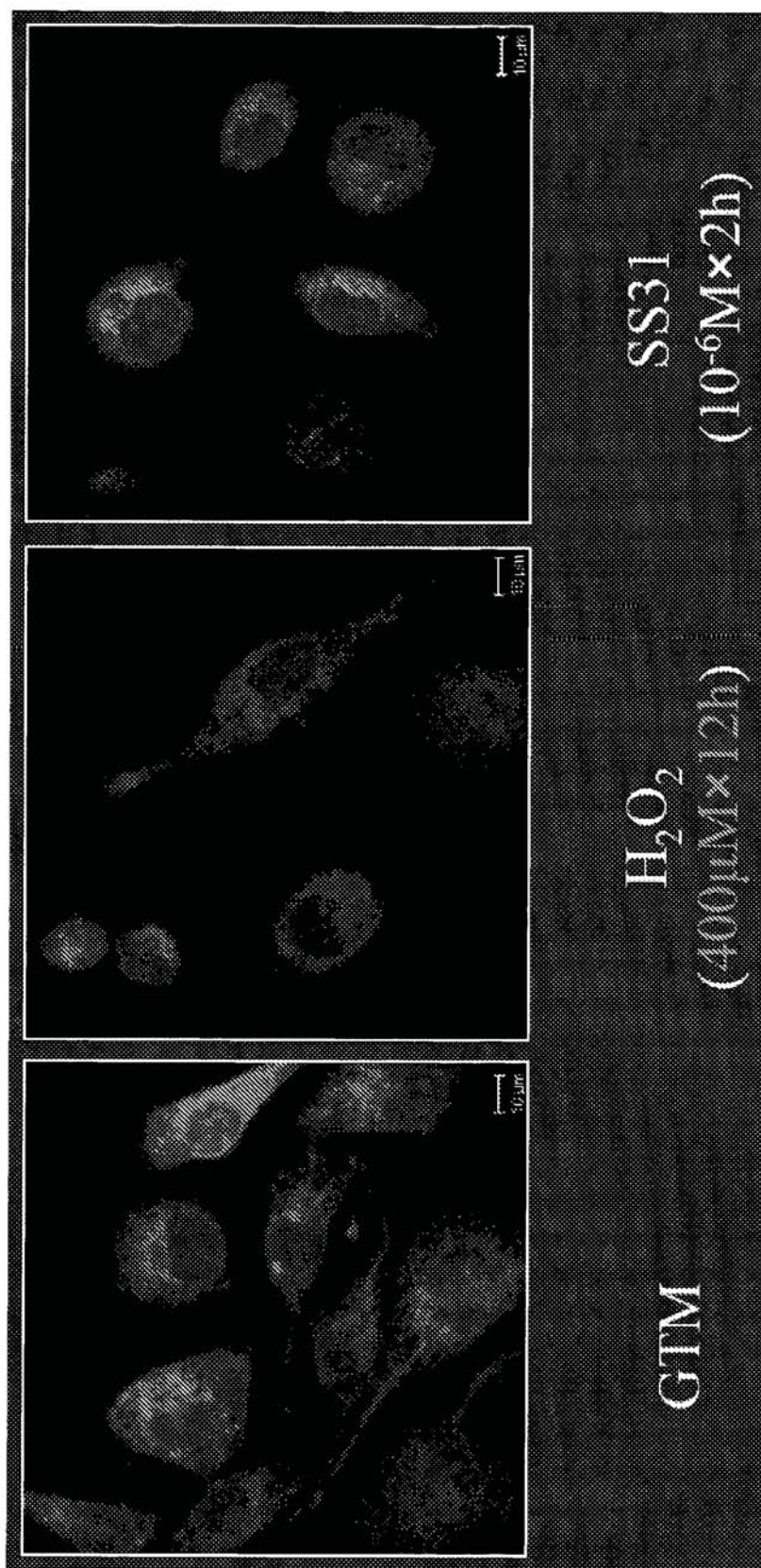
20/41

FIG. 19

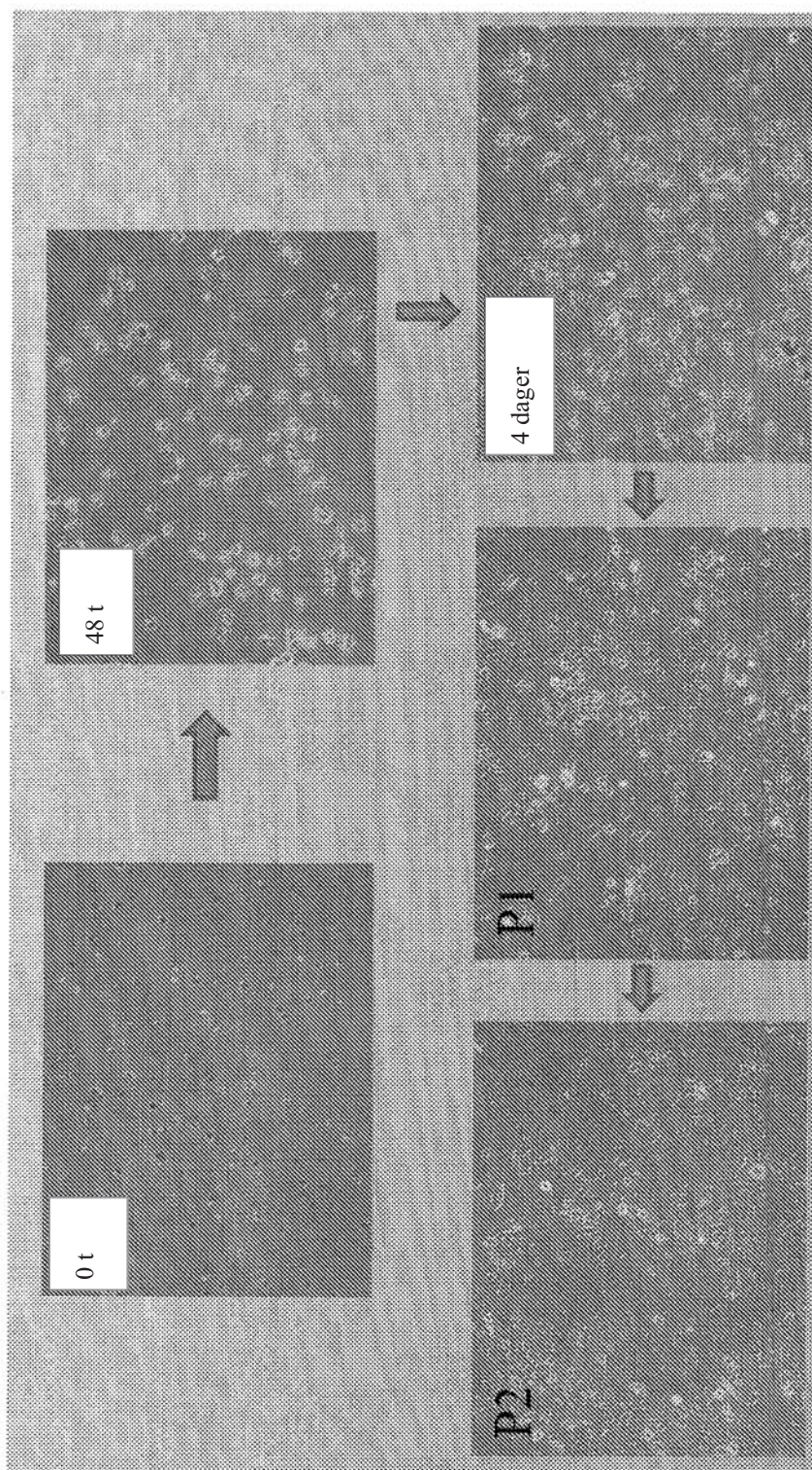


21/41

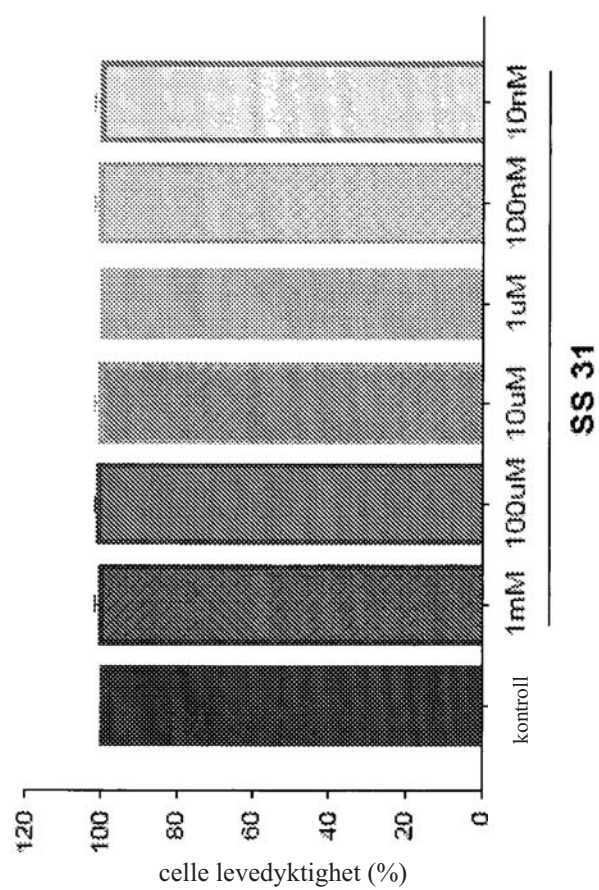
FIG. 20



22/41

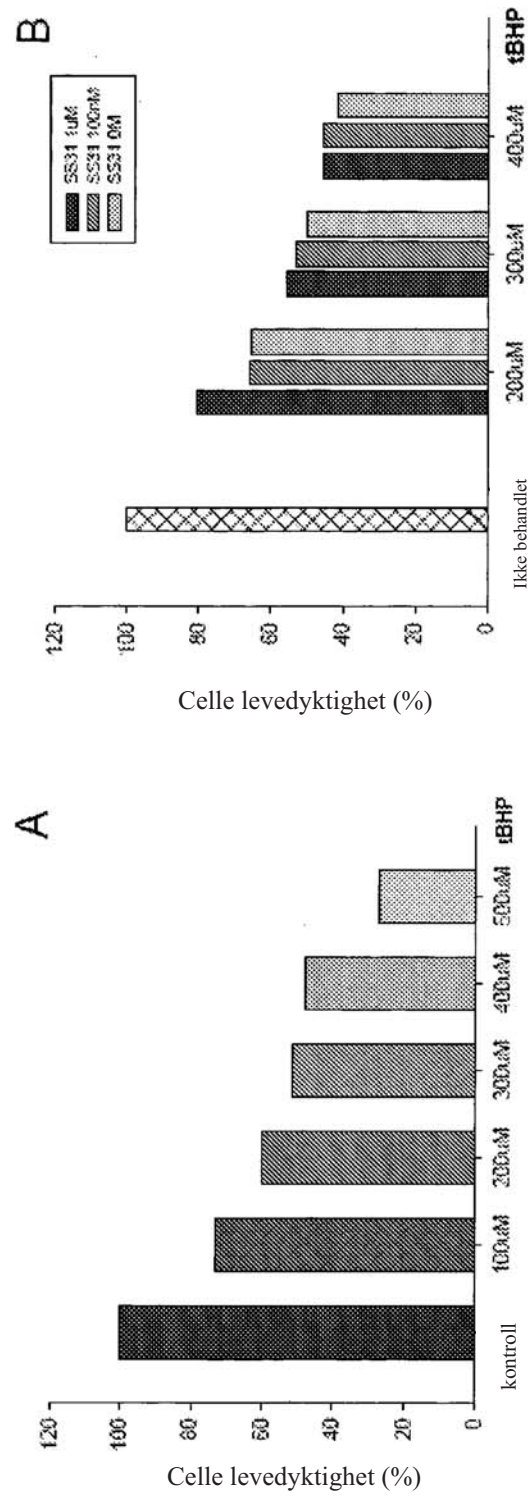
FIG. 21

23/41

FIG. 22

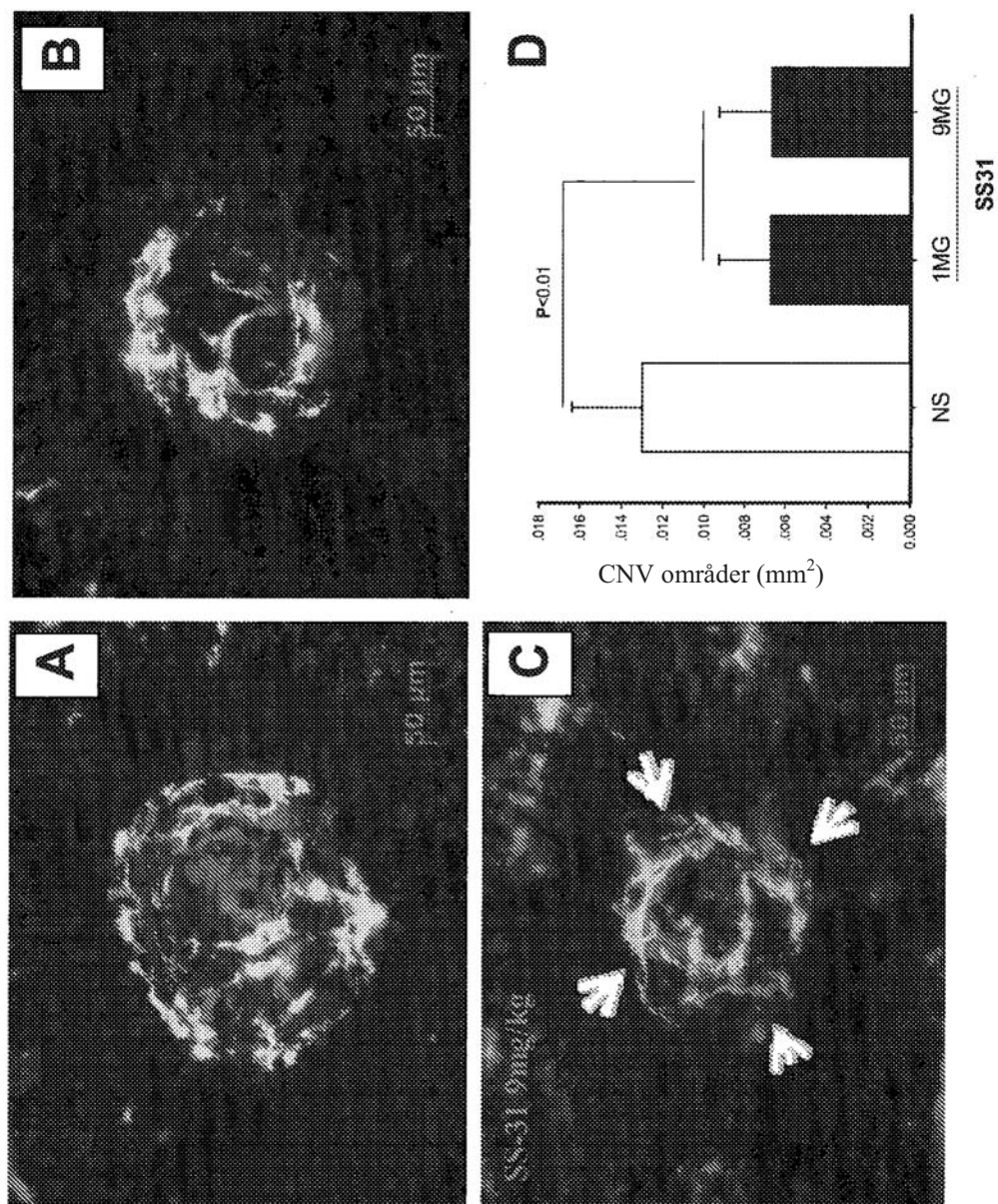
24/41

FIG. 23



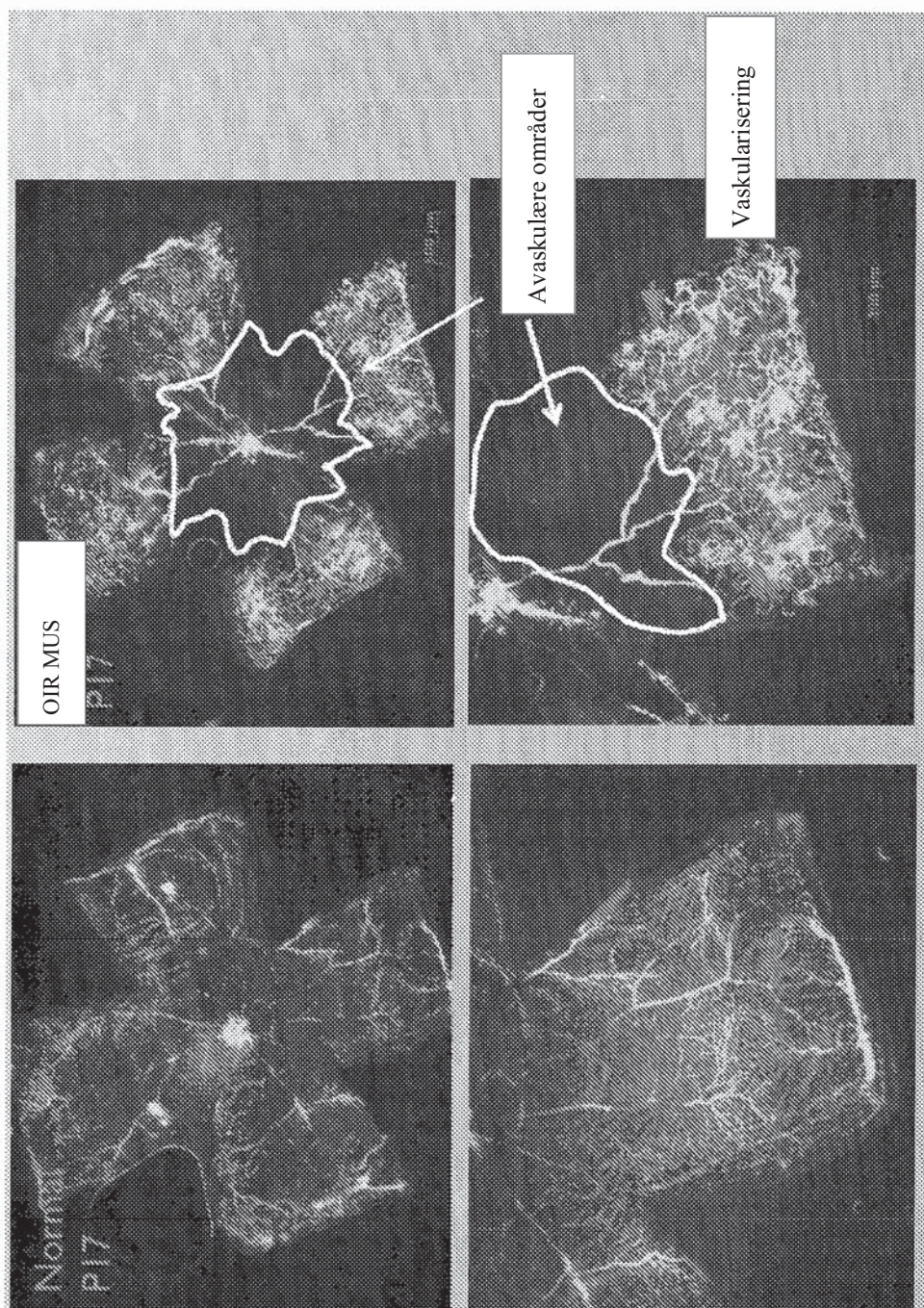
25/41

FIG. 24



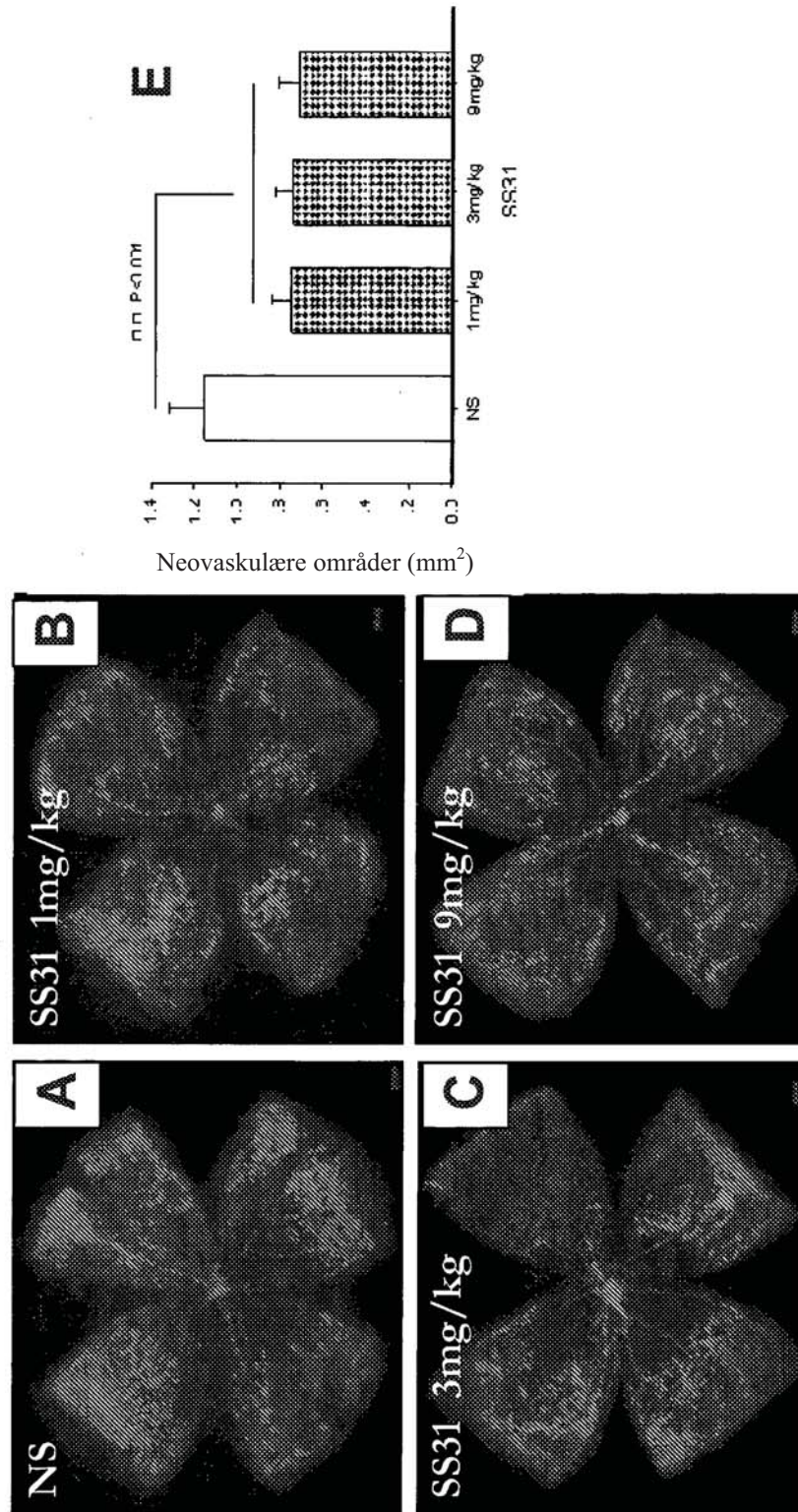
26/41

FIG. 25



27/41

FIG. 26



28/41

FIG. 27A

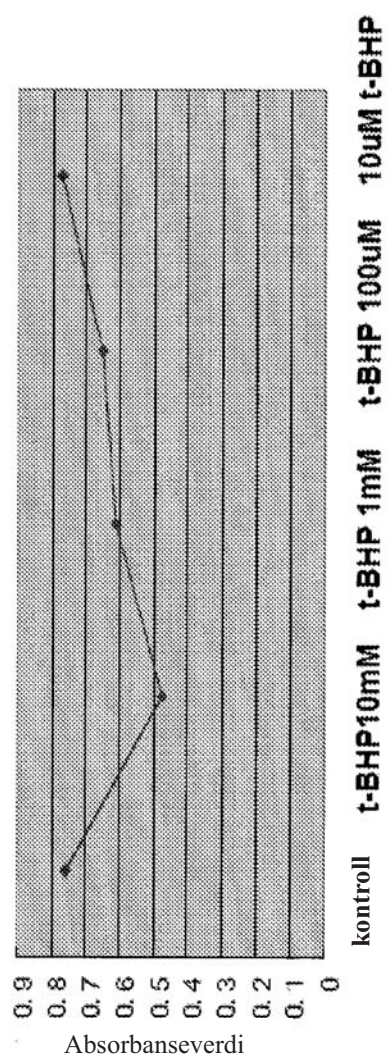


FIG. 27B

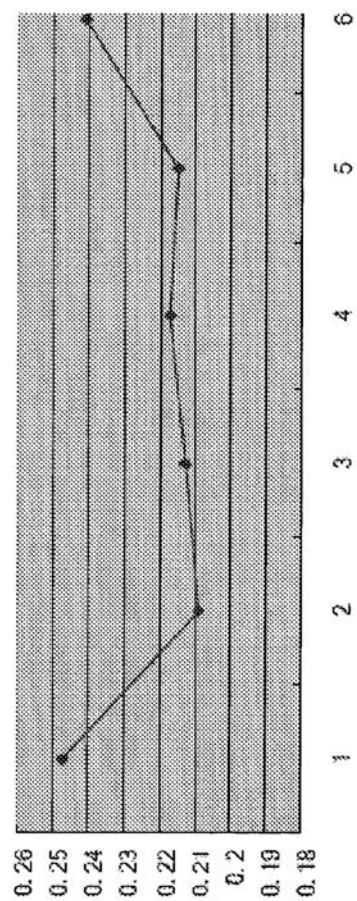


FIG. 28

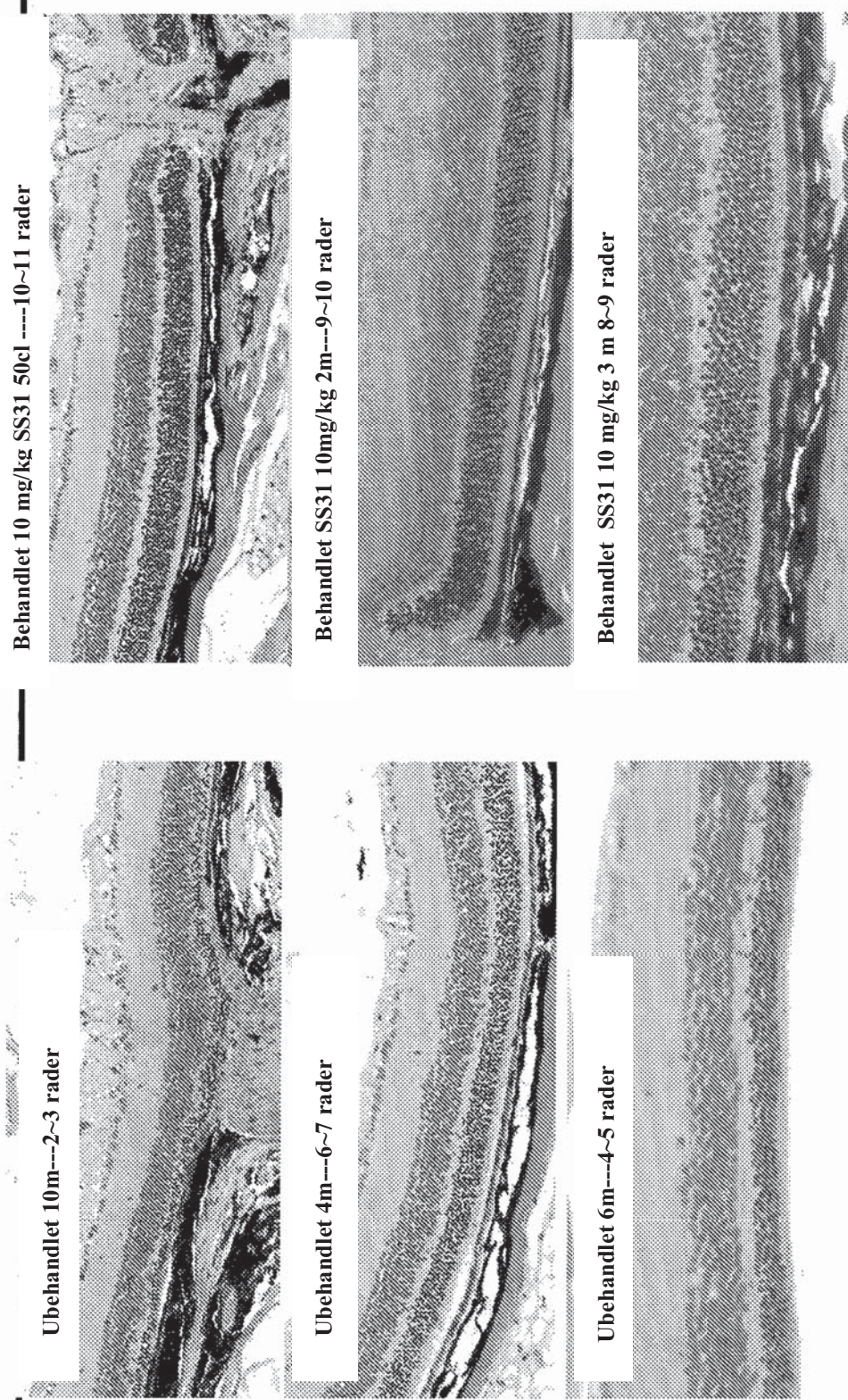
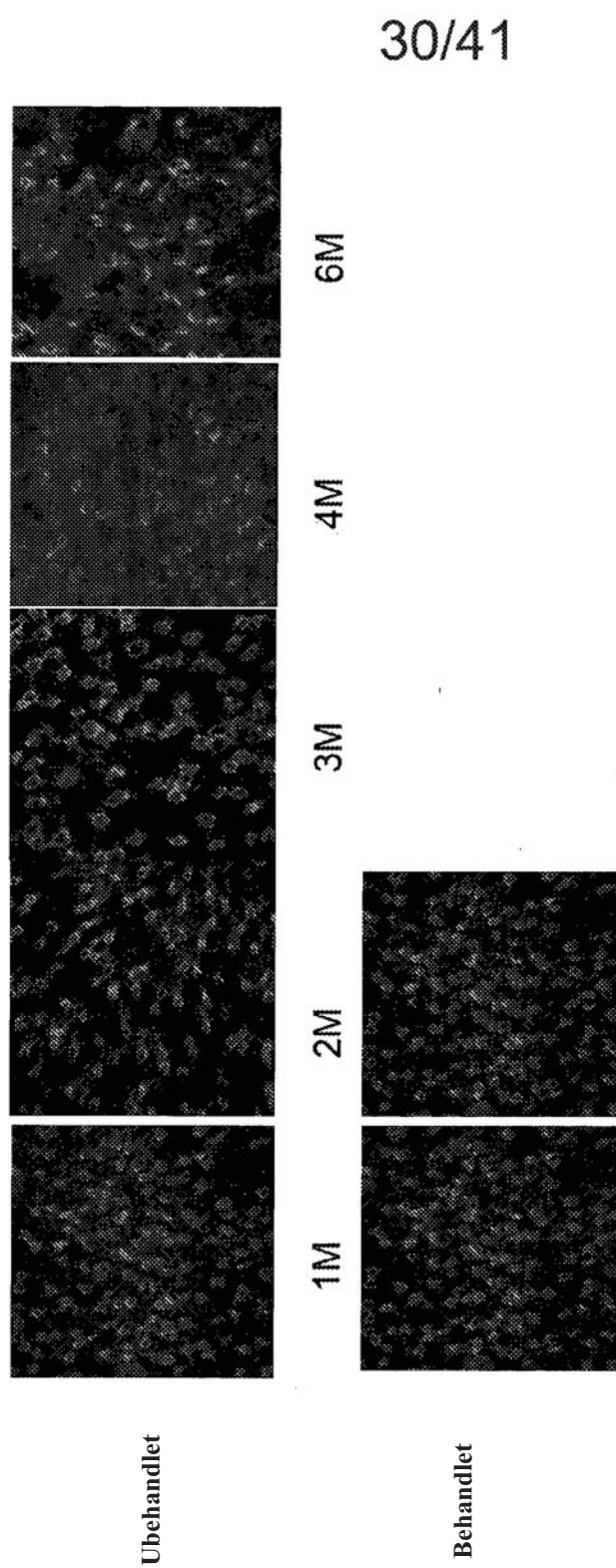
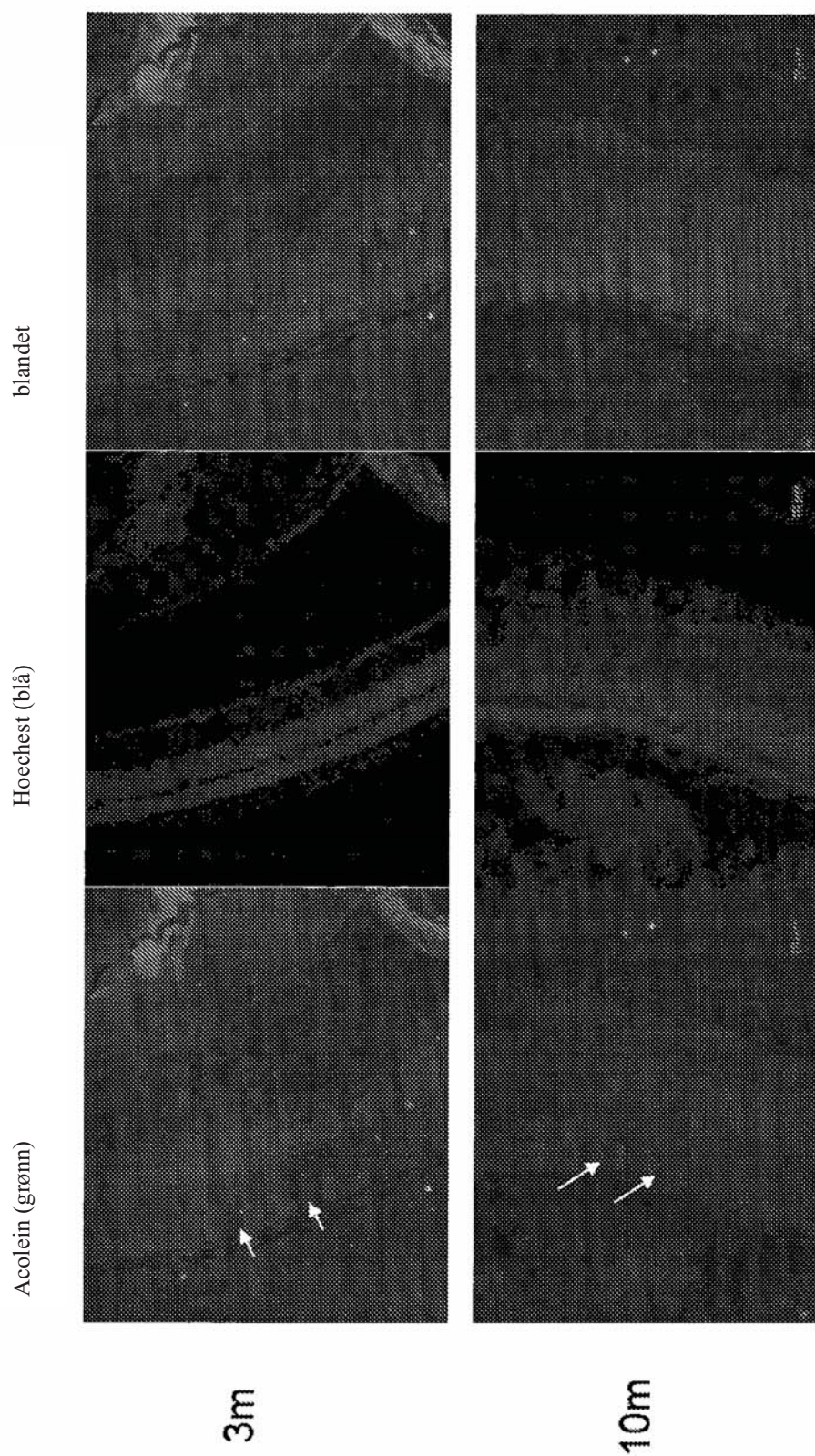


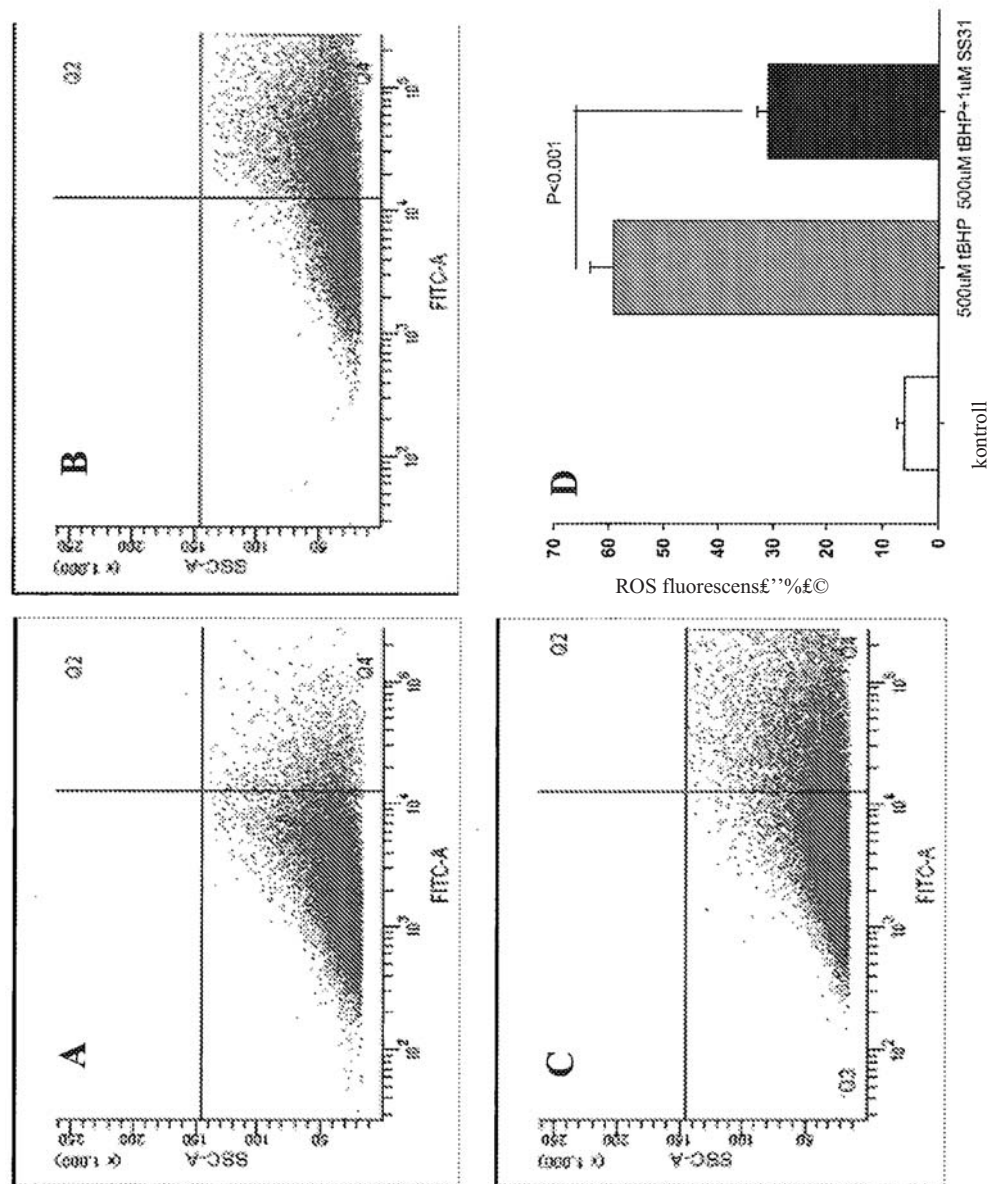
FIG. 29



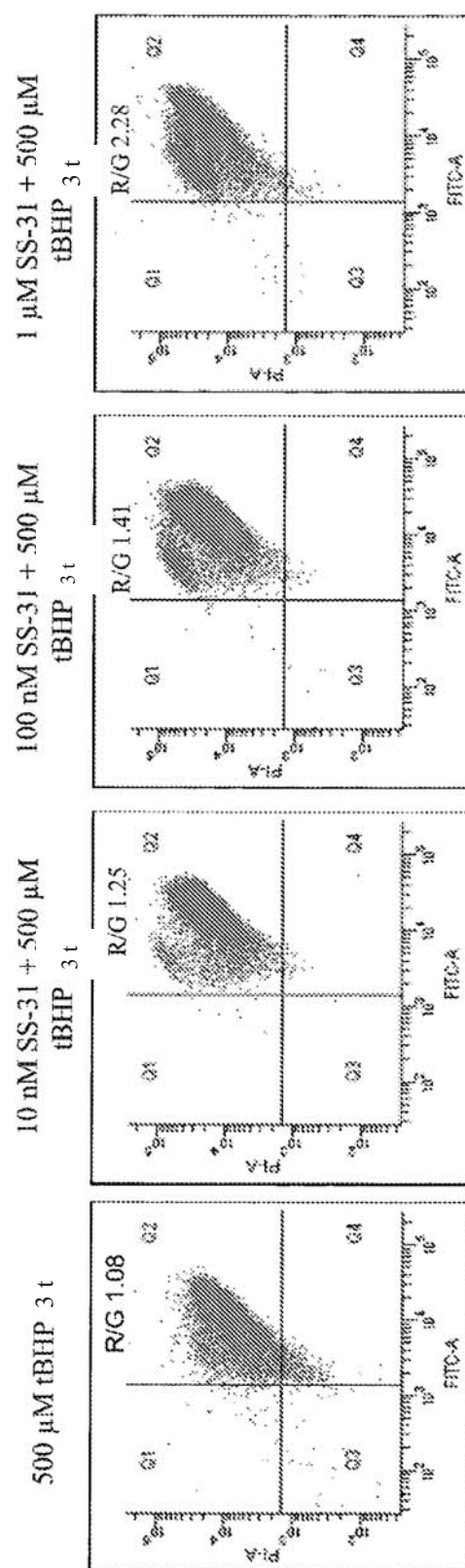
31/41

FIG. 30

32/41

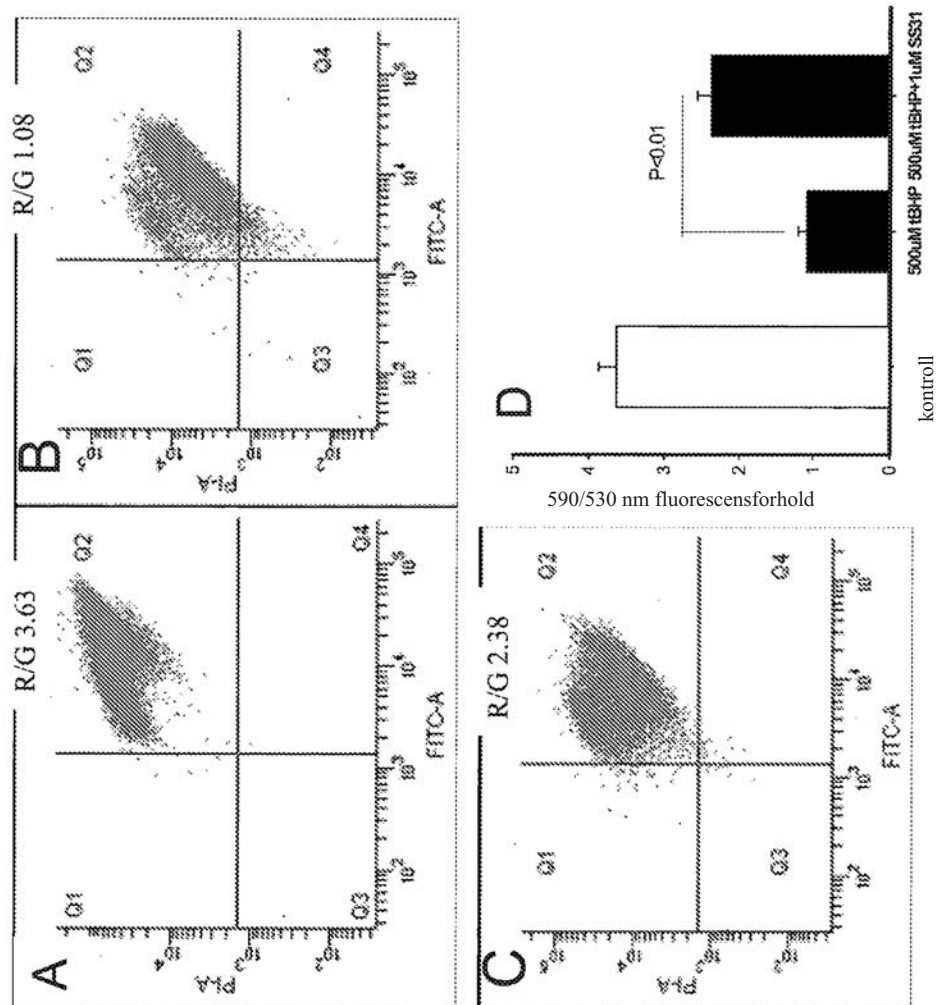
FIG. 31

3 t

FIG. 32

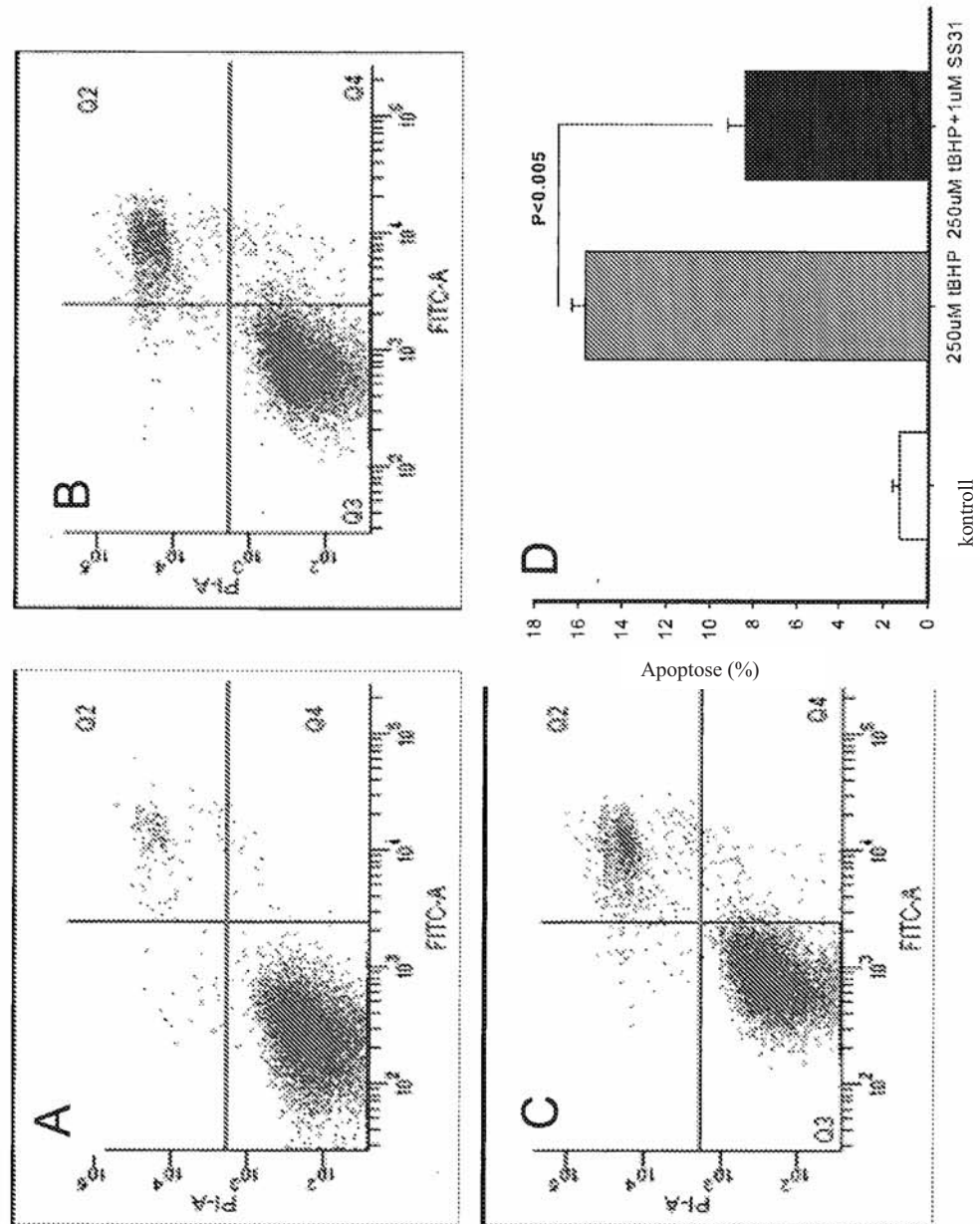
34/41

FIG. 33

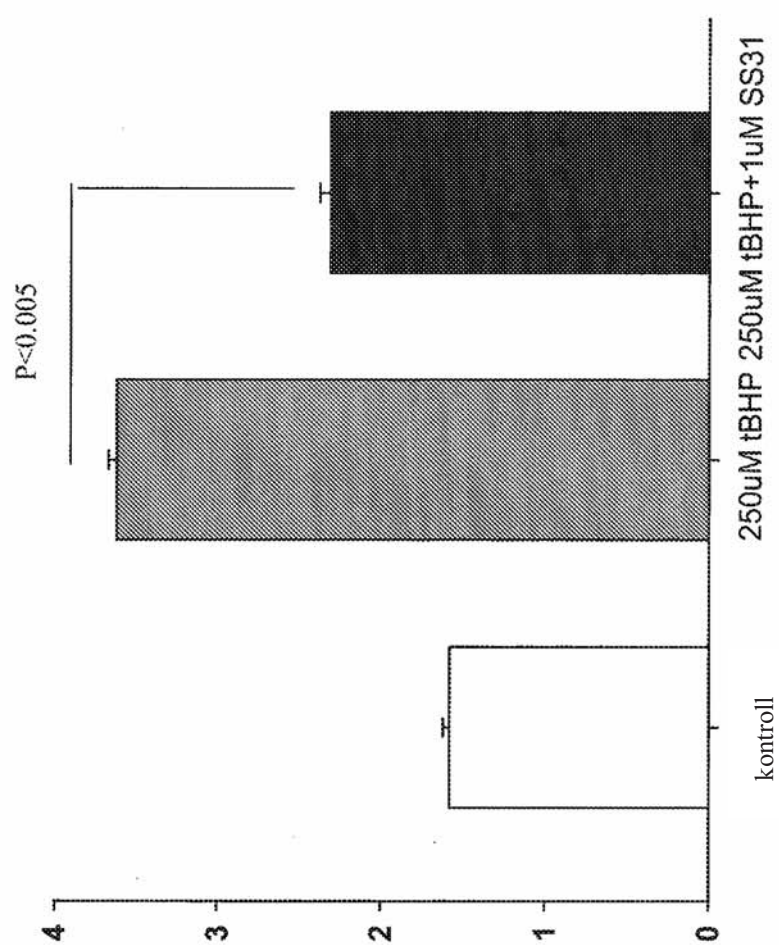


35/41

FIG. 34



36/41

FIG. 35

37/41

FIG. 36

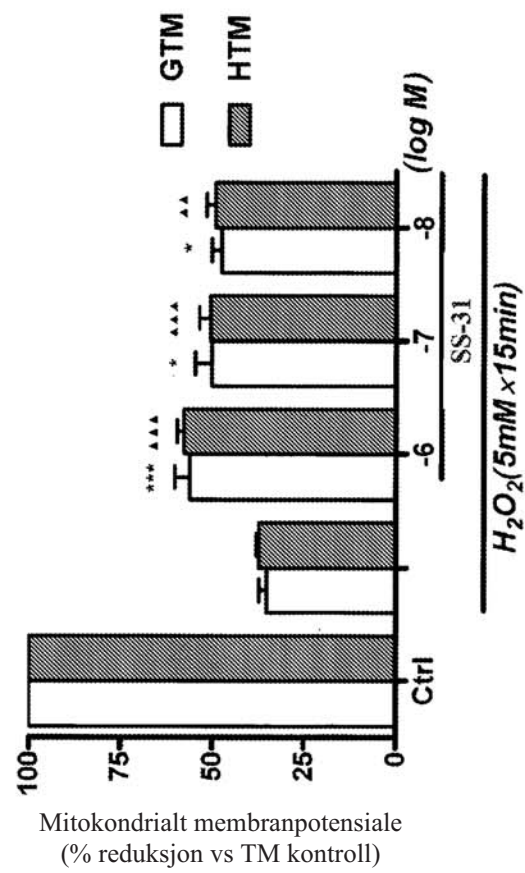
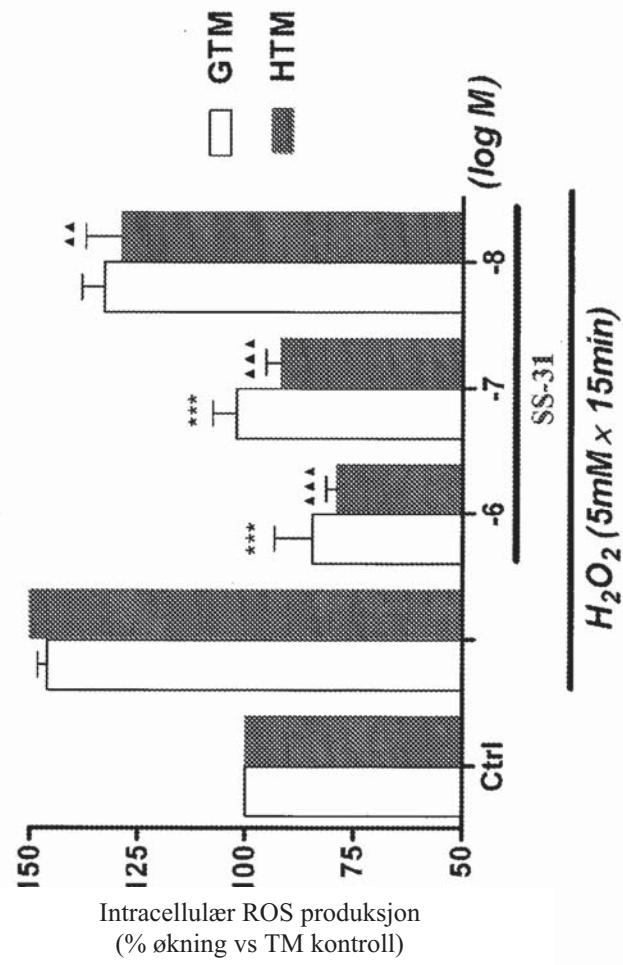
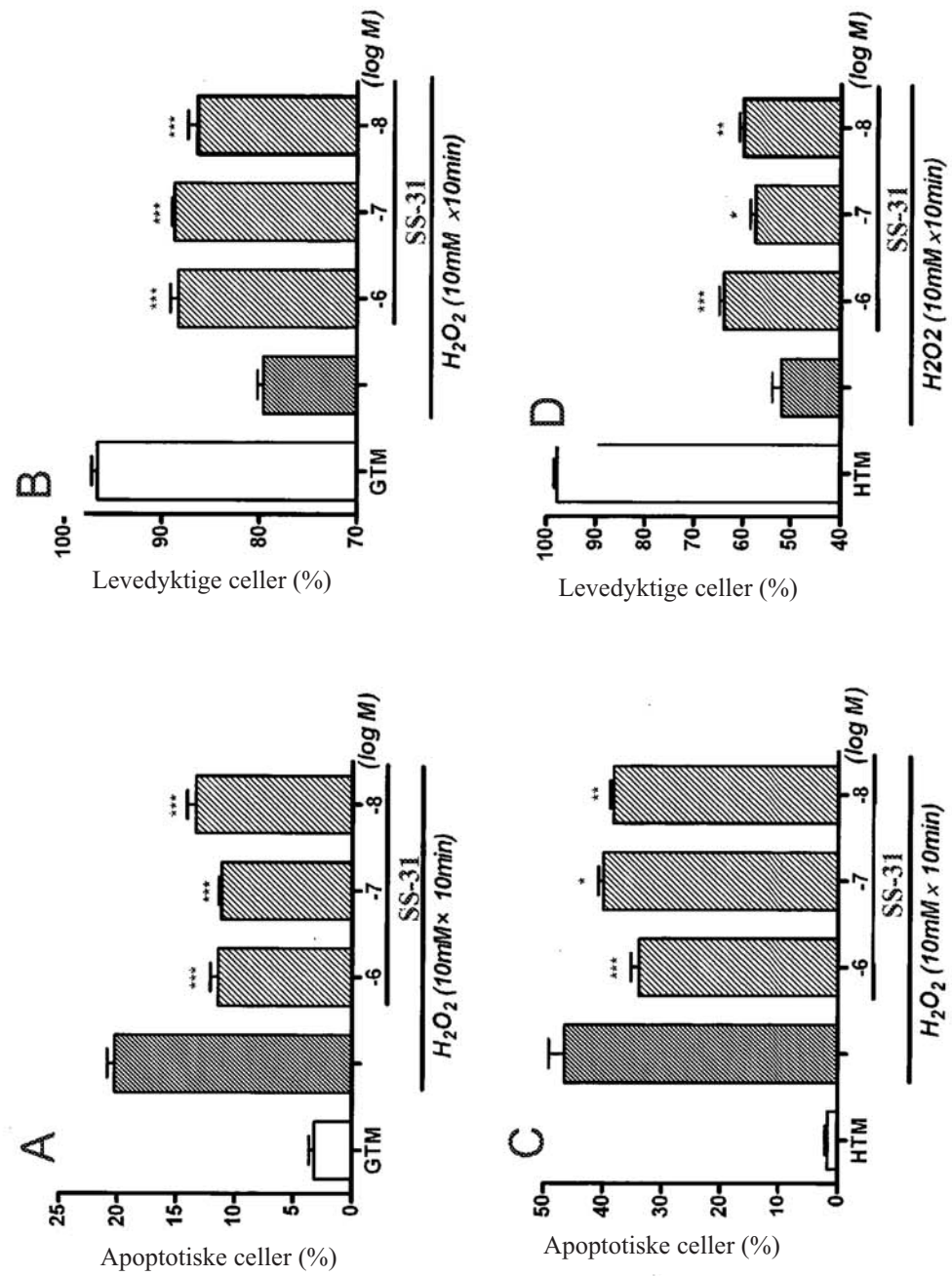


FIG. 37



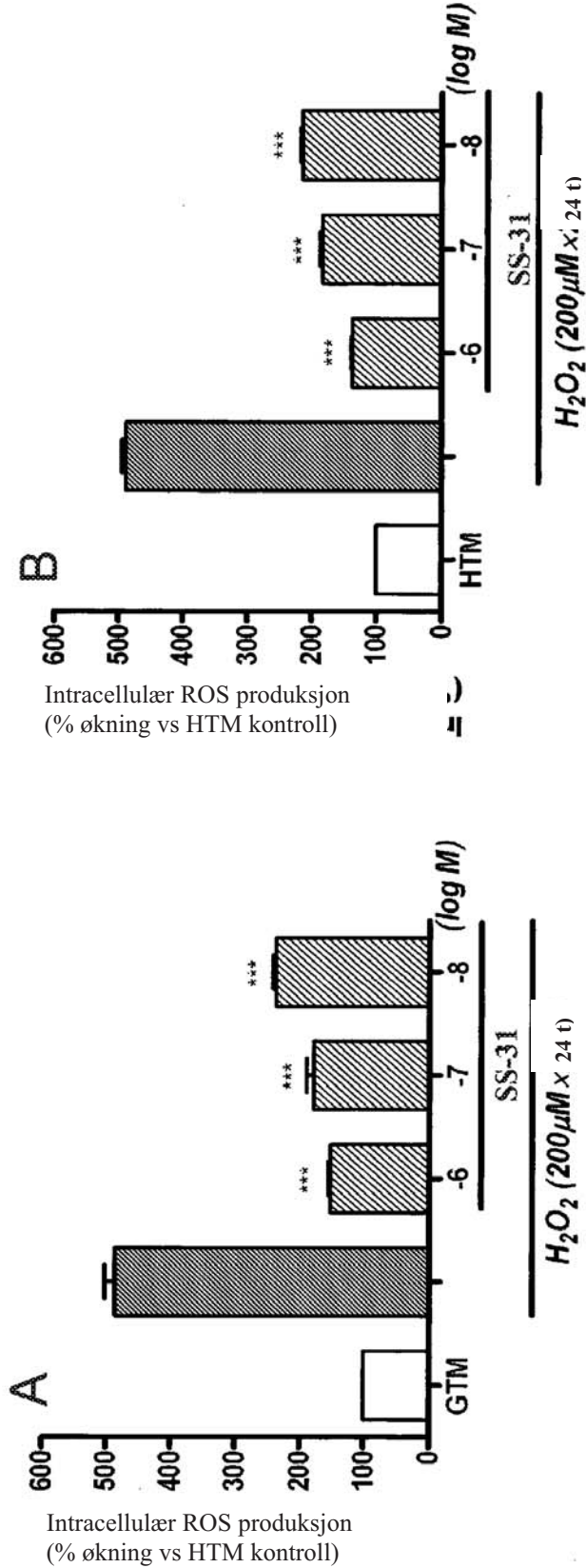
39/41

FIG. 38



40/41

FIG. 39



41/41

FIG. 40

