

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0614529-9 A2**

(22) Data de Depósito: 07/08/2006

(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)



(51) *Int.Cl.:*

A61K 38/00 2006.01

(54) Título: **POLIPEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA PROTEGER, MANTER OU MELHORAR A VIABILIDADE DE UMA CÉLULA, TECIDO OU ÓRGÃO RESPONSIVOS ISOLADOS DO CORPO DO MAMÍFERO, USO DE UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA FACILITAR A TRANSCITOSE DE UMA MOLÉCULA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR RECOMBINANTEMENTE O POLIPEPTÍDEO ISOLADO**

(30) Prioridade Unionista: 05/08/2005 US 60/705741,
08/08/2005 US 60/706276, 18/07/2006 US 60/831737

(73) Titular(es): ARAIM PHARMACEUTICALS, INC., Warren Pharmaceuticals, INC.

(72) Inventor(es): Anthony Cerami, Michael Brines, Thomas Coleman

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006031061 de 07/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/019545 de 15/02/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA PROTEGER, MANTER OU MELHORAR A VIABILIDADE DE UMA CÉLULA, TECIDO OU ÓRGÃO RESPONSIVOS ISOLADOS DO CORPO DO MAMÍFERO, USO DE UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA FACILITAR A TRANSCITOSE DE UMA MOLÉCULA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR RECOMBINANTEMENTE O POLIPEPTÍDEO ISOLADO presente invenção é dirigida a novos peptídeos protetores de tecido. Os peptídeos protetores de tecido da invenção podem ligar a um complexo de receptor protetor de tecido. Particularmente, a presente invenção é dirigida a peptídeos protetores de tecido derivados de ou compartilhando seqüências de consenso com porções de ligandos de receptor de citocinas, incluindo eritropoietina (EPO), que não estão envolvidas na ligação do ligando ao complexo do receptor, por exemplo, ao homodímero do receptor de EPO. Conseqüentemente, os peptídeos protetores de tecido da invenção são derivados das seqüências de aminoácidos das regiões de ligandos de receptor de citocinas que estão geralmente localizadas em ou dentro da região da proteína de ligando que é oposta ao complexo do receptor, isto é, são geralmente derivadas de seqüências de aminoácidos de regiões da proteína de ligando que estão voltadas distantes do complexo do receptor enquanto o ligando é ligado ao receptor. A invenção é ainda dirigida às seqüências de consenso para uso em engenharia de um peptídeo protetor de tecido sintético. Estes peptídeos protetores de tecido também incluem fragmentos, quimeras, assim como peptídeos projetados para imitar a localização espacial de resíduos de aminoácidos chave dentro dos ligandos de receptor protetor de tecido, por exemplo EPO. A invenção ainda engloba métodos para o tratamento ou prevenção de doença ou distúrbio usando peptídeos protetores de tecido da presente invenção. A invenção também engloba métodos para melhorar a função de tecido excitável usando peptídeos protetores de tecido da presente invenção.

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA PROTEGER, MANTER OU MELHORAR A VIABILIDADE DE UMA CÉLULA, TECIDO OU ÓRGÃO RESPONSIVOS ISOLADOS DO CORPO DO MAMÍFERO, USO DE UM
5 POLIPEPTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA FACILITAR A TRANSCITOSE DE UMA MOLÉCULA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR RECOMBINANTEMENTE O POLIPEPTÍDEO ISOLADO”

1. INTRODUÇÃO

10 A presente invenção é dirigida a novos peptídeos protetores de tecido. Os peptídeos protetores de tecido da invenção podem ligar a um complexo de receptor protetor de tecido. Particularmente, a presente invenção é dirigida a peptídeos protetores de tecido derivados de ou compartilhando seqüências de consenso com porções de ligandos de receptor de citocina
15 incluindo eritropoietina (EPO), que não estão envolvidos na ligação do ligando ao complexo de receptor, por exemplo, para o homodímero do receptor de EPO. Conseqüentemente, os peptídeos protetores de tecido da invenção são derivados das seqüências de aminoácidos de regiões de ligandos de receptor de citocinas que estão geralmente localizados em ou dentro da
20 região da proteína do ligando que é oposta ao complexo do receptor, isto é, são geralmente derivados das seqüências de aminoácidos de regiões da proteína de ligando que se afastam do complexo enquanto o ligando é ligado ao receptor. A invenção é ainda dirigida às seqüências de consenso para uso na engenharia de um peptídeo protetor de tecido sintético. Estes peptídeos
25 protetores de tecido também incluem fragmentos, quimeras, assim como peptídeos projetados para imitar a localização espacial de resíduos de aminoácidos chaves dentro dos ligandos do receptor protetor de tecido, por exemplo EPO.

A invenção também engloba métodos para o tratamento,

prevenção ou melhora de uma doença ou distúrbio e de tratamento, restauração ou melhora de um dano ao tecido usando peptídeos protetores de tecido da presente invenção. A invenção também engloba métodos de melhorar a função de tecido excitável usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Eritropoietina ("EPO") é um hormônio de glicoproteína comumente associado com a manutenção de hematócritos e, mais recentemente, proteção de tecido. A proteína EPO humana madura compreende 165 aminoácidos e tem um peso molecular de 34 kDa, com resíduos de glicosila contribuindo com cerca de 40 % em peso da molécula. A molécula de EPO compreende quatro hélices que interagem com seus domínios hidrofóbicos para formar uma estrutura predominantemente globular dentro de um meio aquoso (Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866, incorporado aqui por referência em sua totalidade). A invenção deriva da descoberta de que alguns aminoácidos faceando o meio aquoso (isto é, afastado do núcleo central globular, hidrofóbico) mediam a proteção de tecido. Os peptídeos podem ser derivados ou projetados a partir da compreensão das regiões de proteção de tecido que foram identificadas pelos requerentes.

Como notado acima, EPO é pluripotente. Em seu papel hormonal, EPO regula os hematócritos através de seu papel na maturação de células progenitoras eritróides em eritrócitos. EPO atua como um agente anti-apoptótico durante o processo de maturação das células progenitoras eritróides, permitindo que as células progenitoras amadureçam em eritrócitos. Os níveis diminuídos de oxigênio de tecido (hipoxia) disparam uma produção aumentada de eritropoietina no rim, o que resulta em eritropoiese aumentada. Dado que o rim normalmente produz a maior parte da eritropoietina no soro, a perda da função do rim, como uma falha renal crônica, resulta em produção

diminuída de EPO e com frequência anemia. Similarmente, anemia pode resultar de outras condições crônicas, como câncer, ou tratamentos associados com estas doenças, como quimioterapia, que diretamente suprime a produção de EPO. A eritropoietina recombinante comercialmente disponível se tornou disponível sob as marcas registradas de PROCRIT, disponível de Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ, e EPOGEN, disponível de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, e tem sido usada para tratar anemia resultante da doença renal em estágio final, terapia com AZT (zidovudina) em pacientes infectados com HIV, pacientes de oncologia, e quimioterapia. Atualmente uma eritropoietina hiperglicosilada, ARANESP™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), é disponível para tratamento de anemia. Adicionalmente, estes compostos tem sido usadas para aumentar os hematócritos de pacientes sofrendo cirurgia para reduzir a necessidade de transfusões de sangue alogênica.

Recentemente, várias linhas de evidências tem sugerido que EPO também funcional localmente em um modo parácrino- autócrino para minimizar o dano ao tecido. Por exemplo, EPO melhora um microambiente celular hipóxico e diminuir a morte de células programada causada por estresse metabólico. Ambas as atividades são moderadas, em parte, através de interação de EPO com um receptor de superfície de células específico composto, em parte, pela proteína de receptor de eritropoietina ("EPOR"). EPOR é uma proteína de aproximadamente 66 kDa e é um membro da família de receptor de citocina tipo 1. Esta família compreende receptores que são agrupados juntos com base em homologia compartilhada de seus domínios extracelulares e inclui receptores para interleucina IL-2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL9, IL11, fator estimulante de colônia de granulócito macrófago (GM-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), trombopoietina, hormônio de crescimento e prolactina. O domínio extracelular conservado destes receptores tem um comprimento de aproximadamente 200 aminoácidos,

compreende quatro resíduos de cisteína conservados posicionalmente na região de amino-terminal (Cys 294, Cys 283, Cys 248, e Cys 238, que parecem ser críticos para a manutenção e integridade estrutural dos receptores (Murray, 1996, Harpers Biochemistry 24^a ed. pp. 524-526, Appilion & Lange, Ltd.; Caravella et al, 1996, Protein: Struct. Funct. Gen. 24:394-401, cada incorporada aqui por referência em sua totalidade e um motivo Trp-Ser-X-Trp-ser (SEQ ID NO: 58) localizado proximal ao domínio transmembrana.

Em conexão com eritropoiese, EPOR funciona em um modo similar aos outros receptores dentro da família de receptores de citocina tipo 1. Primeiro, o ligando do receptor, por exemplo EPO, liga ao dímero pré-formado de EPOR (EPOR)₂. Foi determinado que EPO interage com o domínio extracelular do receptor de homodímero (EPOR)₂ clássico via duas regiões distintas sobre a superfície do ligando; um sítio de ligação de receptor de alta afinidade (sítio 1) e um sítio de ligação de receptor de baixa afinidade (sítio 2). As seqüências de aminoácido de EPO associadas com sítio 1 são TKVNFY, SEQ ID N0:2, correspondendo aos aminoácidos 44-49 de SEQ ID NO:1, e SNFLRG, SEQ ID N0:3, correspondendo aos aminoácidos 146-151 de SEQ ID NO:1; as seqüências associadas com sítio 2 são VLERY, SEQ ID N0:4, correspondendo aos aminoácidos 11-15 de SEQ ID NO:1, e SGLRS, SEQ ID N0:5, correspondendo aos aminoácidos 100-104 de SEQ ID NO:1 (Cheetham et al.,1998, Nature Structural Biology 5:861-866, incorporados aqui por referência em sua totalidade). A ativação do homodímero de EPOR leva à fosforilação de tirosina de proteínas de sinalização que são associadas com EPOR, por exemplo Jak2 tirosina cinases, que podem, por sua vez, ativar várias vias diferentes incluindo, por exemplo a via fosfatidil inositol (PI) 3-cinase, a via Ras/ MAP cinase, e/ou a via STAT. Estas vias disparam as funções anti-apoptóticas necessárias para eritropoiese que são mediadas por eritropoietina (Kirito et al, 2002, Blood 99:102-110; Livnah et al, 1999, Science 283:987-990; Naranda et al., 2002, Endocrinology 143:2293-2302;

Remy et al, 1999, Science 283:990-993; e Yoshimura et al, 1996, The Oncologist 1:337-339, cada incorporada aqui por referência em sua totalidade).

Recentemente, os requerentes descobriram que propriedades
 5 protetoras de tecido de EPO são mediadas por um receptor que compreende
 não somente EPOR mas também outra proteína do receptor, o receptor beta
 comum (" β_c "). O receptor EPOR/ β_c é, em contraste com o homodímero
 (EPOR)₂, um heterocomplexo (ver infra) e é conhecido como desempenhando
 um papel na proteção de tecidos excitáveis (ver, por exemplo, WO
 10 2004/096148 e PCT PCT7US01/49479, depositado em 28 de dezembro de
 2001, Pedidos de patente US Nos. 09/753,132, depositado em 29 de dezembro
 de 2000, e 10/188,905, depositado em 3 de maio de 2002. cada incorporada
 aqui por referência em sua totalidade. Apesar dos requerentes terem
 estabelecido que o receptor β_c é central para as vias de proteção de tecido
 15 nestes tecidos excitáveis, a estrutura dos ligandos de ativação para os
 receptores ainda é desconhecida.

3. SUMÁRIO

A presente invenção é dirigida a polipeptídeos isolados que
 tem pelo menos uma atividade protetora celular em uma célula, tecido ou
 20 órgão responsivos, cujos polipeptídeos contém motivos de aminoácidos
 compreendendo a seqüência de consenso: a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é
 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (c) L_1-
 $N_1-(X)_n-N_2-H_1$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (d) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é
 0 ou 1; ou (e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0 ou 1, e em que H_1 e H_2 são
 25 aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente
 carregados, X é qualquer aminoácido, e L_1 é um aminoácido polar; e P_1 é um
 aminoácido positivamente carregado. Em algumas formas de realização, os
 peptídeos da invenção também faltam atividade eritropoiética, por exemplo
 não aumentam hemoglobina ou hematócritos em um recipiente. Em outras

formas de realização, os polipeptídeos isolados da invenção consistem de não mais do que 10, não mais que 15, não mais que 20 ou não mais que 40 aminoácidos. Em outras formas de realização, o peptídeo isolado tem menos que 90 %, menos que 85%, menos que 80 %, menos que 75 %, menos que 70%, menos que 65%, menos que 60 %, menos que 55 %, menos que 50 %, menos que 45 %, menos que 40 %, menos que 35 %, menos que 30 ou menos que 20 por cento de identidade de seqüência com qualquer porção da seqüência de aminoácido de eritropoietina humana madura ("EPO") especificada na seqüência 1, em que referida porção de EPO contém o mesmo número resíduos de aminoácidos como referido peptídeo.

Em algumas formas de realização da invenção descrita acima, em que o polipeptídeo isolado compreende o motivo estrutural (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 (corporificado pelos identificadores de seqüência 6-11, respectivamente, discutido infra); (b) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é 0 ou 1 (corporificado pelos identificadores de seqüência 24-25, respectivamente, discutido infra); ou (c) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0 ou 1, (corporificado pelos identificadores de seqüência 26-27, respectivamente, discutido infra), H_1 e H_2 podem ser aminoácidos hidrofóbicos iguais. Em outras formas de realização da invenção descrita acima, em que o polipeptídeo isolado compreende os motivos estruturais a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (d) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é 0 ou 1; ou (e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0 ou 1, e H_1 e H_2 podem ser aminoácidos hidrofóbicos diferentes. Em outras formas de realização, a invenção provê um polipeptídeo isolado compreendendo o motivo de aminoácido (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$, em que n é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5; e em que N_1 e N_2 podem ser iguais ou podem ser diferentes aminoácidos negativamente carregados.

A invenção provê polipeptídeos isolados compreendendo os

motivos de aminoácidos descritos acima, em que referidos motivos são formados por aminoácidos consecutivos dentro da sequência de aminoácido de referido polipeptídeo. Em exemplos específicos de acordo com esta forma de realização, a invenção provê um polipeptídeo isolado compreendendo o

5 motivo de aminoácido $H_1-N_1-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:6), $H_1-N_1-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:7), $H_1-N_1-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:8), $H_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:9), $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO: 10), $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:11), $H_1-N_1-N_2-L_1$ (SEQ ID NO: 12), $H_1-N_1-X-N_2-L_1$ (SEQ ID NO: 13), $H_1-N_1-X-X-N_2-L_1$ (SEQ ID NO: 14), $H_1-N_1-X-X-X-N_2-L_1$ (SEQ

10 ID NO: 15), $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-L_1$ (SEQ ID NO:16), $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-L_1$ (SEQ ID NO:17), $L_1-N_1-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:18), $L_1-N_1-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO: 19), $L_1-N_1-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:20), $L_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:21), $L_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:22), $L_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$ (SEQ ID NO:23), $H_1-N_1-P_1-H_2$ (SEQ ID NO:24), $H_1-N_1-L_1-P_1-H_2$

15 (SEQ ID NO:25), $H_1-P_1-N_1-H_2$ (SEQ ID NO:26), ou $H_1-P_1-L_1-N_1-H_2$ (SEQ ID NO:27), em que H_1 e N_1 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, X é qualquer aminoácido, L_1 é um aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente carregado. Em alguns aspectos consistentes com esta forma de realização, em que o polipeptídeo

20 isolado compreende um motivo tendo resíduos de aminoácidos H_1 e H_2 , H_1 e H_2 podem ser iguais ou podem ser aminoácidos hidrofóbicos diferentes. Em outros aspectos consistentes com esta forma de realização, em que o polipeptídeo isolado compreende um motivo tendo os resíduos de aminoácidos N_1 e N_2 , N_1 e N_2 podem ser iguais ou podem ser aminoácidos

25 negativamente carregados diferentes.

Em outras formas de realização, a invenção provê polipeptídeos isolados em que o motivo de aminoácido é formado devido à organização espacial de aminoácidos dentro da estrutura terciária de um polipeptídeo, isto é, os aminoácidos formando o motivo são espacialmente

adjacentes a um outro na estrutura tri-dimensional, isto é, estrutura terciária, do polipeptídeo mas pode ser separado por 1 ou mais aminoácidos dentro da seqüência de aminoácido primária da cadeia de polipeptídeo. Em um exemplo específico de acordo com esta forma de realização, o motivo de aminoácido compreendendo os resíduos de aminoácidos H_1 , N_1 , N_2 e H_2 análogos a SEQ ID NO: 6, discutido supra, pode formar como um resultado da estrutura terciária adotada por, isto é, duplicação de proteína de peptídeos compreendendo, por exemplo SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 11, em que os resíduos de aminoácidos entre N_1 e N_2 , por exemplo $(X)_n$ duplicam de modo que N_1 e N_2 se tornam linearmente adjacentes. Assim, a invenção engloba peptídeos isolados compreendendo) $H_1N_1N_2H_2$; $H_1N_1N_2L_1$; $L_1N_1N_2H_1$, $H_1N_1(L)_nP_1H_2$, em que n é 0 ou 1; ou $H_1P_1(L)_nN_1H_2$, em que n é 0 ou 1, cujos motivos são formados como um resultado da estrutura terciária do referido polipeptídeo. Em formas de realização relacionadas, em que o motivo de aminoácido compreende N_1 e N_2 , as estruturas terciárias formam tais que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e N_2 é de cerca de 3 Å a cerca de 5 Å, preferivelmente cerca de 4 Å a cerca de 5 Å, e mais preferivelmente cerca de 4,4 Å a cerca de 4,8 Å. Em outras formas de realização, em que o motivo de aminoácido compreende N_1 e N_2 , as estruturas terciárias formam tais que a distância entre N_1 e N_2 são confinadas espacialmente de modo que a separação de carga, por exemplo, as cadeias laterais carregadas, dos dois está entre cerca de 6,5 Å a cerca de 9 Å. Em uma forma de realização relacionada, N_1 e N_2 são assim espacialmente confirmadas como um resultado de estarem em seqüência de aminoácido que forma toda ou uma porção de uma hélice alfa, e podem se separados por 1, 2 ou mais de 2 aminoácidos na seqüência de referidos aminoácidos formando a referida hélice. Em outras formas de realização relacionadas, em que o motivo de aminoácido compreende N_1 e P_1 , as estruturas terciárias formam tais que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e P_1 é cerca de 3 Å a cerca de 5 Å,

preferivelmente cerca de 4 Å a cerca de 5 Å, e mais preferivelmente cerca de 4,4 Å a cerca de 4,8 Å. Em outras formas de realização, em que o motivo de aminoácido compreende N_1 e P_1 , as estruturas terciárias formam tais que as distâncias entre N_1 e P_1 são confinadas espacialmente de modo que a

5 separação de carga, por exemplo as cadeias laterais carregadas das duas está entre cerca de 6,5 Å a cerca de 9 Å. Em uma forma de realização relacionada, N_1 e P_1 são espacialmente confinados como um resultado de estarem em uma seqüência de aminoácido que forma toda ou uma posição de uma hélice alfa, e pode ser separado por 1, 2 ou mais de 2 aminoácidos na seqüência de

10 referidos aminoácidos formando a referida hélice. Em algumas formas de realização, os aminoácidos formando o motivo dentro da estrutura terciária de referido polipeptídeo são separados um do outro por um número igual de resíduos de aminoácidos intervenientes na seqüência de aminoácido linear de referido polipeptídeo. Em ainda outras formas de realização, os aminoácidos

15 formando o motivo dentro da estrutura terciária de referido polipeptídeo são separados um do outro por um número diferente de resíduos de aminoácidos intervenientes na seqüência de aminoácidos linear de referido polipeptídeo. Em algumas formas de realização, o polipeptídeo isolado da invenção forma uma estrutura terciária regular, por exemplo uma α -hélice ou folha β -dobrada,

20 de modo que a superfície de referida estrutura apresenta os aminoácidos compreendendo referido motivo, e assim o próprio motivo, para a interface da estrutura de proteína e o meio aquoso, isto é, apresenta o motivo na superfície de duplicação do polipeptídeo. Em formas de realização preferidas, as estruturas terciárias dos polipeptídeos da invenção formam em um meio

25 aquoso em condições fisiológicas, por exemplo PBS (13 mM NaH_2PO_4 , 137 mM NaCl, pH 7.4) a 37 °C.

Em formas de realização específicas, a invenção provê polipeptídeos isolados compreendendo os motivos de aminoácidos descritos aqui acima, por exemplo peptídeo A (APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE,

SEQ ID NO:32), peptídeo C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29), peptídeo D (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30), peptídeo E (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO:31), peptídeo F (RYLLUNITTGC, SEQ ID NO:33), peptídeo G (QEQLERALNSS, SEQ ID NO:40), peptídeo I (CSLNENIQEQLERALNSS, SEQ ID NO:43), peptídeo J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEQ ID NO:41), peptídeo K (WEHVNAIQEARLL, SEQ ID NO:35), ou peptídeo L (KIRSDLTALTESYVKH, SEQ ID NO:37).

Em algumas formas de realização, a invenção provê polipeptídeos isolados compreendendo 1 ou mais, 2 ou mais, 3 ou mais, 4 ou mais, 5 ou mais, 6 ou mais, ou mais do que 6 motivos de aminoácidos descritos aqui. Em aspectos específicos da invenção de acordo com esta forma de realização, em que o polipeptídeo isolado compreende pelo menos dois dos motivos de aminoácidos descritos aqui acima, referidos pelo menos dois motivos podem ser o mesmo motivo ou podem ser motivos diferentes.

Em certos aspectos, a invenção provê polipeptídeos isolados faltando uma atividade eritropoiética, por exemplo, aumentando hemoglobina em um recipiente. Preferivelmente, os polipeptídeos isolados desprovidos de outras atividades incluindo, mas não limitadas a, ação vasoativa (por exemplo, vasoconstrição), plaquetas com hiperativação, atividades pró-coagulantes e estimulando a proliferação e/ou produção de trombócitos e/ou células dependentes eritropoiéticas (ver, Coleman et al., 2006, PNAS 103: 5965-5970, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Em outros aspectos, a invenção provê polipeptídeos isolados que compreendem pelo menos uma atividade protetora celular. Esta atividade protetora celular inclui, mas não está limitada a proteger, manter, melhorar ou restaurar a função ou viabilidade de uma célula, tecido ou órgão de mamífero responsivo. Conseqüentemente, em um aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de um polipeptídeo isolado descrito aqui para a preparação de composições

farmacêuticas para proteger, manter, aumentar ou restaurar a função ou viabilidade de células de mamífero responsivas e suas células, tecidos e órgãos associados. Nas formas de realização descritas, as composições são para administração a um indivíduo em necessidade das mesmas. Nas formas de realização preferidas, referido indivíduo é um mamífero, e, preferivelmente, um humano.

Em outros aspectos, a presente invenção refere-se ao uso de um polipeptídeo isolado descrito aqui para a preparação de uma composição farmacêutica para a proteção contra e/ou prevenção de um dano a tecido responsivo, para a restauração de, ou para o rejuvenescimento do tecido responsivo e/ou função do tecido responsivo em um indivíduo em necessidade da mesma. Em um aspecto particular, as células de mamífero responsivos e suas células, tecidos ou órgãos associados são distais à vasculatura em virtude de uma barreira celular endotelial firme. Em um outro aspecto particular, as células, tecidos, órgãos ou outras partes do corpo são isolados de um corpo de mamífero, como os pretendidos para transplante. Por meio de exemplos não limitativos, uma célula ou tecido responsiva pode ser neuronal, do olho (por exemplo, retinal) adiposa conectiva, do cabelo, dentes, mucosal, do pâncreas, endócrina, do ouvido, epitelial, da pele, músculo, coração, pulmão, fígado, rim, intestino, adrenal (por exemplo, córtex adrenal, medula adrenal), capilar, endotelial, do testículo, ovário, osso, pele, ou endometrial. Além disso, exemplos não limitativos de células responsivas incluem células fotorreceptoras (bastões e cones), dos gânglios, bipolares, horizontais, amácrinas, de Müller, Purkinje, do miocárdio, marca-passo, nodo sinoatrial, nódulo do sino, tecido de união, nodo atrioventricular, feixe de His, hepatócitas, radiadas, de Kupfer, mensageiros, epiteliais renais, intersticiais tubulares, copo, glândulas intestinais (criptas), endócrinas enterais, glomerulosas, fasciculado, reticularis, cromafina, perícito, Leydig, Sertoli, esperma, folículo de Graffian, folículo primordial, ilhotas de Langerhans,

células α , células β , células γ , células F, osteoprogenitor, osteoclastos, osteoblastos, estroma endometrial, endometrial, células tronco e endoteliais. Estes exemplos de células responsivas são meramente ilustrativos. Em um aspecto, a célula responsiva ou suas células, tecidos ou órgãos associados são células, tecidos ou órgãos excitáveis, ou predominantemente compreendem células ou tecidos excitáveis. Em certo aspectos da invenção, o tecido excitável é tecido do sistema nervoso central, tecido do sistema nervoso periférico, tecido cardíaco ou tecido renal. Em um outro aspecto, a célula responsiva ou suas células, tecidos ou órgãos excitáveis, tampouco compreendem predominantemente células ou tecidos excitáveis.

A atividade protetora eritropoiética e/ou celular do polipeptídeo isolado da invenção em células responsivas pode ser avaliada e/ou determinada por qualquer método descrito aqui e ou conhecido na arte. Em certas formas de realização, a atividade protetora eritropoiética e/ou celular é determinada em um teste *in vitro*. Em outras formas de realização, a atividade protetora eritropoiética e/ou celular é determinada em um teste *in vivo*. Em uma forma de realização relacionada, em que a atividade protetora celular é neuroproteção, a invenção provê um método para avaliar referida atividade *in vitro* (a) contatando uma cultura de teste de neurônios de hipocampus primários com N-metil-D-aspartato e referido peptídeo; e (b) determinando a viabilidade das células em 48 h após referido contato, de modo que se a viabilidade das células determinada na etapa (b) é maior do que a de uma cultura de controle na ausência de referido peptídeo, o peptídeo possui atividade protetora celular.

Em uma forma de realização particular, a célula, tecido ou órgão de mamífero para o qual um peptídeo isolado acima mencionado é usado são os que despendem ou despenderão um período de tempo em pelo menos uma condição adversa à viabilidade da célula, tecido ou órgão. De acordo com esta forma de realização, os peptídeos isolados da invenção

provêm proteção contra e/ou prevenção de um dano a tecido resultante destas condições, provêm a restauração de, ou provêm o rejuvenescimento de tecido e/ou função de tecido em um indivíduo em necessidade dos mesmos antes, durante ou após estas condições surgirem. Estas condições incluem

5 hipoxia *in situ* traumática ou disfunção metabólica, hipoxia *in situ* ou disfunção metabólica induzidas cirurgicamente, ou exposição a toxina *in situ*, a última pode ser associada com quimioterapia ou terapia de radiação. Em outras formas de realização, os peptídeos isolados da invenção provêm

10 proteção contra e/ou prevenção de um dano a tecido resultante de uma doença ou distúrbio, provêm a restauração de, ou provêm o rejuvenescimento de tecido e/ou função de tecido em um indivíduo em necessidade dos mesmos antes, durante ou após estas condições surgirem. Nas formas de realização referido dano é causado por um distúrbio que provoca um insulto, esclerose múltipla, derrame, hipotensão, parada cardíaca, isquemia, infarto do

15 miocárdio, inflamação, perda da função cognitiva relacionada à idade, dano de radiação, paralisia cerebral, doença neurodegenerativa, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, doença mitocondrial, demência por AIDS, perda de memória, esclerose lateral amiotrófica, alcoolismo, distúrbio do humor, distúrbio de ansiedade, distúrbio de déficit de atenção, autismo, doença de

20 Creutzfeld-Jakob, trauma cerebral ou da medula espinhal ou isquemia, desvio de tipo desvio coração-pulmão, falha cardíaca crônica, degeneração macular, neuropatia diabética, retinopatia diabética, hepatite, pancreatite, glaucoma, isquemia retinal, trauma retinal, doença cardiovascular, doença cardiopulmonar, doença respiratória, doença renal, doença do sistema

25 urinário, doença do sistema reprodutor, doença óssea, doença da pele, doença do tecido conectivo, doença gastrointestinal, anormalidade endócrina, anormalidade metabólica, ou uma doença ou distúrbio do sistema nervoso central ou periférico. Em ainda uma outra forma de realização, as condições adversas são um resultado de desvio cardio-pulmonar (máquina coração-

pulmão), como é usado para certos procedimentos cirúrgicos. Em ainda em outras formas de realização, referido dano é disfunção cognitiva. Em uma forma de realização particular, a célula, tecido ou órgão de mamífero, para o qual um peptídeo isolado acima mencionado é usado, expressam o receptor βc .

Em certas formas de realização, a invenção refere-se também a composições farmacêuticas compreendendo os polipeptídeos isolados acima mencionados para administração a um indivíduo em necessidade dos mesmos. Em aspectos específicos de acordo com esta forma de realização, a composição farmacêutica da invenção ainda compreende um veículo farmaceuticamente aceitável. Estas composições farmacêuticas podem ser formuladas para administração oral, intranasal, ocular, por inalação, transdérmica, retal, sublingual, vaginal ou parenteral, ou na forma de uma solução de perfundido para manter a viabilidade de células, tecidos ou órgãos *ex vivo*. Nas formas de realização relacionada da invenção o indivíduo é um animal mamífero, preferivelmente um humano.

Em outros aspectos, a invenção provê um método para facilitar a transcitose de uma molécula através de uma barreira celular endotelial em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma composição compreendendo referida molécula em associação com um peptídeo isolado da invenção descrito acima. Em uma forma de realização relacionada, a associação é uma ligação covalente lábil, uma ligação covalente estável ou associação não covalente com um sítio de ligação para referida molécula.

De acordo com um outro aspecto da invenção, o peptídeo isolado da invenção, como descrito acima, é capaz de atravessar uma barreira celular endotelial. Em uma forma de realização, a barreira celular endotelial compreende a barreira sangue-cérebro, a barreira sangue-olho, a barreira sangue-testículos, a barreira sangue-ovário, sangue-placenta, sangue-corção,

sangue-rim, sangue-nervo, ou barreira sangue- medula espinhal.

De acordo com um aspecto da invenção, é provida uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma seqüência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo compreendendo o polipeptídeo isolado como descrito acima.

Em uma outra forma de realização da invenção, é provida uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma seqüência de nucleotídeos (isto é, um cDNA, uma seqüência de nucleotídeos interrompida por introns, ou não interrompida por introns), que codifica um polipeptídeo compreendendo ou consistindo do polipeptídeo isolado da invenção como descrito acima. Em uma forma de realização, a seqüência de nucleotídeos, codificando o polipeptídeo isolado da invenção, é sintetizada usando códons preferidos que facilitam expressão ótima em uma célula hospedeira particular. Estes códons preferidos podem ser ótimos para expressão em células de uma espécie de planta, bactéria, levedura, mamífero, fungo ou inseto.

A invenção também provê um vetor compreendendo a molécula de ácido nucleico. A invenção também provê um vetor de expressão compreendendo a molécula de ácido nucleico e pelo menos uma região regulatória operativamente ligada à molécula de ácido nucleico. Em uma outra forma de realização, a invenção provê uma célula compreendendo o vetor de expressão. Em ainda uma outra forma de realização, é provida uma célula geneticamente engenheirada que compreende a molécula de ácido nucleico.

Em uma outra forma de realização, a invenção provê um método para produzir recombinantemente o peptídeo isolado da invenção, descrito acima, compreendendo cultivar em um meio uma célula hospedeira contendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma seqüência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo da invenção, em condições apropriadas para a expressão de referido peptídeo, e recuperando e/ou

isolando o polipeptídeo expressado de referido meio.

3.1 TERMINOLOGIA

Como usado aqui, o termo “cerca” ou “aproximadamente” quando usados em combinação com um número referem-se a qualquer número dentro de 1, 5 ou 10% do número referenciado.

O termo “administrado em combinação com” no contexto dos métodos da invenção significa administrar um composto antes, ao mesmo tempo como, e/ou subsequente ao início de uma doença, distúrbio ou condição.

O termo “aminoácido” ou qualquer referência a um aminoácido específico se destina a incluir aminoácidos proteogênicos ocorrendo naturalmente bem como aminoácidos ocorrendo não naturalmente como análogos de aminoácidos. Os versados na arte podem saber que esta definição inclui, a menos que especificamente indicado ao contrário, (L)-aminoácidos protogênicos ocorrendo naturalmente, seus (D)-isômeros óticos, aminoácidos quimicamente modificados, incluindo análogos de aminoácidos como penicilamina (3-mercaptop-D-valina), aminoácidos não proteogênicos ocorrendo naturalmente como norleucina e proteínas quimicamente sintetizadas que têm propriedades conhecidas na arte como sendo características de um aminoácido. Como usado aqui, os aminoácidos serão representados ou por seu acrônimo de três letras ou um símbolo de letra como a seguir = Ala ou A, arginina; Arg ou R, asparagina = Asn ou N, ácido aspártico = Asp ou D, cisteína = Cys ou C, ácido glutâmico = Glu ou E, glutamina = Gln ou Q, glicina = Gly ou G, histidina = His ou H, isoleucina = Ile ou I, leucina = Leu ou L, lisina = Lys ou K, metionina = Met ou M, fenilalanina = Phe ou F, prolina = Pro ou P, serina = Ser ou S, treonina = Thr ou T, triptofano = Trp ou W, tirosina = Tyr ou Y, e valina = Val ou V. Além disso, o termo “equivalente a aminoácido” refere-se a compostos que saem da estrutura dos aminoácidos ocorrendo naturalmente, mas que têm

substancialmente a estrutura de um aminoácido, de modo que eles podem ser substituídos em um peptídeo, que retém sua atividade biológica a despeito da substituição. Assim, por exemplo, equivalentes de aminoácidos podem incluir aminoácidos tendo modificações ou substituições na cadeia lateral, e também incluem ácidos orgânicos relacionados, amidas ou outros. O termo “aminoácido” pretende incluir equivalentes de aminoácidos. O termo “resíduos” refere-se a ambos aminoácidos e equivalentes de aminoácidos. Os aminoácidos também podem ser classificados nos seguintes grupos como é comumente conhecido na arte: (1) aminoácidos hidrofóbicos: His, Trp, Tyr, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala; (2) aminoácidos hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr; (3) aminoácidos polares: Ser, Thr, Asn, Gln; (4) aminoácidos ácidos/negativamente carregados: Asp, Glu; (5) aminoácidos carregados: Asp, Glu, Arg, Lys, His; (6) aminoácidos positivamente carregados: Arg, Lys, His; e (7) aminoácidos básicos: His, Lys, Arg.

Como usado aqui, “tecido excitável” significa tecido que contém células excitáveis. Células excitáveis são células que respondem ativamente a um estímulo elétrico e têm um diferencial de carga elétrica através de suas membranas celulares. Células excitáveis são geralmente capazes de sofrer um potencial de ação. Estas células expressam tipicamente canais, como canais ligados por voltagem, ligados por ligando e canais de esticamento, que permitem fluxo de íons (potássio, sódio, cálcio, cloro, etc.) através da membrana. Tecido excitável inclui neuronal, tecido do músculo e tecido glandular. O tecido excitável inclui, mas não está limitado a tecidos neuronais como tecido do sistema nervoso periférico (ouvido e retina) e sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal); tecido cardiovascular como as células do coração e nervos associados; e tecido glandular como o pâncreas onde canais de cálcio do tipo T junto com junções de fendas célula-a-célula participam na secreção de insulina. Uma lista exemplar de tecido excitável inclui órgãos e tecidos que incluem nervos, músculo esquelético,

músculo liso, músculo cardíaco, útero, sistema nervoso central, medula espinhal, retina, sistema olfativo, sistema auditivo, etc.

O termo “célula hospedeira”, como usado aqui, refere-se à célula de indivíduo particular transfectada com uma molécula de ácido nucleico e a progênie ou progênie potencial desta célula. A progênie desta célula não pode ser idêntica à célula parental transfectada com a molécula de ácido nucleico devido a mutações ou influências ambientais que podem ocorrer nas gerações seguintes ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

Um polipeptídeo “isolado” ou purificado” é substancialmente isento de material celular ou outras proteínas contaminantes da fonte da célula ou tecido do qual a proteína ou polipeptídeo é derivado, ou substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizado. A linguagem “substancialmente isento de material celular” inclui preparações de um polipeptídeo em que o polipeptídeo é separado de componentes celulares das células do qual ele é isolado ou recombinantemente produzido. Assim, um polipeptídeo que é substancialmente isento de material celular inclui preparações de polipeptídeos tendo menos do que cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) de proteína heteróloga (também referida aqui como uma “proteína contaminante”). Quando o polipeptídeo é recombinantemente produzido, ele também é substancialmente isento de meio de cultura, isto é, o meio de cultura representa menos do que cerca de 20%, 10% ou 5% do volume da preparação de proteína. Quando o polipeptídeo é produzido por síntese química, ele é preferivelmente substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos, isto é, ele é separado de precursores químicos ou outros produtos químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. Conseqüentemente, tais preparações de polipeptídeo têm menos do que cerca de 20%, 10%, 5% (em peso seco) de precursores químicos ou

compostos diferentes do anticorpo de interesse. Em uma forma de realização preferida, os polipeptídeos da invenção são isolados ou purificados.

Uma molécula de ácido nucleico “isolada” é a que é separada de outras moléculas de ácido nucleico que estão presentes na fonte natural da molécula de ácido nucleico. Além disso, uma molécula de ácido nucleico “isolada”, como uma molécula de cDNA, pode ser substancialmente isenta de outro material celular, ou meio de cultura quanto produzida por técnicas recombinantes, ou substancialmente isenta de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizada. Em uma forma de realização específica, uma molécula(s) de ácido nucleico codificando um polipeptídeo da invenção é isolada ou purificada.

Como usado aqui em referência a uma estrutura em um polipeptídeo, o termo “motivo” refere-se tanto a um conjunto de aminoácidos consecutivos na sequência de aminoácidos da cadeia de polipeptídeo e/ou um conjunto de aminoácidos linearmente adjacentes na estrutura terciária de referido polipeptídeo. Devido ao motivo poder ser formado todo ou em parte como um resultado de duplicação de proteína, os aminoácidos que estão adjacentes no motivo descrito podem ser separados por 0, 1 ou mais, 5 ou mais, 10 ou mais, 15 ou mais ou 20 ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos lineares do polipeptídeo.

Como usado aqui, os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” e “proteína” são usados intercambiavelmente e em seu sentido mais amplo para referir-se a sequências de aminoácidos limitadas (isto é, tendo algum elemento da estrutura como, por exemplo, a presença de aminoácidos que iniciam uma rotação β ou folha β dobrada, ou, por exemplo, ciclizado pela presença de resíduos Cys ligados a dissulfeto) ou não limitadas (por exemplo, lineares). Em certas formas de realização, o peptídeo da invenção consiste de menos do que 30 aminoácidos. No entanto, quando da leitura da presente descrição, os versados na arte reconhecem que não é o comprimento de um

peptídeo particular mas sua capacidade de ligar um complexo de receptor do protetor de tecido e/ou competir com a ligação de um peptídeo descrito aqui que distingue o peptídeo da invenção. Os termos “peptídeo”, “polipeptídeo” e “proteína” referem-se também a compostos contendo equivalentes de aminoácidos ou outros grupos não aminoácidos, enquanto ainda retendo a atividade funcional desejada de um peptídeo. Os equivalentes de peptídeo podem diferir de peptídeos convencionais pela substituição de um ou mais aminoácidos com ácidos orgânicos relacionados (como PABA), aminoácidos ou semelhantes ou a substituição ou modificação de cadeias laterais ou grupos funcionais.

O termo “prevenir uma doença, distúrbio, ou condição” significa retardar o início, impedir o aparecimento, proteção contra, inibir ou eliminar a emergência, ou reduzir a incidência da doença, distúrbio, ou condição. O uso do termo “prevenção” não pretende implicar que todos os pacientes em uma população de pacientes administrados com uma terapia preventiva nunca desenvolverão a doença, distúrbio, ou condição marcada para a prevenção, mas, ao contrário, que a população de pacientes demonstrará uma redução na incidência da doença, distúrbio, ou condição. Por exemplo, muitas vacinas de influenza não são 100% efetivas na prevenção de influenza nos administrados com a vacina. Um versado na arte pode prontamente identificar pacientes e situações para os quais terapia preventiva pode ser benéfica, como, mas não limitada a, indivíduos que estão próximos a se engajar em atividades que podem levar a trauma e dano (por exemplo, soldados engajados em operações militares, motoristas de carros de corrida, etc.), pacientes para os quais cirurgia é planejada, pacientes em risco de doenças, distúrbios ou condições hereditárias, pacientes em risco de doenças, distúrbios ou condições precipitadas por fatores ambientais, ou porções da população em risco de doenças, distúrbios ou condições particulares como idosos, crianças, ou os com sistemas imunológicos

enfraquecidos, ou os pacientes com fatores genéticos ou outros fatores de risco para uma doença, distúrbio ou condição.

Como usado aqui, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados intercambiavelmente. Como usado aqui, os termos “indivíduo” e “indivíduos” refere-se a um animal, preferivelmente um mamífero incluindo um não primata (por exemplo, uma vaca, porco, cavalo, gato, cachorro, rato e camundongo) e um não primata (por exemplo, um macaco ou um humano), e mais preferivelmente um humano.

Como usado aqui, o termo “atividade protetora de tecido” ou “proteção de tecido” refere-se ao efeito de inibir ou retardar dano ou doença de uma célula, tecido ou órgão. A menos que indicado ao contrário, o “retardo” no dano ou doença de uma célula, tecido ou órgão é avaliado com relação a uma condição de controle na ausência de um peptídeo da invenção. A atividade protetora de tecido é utilizável em várias condições, doenças, e dano de célula, órgão e/ou tecido, por exemplo, os descritos na seção 5.3. Esta atividade protetora de tecido é específica em tecido, células e/ou órgãos expressando um complexo de receptor do protetor de tecido (isto é, um tecido, célula e/ou órgão, respectivamente), como, mas não limitados a tecidos do sistema nervoso central. Nas formas de realização específicas, as células responsivas não são células progenitoras de eritrócitos.

O termo “complexo de receptor do protetor de tecido” como usado aqui significa um complexo compreendendo pelo menos uma subunidade de receptor de eritropoietina e pelo menos uma subunidade de receptor comum beta. O complexo de receptor do protetor de tecido pode conter subunidades de receptor de eritropoietina múltiplas e/ou subunidades de receptor comuns beta, bem como outros tipos de receptores ou proteínas. Ver WO 2004/096148, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Para determinar a porcentagem de identidade de duas seqüências de aminoácidos, as seqüências são alinhadas para fins de

comparação ótimos. Os resíduos de aminoácidos nas posições de aminoácido correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira seqüência é ocupada pelo menos resíduo de aminoácidos como a posição correspondente na segunda seqüência, então as moléculas são idênticas naquela posição. A porcentagem de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências (isto é, % de identidade = número de posições de sobreposição idênticas/ número total de posições X 100%). Em uma forma de realização, as duas seqüências têm o mesmo comprimento. Em uma forma de realização alternativa, as seqüências são de comprimento diferente e, conseqüentemente, a porcentagem de identidade refere-se a uma comparação da seqüência mais curta em uma porção da seqüência mais longa, em que referida porção tem o mesmo comprimento como referida seqüência mais curta.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 descreve os resultados de um modelo de dano ao nervo ciático *in vivo* para comparar a eficácia do peptídeo J (SEQ ID NO: 41) com EPO carbamilado na molécula protetora de tecido (CEPO), em que o peptídeo J, SEQ ID NO: 41, é um peptídeo quimérico consistindo de aminoácidos voltados para o exterior da hélice B de EPO (isto é, peptídeo G, SEQ ID NO: 40) combinada com uma hélice anfipática de polipeptídeo pancreático (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO: 28)

Figura 2 descreve os efeitos protetores de tecido dos peptídeos da invenção como testado em um modelo de dano ao nervo ciático *in vivo*. No teste, o nervo ciático direito de ratos (n=6 por grupo) foi danificado e o animal imediatamente dosado com PBS, ou concentrações molares iguais contendo PBS de EPO carbamilado, peptídeo A de EPO (SEQ ID NO: 32, correspondendo a aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 1), peptídeo D (SEQ ID NO: 30, correspondendo a aminoácidos 58-82 de SEQ ID NO: 1), ou peptídeo G (SEQ ID NO: 40). O peptídeo G (SEQ ID NO: 40) é baseado nos

aminoácidos na hélice B de EPO que fazia externamente do centro globular da molécula de EPO no ambiente hidrofílico, isto é, presente na superfície do polipeptídeo. Além disso, uma construção de 20 mers de uma região de fator derivado de epitélio do pigmento que é protetor, como se sabe, de tecido via um outro receptor foi incluído como um controle negativo. A recuperação do dano durante os 4 dias seguintes demonstra que o peptídeo G, SEQ ID NO: 40, e peptídeo D, SEQ ID NO: 30, demonstram um efeito protetor de tecido neste teste em modelo *in vivo* que é equivalente a ou melhor do que EPO carbamilado (CEPO).

Figura 3 descreve os efeitos eritropoiéticos do peptídeo D, SEQ ID NO: 30, e CEPO, que é desprovido, como se sabe, de atividade eritropoiética, como testado em um teste UT-7 para atividade eritropoiética. Os resultados deste teste *in vitro* demonstra que nem o peptídeo D, SEQ ID NO: 30, nem CEPO demonstram atividade eritropoiética em doses de até 10.000 pM.

Figura 4 descreve os resultados de um teste *in vivo* para determinar se o peptídeo F (SEQ ID NO: 33, correspondendo a aminoácidos 14-29 de SEQ ID NO: 1) e peptídeo G (SEQ ID NO: 40) são eritropoiéticos ou elicitam anticorpos neutralizantes contra EPO. Os resultados demonstram que nenhuma proteína aumentou os níveis de hemoglobina nos ratos quando administrada em 0,8 µg/kg, 3 dias/ semana subcutaneamente (s.c.) durante o curso de 130 dias. Além disso, nenhum peptídeo elícita uma resposta de anticorpo, em contraste com a administração de EPO.

Figura 5 descreve os resultados de estudos *in vitro* que demonstram que o peptídeo D, SEQ ID NO: 30, protege neurônios motores contra morte induzida por kainate.

Figura 6 mostra que o peptídeo D, SEQ ID NO: 30, em doses de 0,1 ng/ml e 1 ng/ml, protege as células P-19 contra apoptose associada com privação de soro.

Figuras 7 A-B descrevem os resultados de um teste de oclusão de artéria cerebral central em ratos. A figura 7A descreve um gráfico demonstrando que o peptídeo D (SEQ ID NO: 30, correspondente a aminoácidos 58-82 de SEQ ID NO: 1), em uma dose única de 4,4 µg/kg, é capaz de reduzir o volume do infarto cerebral tão fortemente como quatro doses de 4,4 µg/kg administradas 2 horas separadamente. Figura 7B descreve os resultados de um teste de defeito no pé para determinar o déficit comportamental causado pela oclusão da artéria cerebral central. Figura 7B mostra que os ratos demonstraram melhoras comportamentais quando administrado o peptídeo D, SEQ ID NO: 30, em ambos um programa de dose única (1 x 4,4 µg/kg) e um programa de dose múltipla (4x4,4 µg/kg).

Figuras 8 A-B descrevem os resultados de um teste *in vivo* de um teste de neuropatia diabética. Diabetes é induzido em ratos usando estreptozotocina. Após verificação do diabetes induzido, os ratos foram tratados com peptídeo D, SEQ ID NO: 30, ou PBC cinco vezes por semana em uma dose de 4 µg/kg-peso corporal i.p. durante um período de duas semanas. Tanto a velocidade de condução do nervo como latência na placa quente dos ratos foram observadas. Figura 8A demonstra que os ratos tratados com o peptídeo D, SEQ ID NO: 30, demonstraram velocidades de condução melhoradas em comparação com ratos não tratados. Figura 8B demonstra que a latência na placa quente para os ratos tratados foi reduzida com relação aos ratos não tratados, demonstrando ainda a melhora na velocidade de condução.

Figuras 9 A-B descrevem os resultados de tratamento de neuropatia e nefropatia induzidas por cisplatina com quimera de hélice B de EPO. A figura 9A demonstra que os animais tratados com o peptídeo G (SEQ ID NO: 40, uma quimera de hélice B) demonstraram resultados melhorados quando testados em um teste de latência com placa quente. Figura 9B demonstra que a produção de urina, uma medida da função renal, foi mantida como normal nos animais tratados com peptídeo G (SEQ ID NO: 40).

Figura 10 descreve os efeitos do peptídeo D (SEQ ID NO: 30) na ligação retinal associada com retinopatia diabética. A figura demonstra que o peptídeo D (SEQ ID NO: 30) foi capaz de reduzir substancialmente o vazamento retinal nos animais tratados.

5 Figura 11 descreve os resultados do peptídeo F (SEQ ID NO: 33) ou peptídeo G (SEQ ID NO: 40) em um modelo de isquemia-reperfusão renal. A figura demonstra que ambos os peptídeos reduziram a classificação de danos resultantes de um dano por isquemia-reperfusão de 60 minutos quando avaliados após 72 horas.

10 Figura 12 ilustra que a administração do peptídeo F (SEQ ID NO: 33) protege camundongos de malária cerebral experimental.

 Figura 13 Classificação clínica em modelo EAE de murinos tratados com o peptídeo E, SEQ ID NO: 31. A figura 13 descreve a fonte clínica da função neurológica em camundongos com encefalomielite autoimune experimental. 4,4 µg/kg de peptídeo E foram administrados i.p. diariamente. A administração do peptídeo E melhorou significativamente a função neurológica com relação ao controle. Representação clínica; 1, cauda flácida; 2, ataxia e/ou paresia de membros traseiros, ou reflexo lento de se endireitar; 3, paralisia de membros traseiros e/ou paresia de membros
15 dianteiros; 4, paresia de membro dianteiro; 5, moribundo ou morto.
20

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5.1 PEPTÍDEOS PROTETORES DE TECIDO

 A atividade eritropoiética de eritropoietina (“EPO”) é bem caracterizada na arte (ver, por exemplo, Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5; 861-866, incorporado aqui por referência em sua totalidade). EPO
25 inicia eritropoiese ligando-se à porção extracelular de um homodímero receptor de eritropoietina pré-formado (EPOR) (isto é, (EPOR)₂) de um modo que se liga entre locais específicos nas subunidades de EPOR individuais. Quando EPO liga-se a (EPOR)₂, grandes porções de ligando globular estão

distantes de regiões de ligação e face externa, afastadas o complexo de EPO e (EPOR)₂ no meio aquoso. Os requerentes determinam que a proteção de tecido, como distinta de eritropoiese, é mediada através de um receptor diferente de (EPOR)₂, que consiste de um monômero de EPOR em conjunto com um outro receptor, CD131 (também conhecido como a subunidade de receptor comum β (β_c)). EPOR e β_c interagem para formar o heterodímero receptor, EPOR- β_c . Se outras proteínas estão envolvidas nesta interação é atualmente desconhecido. A presente invenção descreve peptídeos protetores de tecido derivados da estrutura tridimensional de EPO, e, em particular, de porções de EPO voltadas afastadas dos sítios de ligação de EPO, isto é, não interagindo com, o homodímero de EPOR eritropoiético (EPOR)₂ clássico. Não desejando ficar limitado por qualquer teoria particular, os requerentes acreditam que esta porção da molécula de EPO interage com o receptor do protetor de tecido e, deste modo, media a proteção de tecido.

A estrutura tridimensional de EPO é aceita como descrito por Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5; 861-866, incorporado aqui por referência em sua totalidade, como descrito em SEQ ID NO: 1 (também disponível como dados depositados em Protein Data Bank of the National Center for Biotechnology Information como entrada "IBUY"). As porções da molécula de EPO voltadas afastadas da porção proximal da membrana do homodímero de EPOR quando ligadas a referido receptor (isto é, afastadas da membrana celular quando o homodímero (EPOR)₂ é expressado na superfície de uma célula) consistem das seguintes estruturas secundárias: laço AB (correspondendo a aminoácidos 29-55 de SEQ ID NO: 1), hélice B (correspondendo a aminoácidos 56-82 de SEQ ID NO: 1), laço BC (correspondendo a aminoácidos 83-92 de SEQ ID NO: 1) e laço CD (correspondendo a aminoácidos 112-138 de SEQ ID NO: 1). Em uma forma de realização da invenção, os peptídeos protetores de tecido consistem de seqüências de aminoácidos correspondentes a estas estruturas distintas da

molécula de EPO.

Não desejando ficar limitados a qualquer teoria em particular, os requerentes acreditam que o receptor do protetor de tecido é pré-formado, isto é, que o EPOR e subunidades da proteína β_c são funcionalmente associados antes de sua interação com EPO. EPO é um membro da superfamília de citocina tipo 1. Membros de ramos da superfamília de citocina tipo 1 são caracterizados por quatro hélices que interagem hidrofobicamente para formar uma proteína globular cuja superfície exterior interfaceia com o meio aquoso e é denominado “como voltado para o exterior”. Inesperadamente, os requerentes determinaram que mais do que um peptídeo derivado da porção voltada para o exterior da molécula de EPO é protetor de tecido. Uma outra descoberta surpreendente é que os peptídeos derivados de porções da molécula de EPO que são colocados no complexo EPO:(EPOR)₂ e peptídeos que também podem conter porções de 1 ou 2 sítios de ligação de eritropoiese também são altamente potentes na proteção de tecido. Para calcular estas descobertas, os requerentes propõem que a ativação bem-sucedida do receptor do protetor de tecido é devido a uma configuração de carga espacialmente compacta apropriada no ligando de peptídeo. Além disso, esta configuração de carga compacta é corporificada por dois motivos estruturais distintos: (1) dois aminoácidos negativamente carregados adjacentes um ao outro, e flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos; ou (2) um aminoácido positivo e um negativo (isto é, básico e ácido) imediatamente adjacente um ao outro, e flanqueados por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos únicos ou polares. A proximidade destas cargas pode ocorrer via a estrutura linear imposta pela ligação de peptídeo, isto é, a estrutura pode ser formada por aminoácidos consecutivos em uma cadeia de polipeptídeo, ou alternativamente, a proximidade pode ocorrer via uma relação espacial entre partes diferentes da molécula de EPO (ou outras moléculas de citocina tipo 1 relacionadas) conferidas pela estrutura terciária da proteína, isto é, estrutura

tridimensional. Não desejando ficar limitado a qualquer teoria específica, os requerentes acreditam que, em geral, este requisito dita que um peptídeo protetor de tecido terá uma estrutura terciária distinta (por exemplo, hélices ou folhas dobradas) que provê o local espacial requerido do par de aminoácidos carregados (isto é, os dois aminoácidos negativamente carregados e/ou o aminoácido positivo e negativo). Uma única exceção é um peptídeo linear em que o par de aminoácidos é imediatamente adjacente um ao outro, com a rigidez requerida conferida pela estrutura dorsal do peptídeo. Conseqüentemente, o motivo estrutural (1) é englobado por uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos, por exemplo, $H_1-N_1-N_1-H_2$ (SEQ ID NO: 6) ou por uma seqüência linear de resíduos de aminoácidos em que N_1 e N_2 são separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais resíduos intervenientes, por exemplo, $H_1-N_1-X-X-X-X-N_1-H_2$ (SEQ ID NO: 11).

Para proteção de tecido, o par de aminoácidos carregados deve ser espacialmente orientado de modo que os carbonos de carbonila sejam cerca de 3 angstroms (Å) a cerca de 5 Å afastados, preferivelmente cerca de 4 Å a cerca de 5 Å afastados, e mais preferivelmente cerca de 4,4 Å a cerca de 4,8 Å afastados. Isto pode ser realizado de vários modos, por exemplo, por aminoácidos carregados adjacentes em um peptídeo linear único (ver, por exemplo, exemplo 2 e peptídeo G, SEQ ID NO: 40, tabela 1) ou por peptídeos que podem formar uma hélice alfa, aminoácidos carregados separados por um resíduo de aminoácidos interveniente (ver, por exemplo, exemplo 2 e peptídeo F, SEQ ID NO: 33, tabela 1). Deve ser notado que a estrutura terciária (por exemplo, uma hélice alfa em peptídeos anfipáticos) pode ser conferida quando o peptídeo está em um microambiente específico, como na interface da membrana de superfície de células-extracelulares (ver, Segrest, 1990, Proetins 8: 103-117, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Além disso, a atividade protetora de tecido é prevista para peptídeos que contêm pares de aminoácidos carregados de modo que as

cadeias laterais carregadas (tanto positiva como negativa, como duas negativas) sejam confinadas espacialmente dentro de cerca de 6,5 Å a cerca de 9 Å uma das outras. Isto pode ser provido em uma hélice alfa pelo par carregado sendo separado por um ou dois aminoácidos, que proporcionará que as cargas estejam mais ou menos do mesmo lado da hélice com a separação requerida de cerca de 6,5 Å a 9 Å. Um exemplo não limitante do peptídeo é encontrado no peptídeo F (ver, exemplo 2, SEQ ID NO: 33, tabela 1). Um versado na arte pode divisar uma estrutura terciária para o peptídeo que é geralmente requerido para obter o local tridimensional apropriado dos aminoácidos carregados, bem como o projeto de moléculas pequenas para imitar a separação de carga no peptídeo.

As distâncias espaciais entre os carbonil carbonos de quaisquer aminoácidos ou entre as cadeias laterais de quaisquer dois aminoácidos podem ser deduzidas por qualquer método conhecido na arte ou descrito aqui. Por exemplo, quando a estrutura tridimensional da proteína é conhecida, a separação da carga de duas cadeias laterais ou a distância espacial entre dois carbonil carbonos em uma porção de interesse de referida proteína pode ser calculada com base nas coordenadas tridimensionais publicadas, ou de outro modo aceitas na arte, dos resíduos de aminoácidos em referida porção de interesse. Quando a estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente, a porção de interesse é desconhecida, ou em que um peptídeo totalmente sintético é construído com base nos presentes ensinamentos, cuja estrutura tridimensional é desconhecida, a separação da carga de duas cadeias laterais ou a distância espacial entre dois carbonil carbonos em referido peptídeo pode ser estimada usando a estrutura tridimensional prevista pelo software de modelagem de proteína como é conhecido na arte. Exemplos não limitativos de referido software são MOE™ por Chemical Computing Group (Quebec, Canadá) e Modeler por Accelrys (San Diego, Califórnia). Similarmente, o software previsto disponível das companhias indicadas acima também é

desconhecido também na arte para o projeto de moléculas pequenas assim e, conseqüentemente, um versado na arte, baseado nos presentes ensinamentos, pode ser capaz de produzir moléculas pequenas que emulam os motivos estruturais descritos.

5 Peptídeos não ocorrendo naturalmente ou quiméricos podem ser projetados que imitam as proximidades espaciais críticas descritas acima via uma seqüência linear de aminoácidos. A presente invenção refere-se, assim, a novos peptídeos protetores de tecido, incluindo os que demonstram os motivos estruturais que iniciam a proteção de tecido.

10 A presente invenção refere-se também ao uso de fragmentos protetores de tecido de citocinas tipo 1, mas não limitados a fator de estímulo de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3), trombopoietina (TPO), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e fator inibitório de leucemia (LIF), que são estruturalmente homólogos com as seqüências de
15 aminoácidos presentes externamente em EPO e/ou contêm os motivos estruturais descritos acima.

 Além disso, os peptídeos protetores de tecido podem ser compostos quiméricos baseados nos motivos estruturais descritos acima combinando elementos estruturais não adjacentes e aminoácidos presentes na
20 superfície somente. Em particular, os requerentes determinam que a adição de uma hélice de peptídeo anfipático às seqüências indicadas acima aumenta a potência do peptídeo.

 Além disso, os peptídeos protetores de tecido da presente invenção incluem peptídeos de fusão resultantes da combinação de dois ou
25 mais dos peptídeos acima indicados, ou com uma macromolécula relacionada ou não relacionada para transporte específico, como EPO nativo, insulina ou leptina.

5.1.1. Fragmentos

A. Fragmentos de peptídeos derivados de EPO

A presente invenção refere-se a novos peptídeos protetores de tecido que em uma forma de realização são compreendidos de fragmentos de seqüências de aminoácidos em EPO, derivadas da estrutura tridimensional da proteína de EPO, e, em particular, foram derivados das regiões voltadas

5 afastadas de EPO dos sítios de ligação de ligando e/ou a porção interna do homodímero de EPO. Estes fragmentos são derivados das seguintes estruturas de EPO: (1) laço AB e porção N-terminal da hélice B (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO: 29, correspondendo a aminoácidos 38-57 de SEQ ID NO: 1); (2) porção C-terminal da hélice B

10 (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO: 30, correspondendo a aminoácidos 58-82 de SEQ ID NO: 1), e (3) uma porção do laço A-B consistindo de uma] pequeno laço de cisteína e uma folha dobrada β (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO: 31, correspondendo a aminoácidos 28-47 de SEQ ID NO: 1). Estes fragmentos de peptídeo também

15 são demonstrados no exemplo 2 (ver figura 1 e tabela 1) para demonstrar propriedades de proteção de tecido.

Inesperadamente, alguns peptídeos derivados de outras regiões da molécula de EPO que são colocados e outros peptídeos que incluem porções dos sítios de ligação em (EPOR)₂ também são protetores de tecido.

20 Por exemplo, um peptídeo consistindo da porção N-terminal da hélice A (APPRLICDSRVLRLRYLLEAKEAE, SEQ ID NO: 32, correspondendo a aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 1) que contém uma porção do sítio 2 de ligação de EPOR (sublinhado) é protetor de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1). No entanto, a presença de aminoácidos no sítio 2 não leva em conta a

25 atividade protetora de tecido, como um peptídeo consistindo de aminoácidos 14-19 de SEQ ID NO: 1 (RYLLEAKEAENITTGC, SEQ ID NO: 33) e faltando os aminoácidos 11-13 de SEQ ID NO: 1 (isto é, VLE; os aminoácidos do sítio 2, que são requeridos para ligação de EPO ao dímero de EPOR (EPOR)₂, também são protetores de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1,

também Elliott et al., 1997, Blood 89: 493, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Os requerentes mostraram anteriormente que mutações nos sítios de ligação de eritropoiese que abolem eritropoiese não modificam as propriedades protetoras de tecido de EPO (Leist et al., Science (2004) 305: 239, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Os versados na arte irão reconhecer que os fragmentos de comprimentos variados podem formar um peptídeo protetor de tecido, embora o fragmento tenha preferivelmente menos do que 30 aminoácidos em comprimento. Além disso, a seleção judiciosa de outras moléculas para inclusão, por exemplo, D-aminoácidos ou polietileno glicol, também irá constituir peptídeos protetores de tecido, mas com meias-vidas biológicas melhoradas.

A. Motivos estruturais

Especificamente, os seguintes motivos estruturais foram identificados os quais iniciam o complexo de receptor do protetor de tecido.

(a) Uma configuração de carga negativa (“Motivo Estrutural A”)

Neste motivo estrutural, o peptídeo possui dois aminoácidos negativamente carregados, que podem ser separados por até 5 aminoácidos, flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos. Estruturalmente isto pode ser representado como:

- (a1) HNNH;
- (a2) HNXNH;
- (a3) HNXXNH;
- (a4) HNXXXNH;
- (a5) HNXXXXNH; ou
- (a6) HNXXXXXNH,

onde H representa aminoácidos hidrofóbicos (por exemplo, os aminoácidos moderadamente hidrofóbicos: glicina, prolina, cisteína, tirosina e triptofano, e preferivelmente os aminoácidos altamente hidrofóbicos: alanina, valina,

isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina), N representa um aminoácido negativamente carregado como glutamato ou aspartato, e X representa qualquer aminoácido, embora preferivelmente um hidrofílico. Em certas formas de realização, os aminoácidos hidrofóbicos de flanco são os mesmos.

5 Em outra forma de realização, os aminoácidos de flanco são diferentes.

Uma variação deste motivo estrutural envolve um peptídeo onde um dos aminoácidos hidrofóbicos de flanco foi substituído com um aminoácido polar como serina, treonina, asparagina ou glutamina.

10 Como uma alternativa para ligações de peptídeos estabelecendo a proximidade mútua de duas cargas negativas em uma sequência linear, a proximidade de carga necessária também pode ser realizada por uma estrutura tridimensional como discutido acima (Seção 5.1). Por exemplo, os aminoácidos negativamente carregados podem estar espacialmente imediatamente adjacentes sobre a superfície externa de uma

15 hélice, mas serão separados por aminoácidos adicionais na sequência de peptídeos linear. Por exemplo, na hélice A de EPO (correspondendo a aminoácidos 10-28 de SEQ ID NO: 1), E18 e E21 estão adjacentes sobre a estrutura tridimensional, mas têm dois aminoácidos intervenientes entre os mesmos na sequência de peptídeos linear. Como um outro exemplo, na hélice

20 B (peptídeo D, SEQ ID NO: 30; correspondendo a aminoácidos 58-82 de SEQ ID NO: 1) E62 e E72 são separados por dois aminoácidos (Q65 e L69) na superfície da hélice, mas têm 9 aminoácidos entre os mesmos no peptídeo linear. Os peptídeos construídos da hélice A ou hélice B são protetores de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1, *infra*). Em contraste, o peptídeo B

25 (NITTGCAEHCSLNE, SEQ ID NO: 34), um peptídeo com cargas negativas duplas (sublinhadas) na distância apropriada, mas faltando um aminoácido hidrofóbico de flanco, não é protetor de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1, *infra*).

(b) Configuração de aminoácidos negativos/ positivos (“Motivo Estrutural

B'').

Neste motivo estrutural, o peptídeo tem um aminoácido positivo próximo a um aminoácido negativo e ambos os aminoácidos carregados são flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos únicos.

5 Estruturalmente isto pode ser representado como:

(b1) HNPH; ou

(b2) HPNH,

onde P representa aminoácidos positivamente carregados como arginina, lisina ou histidina, e N representa os aminoácidos negativamente carregados glutamato ou aspartato. Como com o primeiro motivo, a proximidade mútua das duas cargas opostas pode ser realizada pela estrutura tridimensional. Por exemplo, um aminoácido positiva e negativamente carregado pode estar espacialmente adjacente sobre a superfície de uma hélice, mas será separado por um ou mais aminoácidos na sequência de peptídeos linear. Por exemplo, na hélice B (correspondendo a aminoácidos 58-82 de SEQ ID NO: 1) E72 e R76 estão imediatamente adjacentes um ao outro sobre a superfície externa da hélice e um peptídeo construído desta hélice é protetor de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1).

20 Em uma variação deste motivo particular, os aminoácidos negativo e positivo podem ser separados por um aminoácido polar, por exemplo,

(b3) HNLPH;

(b4) HPLNH,

em que L representa aminoácidos polares como serina, treonina, asparagina ou glutamina. Um exemplo deste motivo é peptídeo E (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO: 34), que é protetor de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1).

Dado que o núcleo do motivo estrutural acima são quatro aminoácidos de comprimento, um peptídeo deste motivo estrutural no núcleo

pode iniciar o receptor do protetor de tecido. Em certas formas de realização, os polipeptídeos da invenção compreendem 1 motivo estrutural. Em formas de realização alternativas, os polipeptídeos da invenção compreendem mais do que 1, mais do que 2, mais do que 3 ou mais do que 4 dos motivos estruturais. Em certas formas de realização, em que o polipeptídeo compreende pelo menos dois motivos estruturais, os motivos são os mesmos. Em formas de realização alternativas, em que o polipeptídeo compreende pelo menos dois motivos estruturais, os motivos são diferentes. Preferivelmente, os múltiplos peptídeos da presente invenção que um versado na arte pode gerar são menos do que 30 aminoácidos em comprimento.

Os versados na arte irão reconhecer que são os motivos estruturais acima indicados, como oposto à seqüência de aminoácidos em EPO atual, que são importantes para a presente invenção. Assim, um versado na arte pode reconhecer que o peptídeo isolado pode ter menos do que 90%, menos do que 85%, menos do que 80%, menos do que 75%, menos do que 70%, menos do que 65%, menos do que 60%, menos do que 55%, menos do que 50%, menos do que 45%, menos do que 40%, menos do que 35%, menos do que 30% ou menos do que 20 por cento da seqüência de identidade com qualquer porção da seqüência de aminoácidos de eritropoietina madura humana (“EPO”) descrita em SEQ ID NO: 1, em que referida porção de EPO contém o mesmo número de resíduos de aminoácidos como o referido peptídeo.

Além disso, a patente US 5.700.909 para O’Brien et al., incorporada aqui por referência em sua totalidade, descreve uma seqüência de peptídeos em EPO de 17 aminoácidos (SEQ ID NO: 11 de O’Brien) que induz atividade biológica em células NS20Y, SK-N-MC, e PC12 incluindo germinação, diferenciação, neuroproteção e prevenção de morte de células neuronais. SEQ ID NO: 11 de O’Brien (designado epopeptídeo AB), apesar de profeticamente descrita ter atividade eritropoiética, de fato é desprovida

desta atividade eritropoiética e verificou-se subsequente desprovida de atividade *in vivo*. Quando o epeptídeo AB foi injetado no músculo do camundongo, a frequência de germinação na placa da extremidade motora nos músculos adjacentes aumentou de um modo similar ao induzido pelo fator neurotrófico ciliar. Estes dados são interpretados dentro do conceito de que células neuronais (mas não hematológicas) respondem a uma seqüência de peptídeo em EPO e que EPO pode ter domínios separados para atividade neurotrófica e hematotrófica (Campana et al., Int. J. Mol. Med. (1998) 1(1): 235-241; J.S. O'Brien na patente US 5.700.909, expedida em 23 de dezembro de 1997; J.S. O'Brien na patente US 5.571.787, expedida em 5 de novembro de 1996; J.S. O'Brien na patente US 5.714.459, expedida em 3 de fevereiro de 1998; e J.S. O'Brien e Y. Kashimoto na patente US 5.696.080, expedida em 9 de dezembro de 1997). No entanto, O'Brien não apreciou os presentes motivos estruturais com base na proximidade de aminoácidos carregados na estrutura terciária do peptídeo.

C. Fragmento de citocina tipo 1.

Dada a configuração de carga espacialmente compacta capaz de ativar o receptor do protetor de tecido, os requerentes descobriram que espera-se que certos fragmentos de citocinas tipo 1 reajam de modo cruzado com o receptor do protetor de tecido. Esta família de citocinas inclui, mas não está limitada a, interleucina (IL)-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11. Fator de estímulo de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), leptina, fator de estímulo de colônia de granulócitos (G-CSF), fator de inibição de leucemia (LIF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), trombopoietina (TPO), hormônio de crescimento, fator de estímulo de colônia de macrófagos (M-CSF), eritropoietina (EPO) e prolactina.

A consideração da estrutura secundária de EPO provê orientação para a preparação de um peptídeo protetor de tecido candidato via o arranjo espacial de aminoácidos derivados de aminoácidos homólogos

localizados em estruturas secundárias homólogas em outros ligandos receptores de citocina tipo 1: por exemplo, GM-CSF e IL-3 (Kannan, 2000, Neuroimmunomod. 8: 132-141, incorporado aqui por referência em sua totalidade), dentre outros, mostram possuir atividades neurotróficas e neuroprotetoras potentes, devido em grande parte, acreditam os requerentes, por estimularem um receptor do protetor de tecido. Por exemplo, considerando a hélice B destas citocinas tipo 1: Aminoácidos homólogos em trombopoietina (TPO; Protein Data Bank (PDB) acesso IV7M) compreendem D62, G65, T68, L69, E72, A76 e Q80, em que estes aminoácidos estão espacialmente adjacentes uns aos outros em um arranjo linear; aminoácidos homólogos em fator inibitório de leucemia (LIF; PDB acesso IEMR) compreendem E61, R64, Y68, S72, N75 e D79; aminoácidos homólogos em fator neurotrófico ciliar (CNTF; PDB acesso ICNT) compreendem E71, E75. Todos estes são exemplos do Motivo A descrito acima (seção 5.1.1), em que os aminoácidos sublinhados são negativamente carregados.

Exemplos de peptídeos derivados de citocinas tipo 1 que exemplificam o Motivo B estrutural descrito acima (seção 5.1.1) incluem, mas não estão limitados a, fragmento de hélice A em GM-CSF, WEHVNAIQEARRLL (SEQ ID NO: 35); fragmento de hélice A em TPO, LSKLLRDSHVLH (SEQ ID NO: 36); fragmento de hélice B em TPO: E56, K59; fragmento de hélice A em CNTF, KIRSDLTALTESYVKH (SEQ ID NO: 37); fragmento de hélice B em CNTF: R89, E92. Fragmento de hélice B em LIF, GTEKAKLVELYRIVVYL (SEQ ID NO: 38); e fragmento de hélice A em interleucina 3 (IL-3), SIMIDEIIHHLKRPPNPL (SEQ ID NO: 39).

Os aminoácidos acima mencionados são meramente exemplares de alguns membros da superfamília de citocina que sinalizam através de receptores de citocina tipo 1, e regiões homólogas em outros membros da superfamília de citocina serão prontamente identificadas pelos versados na arte.

5.1.2 Quimeras

Seqüências de aminoácidos lineares de peptídeos protetores de tecido “quiméricos” que incorporam elementos estruturais não lineares dos aminoácidos voltados para o exterior de molécula de EPO demonstram os motivos estruturais indicados acima – também são contempladas pela presente invenção. Os peptídeos protetores de tecido quiméricos da presente invenção podem consistir de elementos estruturais combinados de seqüências de aminoácidos separadas em um peptídeo único. Em outras palavras, um peptídeo protetor de tecido quimérico pode ser compreendido de seqüências de aminoácidos derivadas de elementos estruturais não lineares mas adjacentes como um fragmento derivado de seqüências de aminoácidos 110-115, 133-136 e 160-165, de SEQ ID NO: 1, que pode dar os elementos estruturais da porção C-terminal da hélice C e porção N-terminal do laço C-D, a folha dobrada β no laço C-D, e a porção C-terminal de EPO estar contida em um peptídeo único. Além disso, os peptídeos protetores de tecido quiméricos podem ser usados para selecionar os aspectos importantes de uma estrutura particular, Por exemplo, os aminoácidos voltados para o exterior de uma estrutura terciária particular. Assim, um peptídeo protetor de tecido quimérico pode consistir de um fragmento compreendido de aminoácidos de hélice B 58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84 e 85 (por exemplo, peptídeo G, QEQLERALNSS, SEQ ID NO: 40) ou, em outras palavras, todos os aminoácidos presentes no exterior da hélice B de EPO. Este peptídeo é mostrado ser protetor de tecido no exemplo 2, *infra* (ver tabela 1).

Além disso, a potência dos presentes peptídeos protetores de tecido pode ser aumentada fixando uma hélice de peptídeo anfipática. Hélices de peptídeo anfipáticas são bem conhecidas na arte, por exemplo, de peptídeos que sinalizam através de receptores copulados a proteína G classe B (por exemplo, Segrest et al, 1990, Proteins **8**: 103, incorporado aqui por referência em sua totalidade), servindo para localizar o ligando de peptídeo na

membrana celular. Exemplos destas hélices incluem, mas não estão limitados a regiões altamente hidrofóbicas de: calcitonina (ALSILVLLQAGS, SEQ ID NO: 48); hormônio liberando corticotropina (VALLPCPPCRA, SEQ ID NO: 49); beta endorfina (NAIIKNAYKKG, SEQ ID NO: 50); glucagona (GSWQRSLQDTE, SEQ ID NO: 51); secretina (GGSAARPAPP, SEQ ID NO: 52); polipeptídeo vasointestinal (NALAENDTPYY, SEQ ID NO: 53); neuropeptídeo Y (GALAEAYPSKP, SEQ ID NO: 54); hormônio de liberação de gonadotropina (GCSSQHWSYGL, SEQ ID NO: 55); hormônio da paratireóide (VMIVMLAICFL, SEQ ID NO: 56); polipeptídeo pancreático (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO: 28); e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (LALSILVLYQA, SEQ ID NO: 57) (descritos em Grace et al., 2004, PNAS 101: 12836, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Por exemplo, um peptídeo quimérico feito de um peptídeo com o motivo de carga de superfície da hélice B de EPO (QEQLERALNSS, SEQ ID NO: 40) unido ao término carbóxi na hélice anfipática do polipeptídeo pancreático (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO: 28) para um peptídeo quimérico. Outras modificações podem ser feitas no término carbóxi da hélice anfipática sem afetar suas propriedades protetoras de tecido. Assim, um outro exemplo, substituição da prolina terminal do peptídeo quimérico acima com a sequência TR (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEQ ID NO: 41) gera uma molécula com atividade protetora de tecido potente como demonstrado no teste de nervo ciático (ver figura 1).

Além disso, em vez das hélices indicadas acima, outras estruturas terciárias podem ser fixadas aos peptídeos protetores de tecido. Por exemplo, os aminoácidos presentes no exterior da hélice B podem ser ligados à folha dobrada beta (CSLNENI, SEQ ID NO: 42) encontrada no laço AB de EPO para formar um peptídeo quimérico tendo a sequência CSLNENIQEQLERALNSS (SEQ ID NO: 43), que é protetor de tecido (ver exemplo 2 e tabela 1). Além disso, os aminoácidos presentes da porção

terminal da hélice C (ALGKA, SEQ ID NO: 44, correspondendo a aminoácidos 111, 112, 113, 116 e 118 de SEQ ID NO: 1) podem ser combinados com todo ou parte do laço CD parcial (LGAQKEAISPPDAASAAPLRTI, SEQ ID NO: 45, compreendendo os aminoácidos 112-133 de SEQ ID NO: 1). Preferivelmente, um braço de ligação estará presente entre os peptídeos fundidos para prover flexibilidade de modo que os peptídeos unidos podem assumir a orientação estrutural apropriada para ligar com o complexo de receptor do protetor de tecido. Os peptídeos de fusão podem ter um efeito sinérgico, obtendo um efeito protetor de tecido maior juntamente como oposto a individualmente possivelmente através de ligação melhorada com o complexo de receptor do protetor de tecido ou meia vida biológica aumentada.

Os versados na arte irão reconhecer o benefício de combinar vários elementos estruturais desejados em um peptídeo único para maximizar os efeitos protetores de tecido destes compostos. Estas quimeras podem compreender peptídeos de aminoácidos, e elementos não aminoácidos, como ligadores ou átomos de ligação ou porções.

5.1.3 Peptídeos de fusão

A presente invenção ainda contempla que dois ou mais dos peptídeos protetores de tecido indicados acima, fragmento derivado ou quimera, podem estar ligados a uma proteína relacionada ou não relacionada como eritropoietina, albumina, etc.

5.1.4 Fabricação dos peptídeos protetores de tecido

Os peptídeos protetores de tecido da presente invenção podem ser produzidos usando técnicas recombinantes ou sintéticas bem conhecidas na arte. Em particular, a síntese de proteína em fase sólida é bem apropriada para o comprimento relativamente curto dos peptídeos protetores de tecido e podem prover rendimentos maiores com resultados mais consistentes. Além disso, a síntese de proteína em fase sólida pode prover flexibilidade adicional

com respeito à fabricação dos peptídeos protetores de tecido. Por exemplo, as modificações químicas desejadas podem ser incorporadas no peptídeo protetor de tecido no estágio de síntese: homocitrulina pode ser usada na síntese de peptídeo como oposto a lisina, obviando assim a necessidade de carbamilar o peptídeo após síntese.

Síntese

Na síntese em fase sólida de um peptídeo, um aminoácido com ambos o grupo α -amino e proteção de cadeia lateral é imobilizado em uma resina. Ver, por exemplo, Nilsson, B., Soellner, M., e Raines, R. Chemical Synthesis of Proteins, *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 2005, 34: 91-118; Meldal M. 1997. Property of solid supports. *Methods Enzymol.* 289: 83-104 e Songster MF, Barany G. 1997. Handles for solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289: 126-74. Tipicamente, dois tipos de grupos de proteção α amino são usados: um grupo terc-butoxicarbonila (Boc) sensível a ácido ou um grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) sensível a base. Wellings DA, Atherton E. 1997. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol.* 289: 44-67. Após a remoção rápida e completa destes grupos de proteção α -amino um outro aminoácido protegido com um grupo carboxila ativado pode então ser copulado à amina ligada a resina não protegida. Usando um excesso de aminoácido solúvel ativado, as reações de copulação são forçadas a terminarem. O ciclo de desproteção e copulação é repetido até concluir a seqüência. Com desproteção e clivagem da cadeia lateral, a resina dá o peptídeo desejado. Guy CA, Fields GB, 1997. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. *Methods Enzymol.* 289: 67-83, e Stewart JM. 1997. Cleavage methods following Boc-bases solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289: 29-44. Outros métodos para realizar síntese de proteína em fase sólida são descritos em Bang, D. & Kent, S. 2004. A One-Pot Total Synthesis of Crambin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 2534-2538; Bang, D.,

Chopra, N., & Kent, S. 2004. Total Chemical Synthesis of Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1377-1383; Dawson, P. et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*. 266: 776-779; Kochendoerfer et al. 2003. Design and Chemical Synthesis of a Homogenous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein. *Science*. 299: 884-887. (Cada referência descrita neste

5 parágrafo é incorporada aqui por referência em sua totalidade).

Se necessário, peptídeos menores derivados da síntese de peptídeos de fase sólida podem ser combinados através de ligações de peptídeos como ligação química nativa. Neste processo, o tiolato de um

10 resíduo de cisteína N-terminal de um peptídeo ataca o tioéster C-terminal de um segundo peptídeo para efetuar transtioesterificação. Uma ligação amida se forma após rápida transferência de S→N acila. Ver Dawson, P. Et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*. 266: 776-779, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

15 Além disso, um dos versados na arte pode reconhecer que os peptídeos protetores de tecido da presente invenção podem englobar peptidomiméticos, peptídeos incluindo ambos os aminoácidos ocorrendo naturalmente e não ocorrendo naturalmente, como peptóides. Os peptóides são oligômeros de glicinas N-substituídas, ácido glicólico, tiopronina,

20 sarcosina e tiorfano. Estas estruturas tendem a ter uma estrutura geral de $(\text{-(C=O)-CH}_2\text{-NR-})_n$ com o grupo R agindo como a cadeia lateral. Estes peptóides podem ser sintetizados usando síntese de fase sólida de acordo com os protocolos de Simon et al., Peptoids: A molecular approach to drug Discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 9367-9371 (1992) e Li et al.,

25 Photolithographic Synthesis of Peptoids, *J. AM. CHEM. SOC.* 2004, 126, 4088-4089, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade. Além disso, a presente invenção contempla o uso de peptidomiméticos ou miméticos de peptídeos, fármacos não peptídeos com propriedades análogas às do peptídeo gabarito. (Fauchere, J. (1986) Adv.

Drug. Res. 15-29; Veber e Friedinger (1985) TINS p. 32; e Evans et al. (1987) J. Med. Chem. 30: 1229, que são incorporados por referência. A síntese de vários tipos de peptidomiméticos foi estudada por exemplo em: Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics – Workbench Edition volume E22c (Editor-em-Chefe Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, New York, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Técnicas Recombinantes

Uma variedade de sistemas de hospedeiros-vetores de expressão pode ser utilizada para produzir os peptídeos protetores de tecido da invenção. Estes sistemas hospedeiros-expressão representam veículos pelos quais o peptídeo protetor de tecido de interesse pode ser produzido e subsequentemente purificado, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as seqüências de codificação de nucleotídeos apropriadas, demonstrar o produto do gene de eritropoietina modificado *in situ*. Estes incluem mas não estão limitadas a bactérias, inseto, planta, mamífero, incluindo sistemas de hospedeiros humanos, como, mas não limitados a, sistemas de células de inseto infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo seqüências de codificação de peptídeo protetor de tecido; sistemas de células de planta infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico de couve-flor, CaMV; vírus do mosaico de tabaco, TNV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeos recombinantes (por exemplo, plasmídeo Ti) contendo seqüências de codificação de molécula relacionada a eritropoietina; ou sistemas de células de mamífero, incluindo sistemas de células humanas, por exemplo, HT1080, COS, CHO, BHK, 292, 3T3. abrigando construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados de genoma de células de mamífero, por exemplo, promotor de metalotioneína, ou de vírus de mamífero, por exemplo, o promotor tardio de

adenovírus; o promotor 7.5K do vírus vacínia.

Além disso, a cepa de célula hospedeira pode ser escolhida, a qual modula a expressão de seqüências inseridas ou modifica e processa o produto do gene no aspecto específico desejado. Estas modificações e processamento de produtos de proteína podem ser importantes para a função da proteína. Como os versados na arte sabem, células hospedeiras diferentes têm mecanismos específicos para o processamento pós-translacional e modificação de proteínas e produtos do gene. Linhagens de células ou sistemas de hospedeiros apropriados podem ser escolhidos para assegurar a modificação e processamento corretos da proteína estrangeira expressada. Para este fim, células hospedeiras eucarióticas que possuem o maquinário celular para processamento apropriado do transcrito, glicosilação e fosforilação primárias do produto do gene podem ser usadas. Estas células hospedeiras de mamífero, incluindo células hospedeiras humanas, incluem mas não estão limitadas a HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 e WI38.

Para produção de peptídeos recombinantes com alto rendimento a longo prazo, expressão estável é preferida. Por exemplo, as linhagens de células que expressam estavelmente o produto do gene da molécula relacionada a citocina protetora de tecido recombinante pode ser engenheirado. Em vez de usar os vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados, por exemplo, promotor, melhorador, seqüências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, e outros, e um marcador selecionável. Após a introdução do DNA estrangeiro, as células engenheiradas podem ser deixadas cultivar durante 1-2 dias em um meio enriquecido, e então são comutadas em um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o

plasmídeo em seus cromossomos e cresçam para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhagens de células. Este método pode vantajosamente ser usado para engenheirar linhagens de células que expressam o produto protetor de tecido. As linhagens de células engenheiradas podem ser particularmente utilizáveis na triagem e avaliação de compostos que afetam a atividade endógena do produto do gene da molécula relacionada a EPO.

Outras Modificações

Outras modificações podem ser feitas nos peptídeos protetores de tecido. Por exemplo, o peptídeo pode ser sintetizado com um ou mais (D)-aminoácidos. A escolha de incluir um (L)- ou (D)-aminoácido em um peptídeo da presente invenção depende, em parte, das características desejadas do peptídeo. Por exemplo, a incorporação de um ou mais (D)-aminoácidos pode conferir estabilidade aumentada no peptídeo *in vitro* ou *in vivo*. A incorporação de um ou mais (D)-aminoácidos também pode aumentar ou diminuir a atividade de ligação do peptídeo como determinado, por exemplo, usando os biotestes descritos aqui, ou outros métodos bem conhecidos na arte.

A substituição de toda ou parte de uma seqüência de (L)-aminoácidos pela respectiva seqüência de (D)-aminoácidos enantioméricos dá uma estrutura oticamente isomérica na parte respectiva da cadeia de polipeptídeo. A inversão da seqüência de toda ou parte de uma seqüência de (L)-aminoácidos dá os retro-análogos do peptídeo. A combinação da substituição (L em D, ou D em L) enantiomérica e inversão da seqüência dá análogos retro-inversos do peptídeo. Como os versados na arte sabem, os peptídeos enantioméricos, seus retro-análogos e seus análogos retro-inversos mantêm relação topológica significativa no peptídeo parental, e especialmente alto grau de semelhança é muitas vezes obtido para o parental e seus análogos retro-inversos. Esta relação e semelhança podem ser refletidas em

propriedades bioquímicas dos peptídeos, especialmente alto grau de ligação dos peptídeos respectivos e análogos a uma proteína receptora. A síntese das propriedades de análogos retro-inversos de peptídeos foi discutida por exemplo em *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyk), Synthesis of*
 5 *Peptides and Peptidomimetics – Workbench Edition volume E22c* (Editor-em-Chefe Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, New York), e em referências citadas aqui, todas quais são incorporadas aqui por referência em sua totalidade

“Modificação” de aminoácidos refere-se à alteração de um
 10 aminoácido ocorrendo naturalmente para produzir um aminoácido não ocorrendo naturalmente. Os derivados dos peptídeos da presente invenção com aminoácidos não ocorrendo naturalmente podem ser criados por síntese química ou por incorporação específica do sítio de aminoácidos não naturais em polipeptídeos durante biossíntese, como descrito em Christopher J. Noren,
 15 Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, 1989 *Science*, 244: 182-188, incorporados aqui por referência em sua totalidade.

Miméticos de peptídeo que são estruturalmente similares a peptídeos terapeuticamente utilizáveis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os
 20 peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipeptídeo paradigma (isto é, um polipeptídeo que tem uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica), mas tem uma ou mais ligações de peptídeo opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada do grupo consistindo de: $--CH_2-NH-$, $--CH_2S--$, $--CH_2-CH_2--$; $-CH=CH-$ (cis e trans), $--COCH_2--$, $--CH(OH)CH_2--$,
 25 e $-CH_2SO-$, por métodos conhecidos na arte e ainda descritos nas seguintes referências: Spatola, A.F. em “*Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*,” B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A.F., *Vega Data* (março de 1983), vol. I. Publicação 3, “*Peptide Backbone Modifications*” (estudo geral); Morely, J.S., *Trends*

Pharma Sci (1980) pp. 463-468 (estudo geral); Hudson, D. Et al., (1979) Int J Pept Prot Re 14: 177-185 ($--CH_2-NH--$, $-CH_2-CH_2--$); Spatola, A.F. et al. (1986) Life Sci 38: 1243-1249 ($--CH_2-S$); Hann, M. M., (1982) J Chem Soc Perkin Trans I 307-314 ($-CH=CH--$, cis e trans); Almquist, R. G. et al. (1980) J Med Chem 23: 1392 ($--COCH_2--$); Jennings-White, C et al., (1982) Tetrahedron Lett 23: 2533 ($-COCH_2--$); Szelke, M et al., European Appln. EP 45665 (1982) CA: 97: 39405 (1982) ($--CH(OH)CH_2--$); Holladay, M.W. et al., (1983) Tetrahedron Lett 24: 4401-4404 ($--C(OH)CH_2--$); e Hruby, V.J., (1982) Life Sci 31: 189-199 ($--CH_2-S--$); cada um dos quais é incorporado aqui por referência.

Em uma outra forma de realização, uma ligação não peptídeo particularmente preferida é $-CH_2NH-$. Os peptídeos miméticos podem ter vantagens significativas sobre as formas de realização dos polipeptídeos, incluindo, por exemplo: produção mais econômica, maior estabilidade química, propriedades farmacológicas melhoradas (meia-vida, absorção, potência, eficácia, etc.), especificidade alterada (por exemplo, um amplo espectro de atividades biológicas), antigenicidade reduzida, e outros.

Uma variedade de projetos de peptídeos miméticos é possível. Por exemplo, peptídeos cíclicos, em que a conformação necessária é estabilizada por não peptídeos, são especificamente contemplados, patente US 5.192.746 para Lobl, et al., patente US 5.576.423 para Aversa et al., patente US 5.051.448 para Shashoua, e patente US 5.559.103 para Gaeta et al., todas incorporadas aqui por referência, descrevem muitos métodos para criar estes compostos. A síntese de compostos não peptídeos que imitam seqüências de peptídeos também é conhecida na arte. Eldred et al., J. Med. Chem. 37: 3882 (1994), incorporado aqui por referência em sua totalidade, descrevem antagonistas não peptídeos que imitam a seqüência de peptídeos. Do mesmo modo, Ku et al., J. Med. Chem. 38: 9 (1995) (incorporado aqui por referência em sua totalidade) ainda elucidam a síntese de uma série destes compostos.

Outras modificações após a síntese podem ser implementadas.

Por exemplo, os peptídeos protetores de tecido podem ser ainda modificados quimicamente, isto é, carbamilados, acetilados, succinilados, etc., de acordo com o pedido de patente US 10/188.905, que foi publicada como
5 20030072737-A1 em 17 de abril de 2003 e descreve EPO quimicamente modificado, e de acordo com o pedido de patente US 10/612.665, depositado em 1 de julho de 2003, e pedido de patente US 09/753.132, depositado em 29 de dezembro de 2000, que são incorporados aqui por referência em sua totalidade.

10 Além disso, os peptídeos protetores de tecido podem consistir de peptídeos protetores de tecido recombinantes – muteínas. As mutações descritas podem incluir substituições, deleções, incluindo deleções internas, adições, adições dando proteínas de fusão, ou substituições conservativas de
15 resíduos de aminoácidos em e/ou adjacente à seqüência de aminoácidos, mas que resultam em uma troca “silenciosa”, e trocas de aminoácidos não conservativas e inserções e deleções maiores, como previamente descrito em PCT/US03/20964 intitulado Recombinant Tissue Protective Cytokines and Encoding Nucleic Acids Thereof for Protection, Restoration, and Enhancement of Responsive Cells, Tissues, and Organs (incorporado aqui por
20 referência em sua totalidade).

Substituições de aminoácidos tanto conservativas como não conservativas podem ser feitas em um ou mais resíduos de aminoácidos. Ambas as substituições conservativas e não conservativas podem ser feitas. Substituições conservativas são as que se realizam em uma família de
25 aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Aminoácidos geneticamente codificados podem ser divididos em quatro famílias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) não polares (hidrofóbicos) = cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano, glicina, tirosina; e (4) polares não

carregados = asparagina, glutamina, serina, treonina. Os não polares podem ser divididos em: fortemente hidrofóbicos = alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina e moderadamente hidrofóbicos = glicina, prolina, cisteína, tirosina, triptofano. Em um modo alternativo o repertório de aminoácidos pode ser agrupado como (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina, (3) alifáticos = glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, com serina e treonina opcionalmente ser agrupados separadamente como hidroxila alifática; (4) aromáticos = fenilalanina, tirosina, triptofano; (5) amida = asparagina, glutamina; e (6) contendo enxofre = cisteína e metionina. (Ver, por exemplo, Biochemistry, 4^a. Ed., Ed. por L. Stryer, WH Freeman and Co., 1995, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Além disso, mutações podem ser introduzidas aleatoriamente junto a toda ou parte da seqüência de codificação de um peptídeo protetor de tecido, como por mutagênese de saturação, e os mutantes resultantes podem ser triados para atividade biológica para identificar mutantes que retêm atividade. Após mutagênese, o peptídeo codificado pode ser recombinantemente expressado e a atividade do peptídeo protetor de tecido recombinante pode ser determinada.

Em uma outra forma de realização, o peptídeo protetor de tecido pode ser ainda modificado através de adições de polímeros (como polietileno glicol), açúcares, ou proteínas adicionais (como uma construção de fusão) em um esforço para prolongar a meia-vida do peptídeo protetor de tecido ou melhorar os efeitos do peptídeo protetor de tecido. Exemplos destas modificações são descritos em WO/04022577 A3 e WO/05025606 A1, que são incorporados aqui por referência.

5.2. TESTES PARA TESTAR PEPTÍDEOS PROTETORES DE TECIDO

5.2.1 Triagens e testes Biológicos

Os peptídeos protetores de tecido de acordo com a presente invenção podem ser testados para atividade protetora de tecido, por exemplo, proteger de células, tecidos ou órgãos. As atividades protetoras podem ser ainda testadas usando testes *in vitro* e *in vivo*. Testes *in vitro* que são
5 indicativos de atividade protetora de tecido incluem, por exemplo, testes de proliferação de células, testes de diferenciação de células, ou de detectar a presença de proteínas ou ácidos nucleicos regulados de modo positivo pelo complexo de receptor do protetor de tecido, atividade, por exemplo, neuroglobina, citoglobina ou frataxina. Neuroglobina, por exemplo, pode
10 estar envolvida na facilitação de transporte ou armazenagem de oxigênio em curto prazo. Assim, os testes de transporte ou armazenagem de oxigênio podem ser usados como um teste para identificar ou triar compostos que modulam a atividade protetora de tecido.

Neuroglobina é expressada em células e tecidos do sistema
15 nervoso central em resposta a hipoxia ou isquemia e pode prover proteção de dano (Sun et al., 2001, PNAS 98: 15306-15311; Schmid et al., 2003, J. Biol. Chem. 276: 1932-1935, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade). Citoglobina pode desempenhar um papel similar em proteção, mas é expressada em uma variedade de tecidos em níveis variados
20 (Pesce et al., 2002, EMBO 3: 1146-1151, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Em uma forma de realização da invenção, os níveis de uma proteína regulada de modo positivo em uma célula podem ser medidos antes e após contatar o peptídeo protetor de tecido em uma célula. Em certas formas de realização, a presença de uma proteína regulada de modo positivo
25 associada com atividade protetora de tecido em uma célula pode ser usada para confirmar as atividades protetoras de tecido de um peptídeo.

Nucleolina pode proteger células contra dano. Ela desempenha numerosos papéis em células incluindo modulação de processos de transcrição, proteína de ligação de RNA específica da sequência, citocinese,

nucleogênese, transdução de sinal, apoptose induzida por células T, remodelagem de cromatina, ou replicação. Ela também pode funcionar como uma helicase de DNA/RNA de receptor de superfície de célula, ATPase dependente de DNA, transporte de proteína, componente de fator de transcrição, ou repressor transcripcional (Srivastava e Pollard, 1999, FASEB J., 13: 1911-1922; e Ginisty et al., 1999, J. Cell Sci., 112: 761-772, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Frataxina é uma proteína envolvida com o metabolismo de ferro mitocondrial e mostrou anteriormente mostrada ser fortemente regulada de modo positivo por EPO tanto *in vivo* como *in vitro* (Sturm et al. (2005) Eur J Clin Invest 35: 711, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

A expressão de uma proteína regulada de modo positivo pode ser detectada detectando níveis de mRNA correspondendo à proteína em uma célula. O mRNA pode ser hibridizado em uma sonda que liga especificamente um ácido nucleico codificando a proteína regulada de modo positivo. A hibridização pode consistir de, por exemplo, Northern blot, Southern blot, hibridização de arranjo, cromatografia de afinidade, ou hibridização *in situ*.

A atividade protetora de tecido do polipeptídeo da invenção também pode ser detectada usando testes de neuroproteção *in vitro*. Por exemplo, culturas neuronais primárias de hipocampus de rato recém-nascido por tripsinização, e cultivadas como por qualquer método conhecido na arte e/ou descrito aqui, por exemplo, em meio de cultura MEM-II (Invitrogen), D-glicose 20 mM, L-glutamina 2 mM, 10% de soro Nu (bovino; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 2% de suplemento B27 (Invitrogen), NaHCO₃ 26,2 mM, 100 U/ml de penicilina, e 1 mg/ml de estreptavidina (ver, por exemplo, Leist et al., 2004, Science 305: 239-242, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Um dia após semeadura, 1 μ M de citosinoarabino-furanosídeo é adicionado. No dia 13 as culturas antigas são então pré-incubadas com doses crescentes de EPO ou CEPO (3-3000 pM)

durante 24 h. No dia 14, o meio é removido e as culturas desafiadas com 300 μ M de NMDA em PBS em temperatura ambiente. Após 5 min, o meio pré-condicionado é retornado às culturas que são então retornadas ao incubador durante 24 h. As células são fixadas em paraformaldeído, coloridas por Hoeschst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) e os núcleos apoptóticos condensados podem ser contabilizados. NGF (50 ng/ml) e MK801 (1 μ M) são incluídos como controles positivos.

Os sistemas de modelo animal podem ser usados para demonstrar a atividade protetora de tecido de um composto ou para demonstrar a segurança ou eficácia dos compostos identificados pelos métodos de triagem da invenção descritos acima. Os compostos identificados nos testes podem então ser testados para atividade biológica usando modelos animais para um tipo de dano a tecido, doença, condição, ou síndrome de interesse. Estes incluem animais engenheirados para conter o complexo de receptor do protetor de tecido copulado a um sistema de leitura funcional, como um camundongo transgênico.

Modelos animais que podem ser usados para testar a eficácia da atividade protetora de célula ou tecido de um composto identificado incluem, por exemplo, proteção contra o início de encefalomielite alérgica aguda (EAE; ver exemplo 12) em ratos Lewis, restauração ou proteção de função cognitiva diminuída em camundongos após receberem trauma cerebral, isquemia cerebral (“derrame”, exemplo 5) ou insultos estimulados por excitotoxinas (Brines et al., 2000, PNAS, 97: 10295-10672, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade), proteção de isquemia retinal induzida (Rosenbaum et al., 1997, *Vis. Res.* 37: 3443-51, incorporado aqui por referência em sua totalidade), proteção contra dano ao nervo ciático (ver exemplo 2), e proteção contra dano de isquemia-reperfusão no coração (estudos de cardiomiócito *in vitro* e dano de isquemia-reperfusão *in vivo*, ver, por exemplo, Valcillo et al., 2003, PNAS 100: 4802-4806 e Fiordaliso et al.,

2005, PNAS 102: 2046-2051, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade). Estes testes são descritos em mais detalhe em Grasso et al. (2004) Med Sci Monit 10: BR1-3 ou publicação PCT WO 02/053580, cada dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

- 5 Os métodos *in vivo* descritos aqui referem-se à administração de EPO, no entanto, as proteínas protetoras de tecido administradas em lugar de EPO foram também identificadas para demonstrar também atividade biológica similar, por exemplo, Leist et al. (2004) Science 305: 239-241, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Os peptídeos podem ser substituídos
10 para teste também. Outros testes para determinar a atividade protetora de tecido de um peptídeo são bem conhecidos dos versados na arte.

5.2.2 Testes de Ligação de Células

- Além disso, os testes de ligação de células podem ser para avaliação dos polipeptídeos da invenção. Por exemplo, o peptídeo protetor de
15 tecido de interesse pode ser ligado a um marcador biológico como um marcador fluorescente ou radiorrotulado para facilidade de detecção e testado para ligação a células BaF3 transfectadas expressando EPOR e/ou o receptor β_c . Em uma placa de 96 cavidades, oito diluições em série 1:2 do peptídeo protetor de tecido de interesse em meio de cultura (RPMI 1640, 10% de soro
20 bovino fetal, piruvato de sódio 1 mM, L-glutamina 2 mM) são depositadas em placa, de modo o volume final em cada cavidade é cerca de 100 μ l. A linhagem parental BaF3 e células BaF3 transfectadas com EPOR e/ou receptor β_c podem ser lavadas três vezes em meios de cultura (ver abaixo), as pelotas recolocadas em suspensão em meio de cultura, e as células contadas e
25 diluídas em meios de cultura para 5.000 células/ 100 μ l. 100 μ l de células diluídas são então adicionados a cada diluição de peptídeo. A placa de teste é então incubada em um incubador a 37°C durante três a quatro dias. A placa/ células são então lavadas e a placa é lida em uma leitora de placa fluorescente ou por outro método apropriado para detectar o nível de biomarcador

associado com a atividade biológica do peptídeo protetor de tecido de interesse.

Similarmente, um teste competitivo pode ser utilizado para determinar de um peptídeo protetor de tecido é protetor de tecido. No teste competitivo, um composto s protetor de tecido, como bem conhecido, incluindo, mas não limitado a, citocinas protetoras de tecido como as descritas no pedidos de patente US n^os. 10/188.905 e 10/185.841 (cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade), pode ser fixado a um biomarcador apropriado.

Em uma placa de 96 cavidades, oito diluições em série 1:2 de um composto protetor de tecido conhecido/ biomarcador em meio de cultura apropriado, e as mesmas séries de diluição do composto protetor de tecido conhecido/ biomarcador e um excesso do peptídeo protetor de tecido de interesse são depositadas. O volume final de cada diluição deve ser cerca de 100 µl. Mais uma vez, as células BaF3 são semeadas nas placas como descrito *supra* e deixadas incubar. Após uma quantidade apropriada de tempo, as células são lavadas e a placa é lida em uma leitora de placa fluorescente ou por qualquer outro método apropriado conhecido na arte para detectar o biomarcador. Se a leitura das placas e/ou cavidades contendo o composto protetor de tecido conhecido/ biomarcador e peptídeo protetor de tecido de interesse é menor do que a leitura das placas contendo somente o composto protetor de tecido/ biomarcador, então o peptídeo protetor de tecido de interesse é protetor de tecido.

5.2.3 Proliferação de citocinas e células/ Atividade de diferenciação

Muitos fatores de proteína descritos até agora, incluindo todas as citocinas conhecidas, demonstram atividade em um ou mais testes de proliferação de células dependentes de fator, e assim estes testes servem como uma confirmação conveniente de atividade de citocina. A atividade de um peptídeo protetor de tecido pode ser evidenciada por qualquer um de um

número de testes de proliferação de células dependentes de fator de rotina para linhagens de células incluindo, sem limitação, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e e CMK. Estas células são cultivadas na presença ou
5 ausência de um peptídeo protetor de tecido, e a proliferação de células é detectada, por exemplo, medindo a incorporação de timidina tritiada ou por teste colorimétrico com base na ruptura metabólica de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) Mosman, 1983, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, incorporado aqui por referência em sua totalidade).

10 **5.2.4 Outros testes**

Se um peptídeo protetor de tecido demonstra uma atividade protetora de tecido, um versado na arte pode reconhecer que pode ser benéfico verificar o resultado usando um dos testes neuroprotetores e protetores de tecido conhecidos dos versados na arte, como, mas não
15 limitados a, testes de células P-19 e PC-12. Além disso, vários modelos *in vivo* como modelos de animal relacionados a dano à medula espinhal, derrame isquêmico, dano ao nervo periférico, coração, olhos, rins, etc., podem ser úteis ainda caracterizando o peptídeo protetor de tecido. testes *in vitro* e *in vivo* apropriados são descritos nos pedidos de patente US nºs. 10/188.905 e
20 10/185.841, cada um dos quais é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

5.3 USO TERAPÊUTICO

Um dos versados na arte pode reconhecer que os peptídeos protetores de tecido da presente invenção são utilizáveis como terapêutica
25 para tratamento ou prevenção de várias doenças, distúrbios e condições. Um versado na arte também pode reconhecer que estes peptídeos podem ser usados para obter modulação de um complexo de receptor do protetor de tecido, por exemplo, complexo de citocina protetor de tecido. Ambas as técnicas *in vitro* e *in vivo* que podem ser usadas para avaliar as indicações

terapêuticas, por exemplo, dos compostos identificados pelos testes da invenção descritos acima são descritas no pedido PCT PCT/US01/49479, pedidos de patente nos 10/188.905 e 10/185.841, incorporados aqui por referência.

5 Os peptídeos protetores de tecido da invenção mencionados acima podem ser utilizáveis geralmente para a prevenção, tratamento terapêutico, ou tratamento profilático de doenças e distúrbios humanos do sistema nervoso central ou sistema nervoso periférico que têm primeiramente sintomas neurológicos ou psiquiátricos, doenças oftálmicas, doenças
10 cardiovasculares, doenças cardiopulmonares, doenças respiratórias, doenças renais, urinárias e reprodutivas, doenças dos ossos, doenças do tecido conectivo, doenças gastrintestinais e anormalidades endócrinas e metabólicas. Exemplos de uso incluem, mas não estão limitados a proteção contra e reparo de dano resultante de trauma e inflamação resultante no cérebro (derrame
15 isquêmico, trauma de cegueira, hemorragia subaracnóide), medula espinhal (isquemia, trauma de força cega), nervos periféricos (dano ao nervo ciático, neuropatia diabética, síndrome do túnel do carpo), retinal (edema macular, retinopatia diabética, glaucoma), e coração (infarto do miocárdio, falha cardíaca crônica). Em particular, estas doenças, distúrbios e condições
20 incluem condições hipóxicas, que afetam adversamente os tecidos responsivos, como os tecidos excitáveis no tecido do sistema nervoso central, tecido do sistema nervoso periférico, ou tecido cardíaco ou tecido retinal, como, por exemplo, cérebro, coração ou retina/olho. Assim, os peptídeos protetores de tecido da invenção podem ser usados para tratar ou prevenir
25 dano a tecido responsivo resultante de condições hipóxicas em uma variedade de condições e circunstâncias. Exemplos não limitativos destas condições e circunstâncias são providos na tabela abaixo.

Os polipeptídeos protetores de tecido também são de interesse na modulação da atividade de células-tronco. Foi estabelecido que citocinas

demonstrando atividade protetora de tecido, por exemplo, EPO, são capazes de mobilizar células-tronco, estimulando a migração em regiões de dano e ajudando o processo de reparo, por exemplo, em um papel regenerativo. Por exemplo, no derrame experimental, EPO media a migração de neuroblastos em uma região de dano isquêmico para regenerar neurônios durante o período de recuperação (Tsai et al., J. Neurosci (2006) 26: 1269-74, incorporado aqui por referência em sua totalidade). Como um outro exemplo, EPO e CEPO mobilizam células progenitoras endoteliais da medula óssea na circulação. Estas células então retornam para regiões distantes e são envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos (para efeito de EPO, ver Bahlmann et al., 2003, Kidney Int. 64: 1648-1652, incorporado por referência aqui em sua totalidade). Apesar de não desejar ficar limitado a qualquer teoria particular, acredita-se que os polipeptídeos isolados descritos aqui têm um efeito similar sobre a migração de células-tronco.

No exemplo de proteção de tecido neuronal, patologias tratáveis e que podem ser prevenidas usando peptídeos protetores de tecido da invenção, estas patologias incluem as que resultam de oxigenação reduzida de tecidos neuronais. Qualquer condição que reduz a disponibilidade de oxigênio em tecido neuronal, resultando em tensão, dano, e, finalmente, morte de células neuronais, pode ser tratada usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção. Geralmente referidas como hipoxia e/ou isquemia, estas condições aparecem ou incluem, mas não estão limitadas a, derrame, oclusão vascular, privação de oxigênio no pré-natal ou pós-natal, sufocação, engasgos, quase afogamento, envenenamento com monóxido de carbono, inalação de fumaça, trauma, incluindo cirurgia e radioterapia, asfixia, epilepsia, hipoglicemia, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, síndrome da aflição respiratória em adultos, choque hipotensivo, choque séptico, choque anafilático, choque de insulina, crise de células falciformes, parada cardíaca, disritmia, narcose de nitrogênio e déficits neurológicos causados por

procedimentos de desvio coração-pulmão.

Em uma forma de realização, por exemplo, exemplo, os peptídeos protetores de tecido da presente invenção, identificados usando o teste da invenção, podem ser administrados sozinhos ou como parte de uma
5 composição para prevenir dano ou dano ao tecido resultante de risco de dano ou dano ao tecido antes, durante ou após um procedimento cirúrgico ou um procedimento médico. Por exemplo, os procedimentos cirúrgicos podem incluir ressecção de tumor ou reparo de aneurisma e os procedimentos médicos podem incluir resistência ou liberação. Outras patologias causadas ou
10 resultantes de hipoglicemia que são tratáveis usando peptídeos protetores de tecido da presente invenção incluem superdose de insulina, também referida como hiperinsulinomia iatrogênica, insulinoma, deficiência de hormônio de crescimento, hipocortisolismo, superdose de fármacos, e certos tumores.

Outras patologias resultantes de dano ao tecido neuronal
15 excitável incluem distúrbios provocados por insultos, como epilepsia, convulsões, ou distúrbios de insultos crônicos. Outras condições e doenças tratáveis incluem, mas não estão limitadas a doenças como derrame, esclerose múltipla, hipotensão, parada cardíaca, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, paralisia cerebral, trauma cerebral ou da medula espinhal, demência por
20 AIDS, perda relacionada à idade da função cognitiva, perda de memória, esclerose lateral, distúrbios provocados por insultos, alcoolismo, isquemia retinal, dano ao nervo ótico resultante de glaucoma, e perda neuronal.

Os peptídeos protetores de tecido específicos da presente invenção podem ser usados para tratar ou prevenir inflamação resultante de
25 condições de doença ou vários traumas, como inflamação fisicamente ou quimicamente induzida. Os peptídeos protetores de tecido também são contemplados para o tratamento e prevenção de condições inflamatórias em um ou mais órgãos ou tecidos incluindo, mas não limitados ao cérebro, medula espinhal, tecido conectivo, coração, pulmão, rim e trato urinário,

pâncreas, olhos e próstata. Exemplos não limitativos deste trauma incluem tendinite, angite, bronquite crônica, pancreatite, osteomielite, artrite reumatóide, glomerulonefrite, neurite ótica, arterite temporal, encefalite, meningite, mielite transversa, dermatomiosite, polimiosite, fascilite
5 necrosante, hepatite, e enterocolite necrosante. Além disso, as citocinas protetoras de tecido podem ser usadas para tratar ou prevenir inflamação resultante de condições isquêmicas e não isquêmicas incluindo, mas não limitadas a alergias, doenças reumáticas, danos relacionados a esporte, infecções incluindo virais, fúngicas, e bacterianas. A inflamação pode ser
10 aguda ou crônica. Outras aplicações no campo da inflamação estão indicadas em PCT/US2004/031789 depositado em 29 de setembro de 2004 e publicado como WO 2005/032467, incorporados aqui por referência em sua totalidade.

Os peptídeos protetores de tecido específicos da presente invenção podem ser usados para tratar doenças dos sistemas periférico e
15 nervoso central resultantes de desmielinação ou invólucro de mielina. Estas doenças são definidas como principalmente envolvendo lesões do invólucro de mielina inflamatórias de origem desconhecida, com a exceção de doenças de deficiência de mielinação, como leucodistrofia, e doenças devido causas óbvias. Esclerose múltipla (MS) é uma doença típica entre doenças
20 desmielinantes, e, patologicamente, é caracterizada por trocas, principalmente, desmielinação inflamatória, e gliose. Uma vez que sua etiologia é desconhecida, seu diagnóstico é feito com base em seus aspectos clínicos, isto é, multiplicidade espacial e multiplicidade com o passar do tempo de lesões do sistema nervoso central. Além disso, encefalomielite
25 disseminada aguda (ADEM), esclerose difusa inflamatória, encefalomielite hemorrágica necrosante subaguda, e mielite transversa estão incluídas em doenças desmielinantes. Também, tecidos nervosos periféricos incluindo células de Schwann para manter o invólucro de mielina, caso estas células sejam prejudicadas, a doença desmielinante periférica é causada.

Os peptídeos protetores de tecido da presente invenção podem ser usados para tratar ou prevenir condições de, e dano ao coração incluindo qualquer evento patológico crônico ou agudo envolvendo o coração e/ou tecido associado (por exemplo, o pericárdio, aorta e outros vasos sanguíneos associados), incluindo dano de isquemia-reperfusão; falha cardíaca congestiva; parada cardíaca; infarto do miocárdio; aterosclerose, ligação da válvula mitral, palpitação atrial, cardiotoxicidade causada por compostos como fármacos (por exemplo, doxorubicina, herceptina, tiorizadina e cisaprida); dano cardíaco devido a infecção parasítica (bactérias, fungos, rickettsia, e vírus, por exemplo, sífilis, infecção por Trypanosoma crônica); amiloidose cardíaca fulminante; cirurgia cardíaca; transplante de coração; angioplastia; cirurgia laparoscópica, dano cardíaco traumático (por exemplo, dano cardíaco penetrante ou agudo, e ruptura da válvula aórtica), reparo cirúrgico de um aneurisma aórtico torácico; um aneurisma aórtico da suprarenal; choque cardiogênico devido a infarto do miocárdio ou falha cardíaca; choque neurogênico e anafilaxia. Os peptídeos protetores de tecido da presente invenção podem ser usados também para tratar os indivíduos em risco de doença cardíaca como falha cardíaca (isto é, quando o coração não é capaz de bombear sangue em uma taxa requerida pelos tecidos metabolizantes, ou quando o coração pode fazer isso somente com uma elevada pressão). Estes pacientes em risco podem incluir pacientes tendo ou estando em risco de ter infarto cardíaco, doença da artéria coronária, miocardite, quimioterapia, cardiomiopatia, hipertensão, doenças cardíacas valvulares (mais frequentemente insuficiência mitral e estenose aórtica) e cardiomiopatia induzida por toxinas (por exemplo, etanol, cocaína, etc.) e outros.

Os peptídeos protetores de tecido da presente invenção podem ser usados para tratar ou prevenir condições de dano aos olhos. Por exemplo, vazamento do tecido retinal. Estes distúrbios incluem, mas não estão

limitados a isquemia retinal, degeneração macular, descolamento retinal, retinite pigmentosa, retinopatia arteriosclerótica, retinopatia hipertensiva, bloqueio de artéria retinal, bloqueio de veia retinal, hipotensão e retinopatia diabética.

5 Em outra forma de realização, os peptídeos protetores de tecido da presente invenção e princípios da invenção podem ser usados para prevenir ou tratar dano resultante de dano por radiação em tecido responsivo. Uma outra utilidade dos peptídeos protetores de tecido da presente invenção está no tratamento de envenenamento, como envenenamento com neurotoxina
10 (por exemplo, envenenamento com mariscos com ácido domóico), toxinas (etanol, cocaína, etc.), como o resultado de agentes quimioterapêuticos de exposição a radiação, neurolatirismo; doença de Guam; esclerose lateral amiotrófica; e mal de Parkinson.

 Como mencionado acima, a presente invenção refere-se
15 também a peptídeos protetores de tecido da presente invenção para uso na função de tecidos melhorada em células, tecidos e órgãos responsivos em um mamífero por administração periférica de uma citocina protetora de tecido como descrito acima. Várias doenças e condições são receptivas a tratamento usando este método. Por exemplo, este método é utilizável para melhorar a
20 função em tecidos excitáveis resultando em um aumento na função cognitiva mesmo na ausência de qualquer condição ou doença. Além disso, as citocinas protetoras de tecido são utilizáveis para melhorar a qualidade de cicatrização de ferimentos, reduzindo o tempo requerido para cicatrizar, melhorando a qualidade dos tecidos cicatrizados e reduzindo a incidência de adesões
25 resultantes do ferimento. Ver PCT/US2004/031789 depositado em 29 de setembro de 2004 e publicado como WO 2005/032467, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Estes usos da presente invenção são descritos em mais detalhe abaixo e incluem melhoria de aprendizagem e treinamento em ambos os mamíferos humanos e não humanos.

As condições e doenças tratáveis ou evitáveis usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção referem-se ao sistema nervoso central incluem mas não estão limitadas aos distúrbios do humor, distúrbios de ansiedade, depressão, mutismo, déficit de atenção, distúrbio de hiperatividade, e disfunção cognitiva. Estas condições podem se beneficiar da melhora da função neuronal. Outros distúrbios tratáveis de acordo com os ensinamentos da presente invenção incluem interrupção do sono, por exemplo, apnéia do sono e distúrbios relacionados a viagens, sangramentos subaracnóides e aneurismal, choque hipotensivo, dano concussivo, choque séptico, choque anafilático e seqüelas de várias encefalites e meningites, por exemplo, cerebrites relacionadas a doenças do tecido conectivo como lupus. Outros usos incluem prevenção de ou proteção de envenenamento por neurotoxinas, como envenenamento com mariscos com ácido domóico, neurolatirismo, e doença de Guam, esclerose amiotrófica, mal de Parkinson; tratamento pós-operatório para dano embólico ou isquêmico; irradiação do cérebro total; crise de células falciformes; e eclampsia.

Um outro grupo de condições tratáveis ou evitáveis usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção inclui disfunção mitocondrial, tanto hereditária como adquirida naturalmente, que é a causa de uma variedade de doenças neurológicas tipificadas por dano ou morte neuronal. Por exemplo, a doença de Leigh (encefalopatia necrosante aguda) é caracterizada pela perda visual progressiva e encefalopatia, devido a diminuição neuronal, e miopatia. Nestes casos, o metabolismo mitocondrial defeituoso falha no fornecimento suficiente de substratos de alta energia para abastecer o metabolismo de células excitáveis. Um peptídeo protetor de tecido otimiza a função deficiente em uma variedade de doenças mitocondriais. Como mencionado acima, as condições hipóxicas afetam adversamente os tecidos excitáveis. Os tecidos excitáveis incluem, mas não estão limitados a, tecido do sistema nervoso central, tecido do sistema nervoso periférico e

tecido do coração. Além das condições descritas acima, os peptídeos protetores de tecido da presente invenção são utilizáveis no tratamento de envenenamento por inalação como monóxido de carbono e inalação de fumaça, asma severa, síndrome da aflição respiratória, e engasgos e quase afogamento. Outras condições que criam condições hipóxicas ou por outros meios induzem o tecido responsivo, como dano ao tecido excitável incluem hipoglicemia que pode ocorrer na dosagem inadequada de insulina, ou com neoplasmas produzindo insulina (insulinoma).

Vários distúrbios neuropsicológicos que são descritos originar-se de dano ao tecido excitável são tratáveis usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção. Distúrbios crônicos em que dano neuronal está envolvido e para os quais tratamento ou prevenção pela presente invenção é provido incluem distúrbios relacionados ao sistema nervoso central e/ou sistema nervoso periférico incluindo perda da função cognitiva relacionada à idade e demência senil, distúrbios de ataques crônicos, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, demência, perda de memória, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, esclerose tuberosa, doença de Wilson, paralisia supranuclear progressiva, doença de Guam, demência do corpo de Mewy, doenças de prion, como encefalopatites espongiformes, por exemplo, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Huntington, distrofia miotônica, ataxia de Freidrich e outras ataxias, bem como síndrome de Gilles de la Tourette, distúrbios de ataques, como epilepsia e distúrbio de ataques crônicos, derrame, trauma cerebral ou da medula espinhal, demência de AIDS, alcoolismo, autismo, isquemia retinal, glaucoma, distúrbios da função autonômica como hipertensão e distúrbios do sono, e distúrbios neuropsiquiátricos que incluem, mas não estão limitados a esquizofrenia, distúrbio esquizo-afetivo, distúrbio do déficit da atenção, distúrbio distímico, distúrbio depressivo principal, manias, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbios do uso de substâncias psicoativas, ansiedade, distúrbio do pânico,

bem como distúrbios afetivos unipolares e bipolares. Outros distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos incluem, por exemplo, os listados em American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM), a versão mais atual do qual é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Um outro grupo de condições tratáveis ou evitáveis usando os peptídeos protetores de tecido da presente invenção inclui doenças dos rins como falha renal, aguda e crônica. O fornecimento de sangue aos rins pode ser cortado devido a várias causas incluindo choque por infecções invadindo a corrente sanguínea (septicemia), hemorragia interna ou externa, perda de fluido do corpo como um resultado de diarreia severa ou queimaduras, reações a transfusões, parada cardíaca ou arritmias, trauma cirúrgico e transplantes de rim. O fluxo reduzido de sangue aos rins resultante das condições acima pode reduzir o fluxo de sangue a níveis perigosamente baixos durante um período grande o suficiente para causar o desenvolvimento de falha renal aguda. O fluxo sanguíneo deprimido também resulta em necrose, ou morte de tecido, no rim, danificando as células tubulares renais. A falha renal também pode ser o resultado de doenças, síndromes nefróticas (intersticiais ou diabéticas), infecções, dano (induzido por CPB), toxinas (induzidas por contraste, induzidas por quimioterapia, ciclosporina), inflamação autoimune (por exemplo, lúpus, eritrose, etc.). Os peptídeos protetores de tecido da presente invenção auxiliam no reparo ou prevenção deste dano ajudando a melhorar a falha renal aguda.

A seguinte tabela relaciona outras indicações exemplares, não limitativas, como as várias condições e doenças receptivas a tratamento pelos peptídeos protetores de tecido mencionados acima.

<i>Célula, tecido ou órgão</i>	<i>Disfunção ou patologia</i>	<i>Condição ou doença</i>	<i>Tipo</i>
Coração	Isquemia	Doença da artéria coronária	Agudo, crônico, estável, instável
		Infarto do miocárdio	Síndrome de Dressler
		Angina	

		Doença cardíaca congênita	Cardiomiopatia valvular
		Angina de Prinzmetal	
		Ruptura cardíaca	Perfuração do septo aneurismático
		Angiite	
	Arritmia	Taqui-, bradiarritmia <i>supraventricular</i> , Anormalidades da condução ventricular	Nódulo do sino hipersensível da carótida estável, instável
	Falha cardíaca congestiva	Esquerda, direita, bi-ventricular, sistólico, diastólico	Cardiomiopatias, como idiopática familiar, infectiva, metabólica, doença de armazenamento, deficiências, distúrbio do tecido conectivo, infiltração e granulomas, neurovascular
		Miocardite	Autoimune, infectiva, idiopática
		Cor pulmonale	
	Dano por irradiação		
	Trauma de cegueira e penetrante		
	Toxinas	Toxicidade com cocaína, adriamicina	
Vascular	Hipertensão	Primária, secundária	
	Enfermidade de descompressão		
	Hiperplasia fibromuscular		
	Aneurisma	Dissecação, rompido, aumentando	
Pulmões	Obstrutiva	Asma Bronquite crônica, Enfisema e obstrução aérea	
	Doença pulmonar isquêmica	Embolismo pulmonar, trombose pulmonar, embolismo adiposo	
	Doenças pulmonares ambientais		
	Doença pulmonar isquêmica	Embolismo pulmonar Trombose pulmonar	
	Doença pulmonar intersticial	Fibrose pulmonar idiopática	
	Congênita	Fibrose cística	
	Cor pulmonale		
	Trauma		
	Pneumonia e pneumonitides	Infecciosa, parasítica, tóxica, traumática, queimadura,	

		aspiração	
	Sarcoidose		
Pâncreas	Endócrina	Diabetes melito, tipos I e II	Falha de célula beta, disfunção Neuropatia diabética
		Outra falha de células endócrinas do pâncreas	
	Exócrina	Falha do pâncreas exócrina	Pancreatite
Osso	Osteopenia	Primária	Imobilização do hipogonadismo na pós-menopausa relacionada à idade Hiperparatiroidismo Hipertiroidismo Deficiência de cálcio, magnésio, fósforo e/ou vitamina D
		Secundária	
	Osteomielite		
	Necrose avascular		
	Trauma		
	Doença de Paget		
Pele	Alopecia	Localizada Generalizada	Primária secundária
	Vitiligo	Decubites diabética	Chagas devido a compressão, úlceras de compressão, chagas de camada
	Ulceração		
	Doença vascular periférica		
	Feridas cirúrgicas, lacerações,		
	Danos por queimadura		
Distúrbios autoimunes	Lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, artrite reumatóide, glomerulonefrite, angiite		
	Histiocitose de Langerhan		
Olho	Neurite ótica		
	Danos por cegueira e a, infecções, sarcóide, doença de células falciformes, descolamento retinal, arterite temporal		
	Isquemia retinal, degeneração macular, retinite pigmentosa, retinopatia arteriosclerótica,		

	retinopatia hipotensiva, bloqueio de artéria retinal, bloqueio de veia retinal, hipotensão, retinopatia diabética, glaucoma e edema macular		
Distúrbios embrionários e fetais	Asfixia		
	Isquemia		
CNS	Síndrome da fadiga crônica, síndromes hipoosmolar e hiperosmolar agudas e crônicas, demência por AIDS, eletrocussão		
	Malária cerebral		
	Encefalite	Raiva, Herpes	
	Meningite		
	Hematoma subdural		
	Vício de nicotina		
	Abuso e retirada de droga	Cocaína, heroína, crack, maconha, LSD, PCP, abuso de poli-drogas, hipnóticos sedativos, anfetaminas, cafeína	
	Distúrbios compulsivos-obsessivos		
	Estenose espinhal, mielite transversa, Guillian Barre, Trauma, compressão de raiz nervosa, compressão tumoral, derrame cardíaco		
ENT	Síndrome de Tinnitus Meuniere, perda da audição		
	Dano traumático, barotraumas		
Rim	Falha renal	Aguda, crônica	Doença vascular/isquêmica, intersticial, doença renal diabética, síndromes nefróticas, infecções, dano, induzida por contraste, induzida por quimioterapia, ciclosporina, induzida por CPB, ou preventiva
	Dano por radiação		
	Púrpura de Henoch		

	Schonlein		
Músculo estriado	Distúrbios autoimunes	Miastenia gravis Dermatomiosite Polimiosite	
	Miopatias	Metabólica, endócrina e tóxica hereditária	
	Derrame cardíaco		
	Dano por esmagamento		
	Rabdomiolise		
	Doença mitocondrial		
	Infeção	Fascite necrosante	
Disfunção sexual	Central e periférica (por exemplo, disfunção erétil)	Impotência secundária em medicação, (diabetes)	
Fígado	Hepatite	Vira, bacteriana, parasítica	
	Doença isquêmica		
	Cirrose, fígado adiposo		
	Doenças infiltrantes/metabólicas		
Gastrintestinal	Doença intestinal isquêmica		
	Enterocolite necrosante		
Transplante de órgãos	Tratamento do doador e recipiente		
Reprodutiva	Infertilidade	Vascular Autoimune Anormalidades uterinas Distúrbios de implante	
Endócrina	Hiper- e hipofunção glandular		
Geral	Choque	Séptico, hemodinâmico	
	Parasitemia	Malária, tripanosomiase, leishmaniose	

Como mencionado acima, estas doenças, distúrbios ou condições são meramente ilustrativas da faixa de benefícios provida pelos peptídeos protetores de tecido da presente invenção. Conseqüentemente, esta invenção geralmente provê tratamento preventivo, terapêutico ou profilático das conseqüências de trauma mecânico ou de doenças humanas. O tratamento

5 preventivo ou terapêutico ou profilático para doenças, distúrbios ou condições

do CNS e/ou sistema nervoso periférico é contemplado. O tratamento preventivo ou terapêutico ou profilático para doenças, distúrbios ou condições que têm um componente psiquiátrico é provido. O tratamento preventivo, terapêutico ou profilático para doenças, distúrbios ou condições incluindo, 5 mas não limitados aos tendo um componente oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratório, renal, urinário, reprodutivo, gastrointestinal, endócrino ou metabólico é provido.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreendendo o peptídeo protetor de tecido pode ser administrada 10 sistemicamente para proteger ou melhorar as células, tecido ou órgão alvo. A administração pode ser parenteralmente, via inalação, ou transmucosalmente, por exemplo, oralmente, nasalmente, intravaginalmente, sublingualmente, ocularmente, submucosamente ou transdermicamente. Preferivelmente, a administração é parenteral, por exemplo, via injeção intravenosa ou 15 intraperitoneal e também incluindo, mas não limitada a, administração intraarterial, intramuscularmente, intradermicamente e subcutaneamente,

Para outras vias de administração, como pelo uso de um perfundido, injeção em um órgão, ou outra administração local, uma composição farmacêutica será provida, a qual resulta em níveis similares de 20 um peptídeo protetor de tecido como descrito acima. Um nível de cerca de 15 pM-30 nM é preferido.

As composições farmacêuticas da invenção podem compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização específica, 25 o termo “farmaceuticamente aceitável” significa aprovado por uma agência regulatória do governo federal ou estadual ou listado na farmacopéia US ou outra farmacopéia estrangeira geralmente reconhecida para uso em animais e, mais particularmente, em humanos. O termo “veículo” refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o terapêutico é

administrado. Os veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, como soluções salinas em água e óleos, incluindo as de origem em petróleo, animal, vegetal ou sintéticos, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral e outros. Uma solução salina é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. Soluções salinas e dextrose aquosa e soluções de glicerol também podem ser empregadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos apropriados incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado secado, glicerol, propileno glicol, água, etanol e outros. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificantes, ou agentes de tamponamento de pH. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação sustentada e outros. A composição pode ser formulada como um supositório, com aglutinantes tradicionais e veículos como triglicerídeos. Os compostos da invenção podem ser formulados como formas neutras ou sais. Sais particularmente aceitáveis incluem os formados com grupos amino livres como os derivados de ácidos hidrolórico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., e os formados com grupos carboxila livres como os derivados de sódio, potássio, amônio, cálcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. Exemplos de veículos farmacêuticos apropriados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, incorporado aqui por referência em sua totalidade. As composições conterão uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto, preferivelmente na forma purificada, junto com uma quantidade apropriada de veículo de modo a prover a forma para administração apropriada ao paciente. A formulação deve adequar o modo de administração.

Formulações para aumentar a adsorção transmucosal de

peptídeos como peptídeo protetor de tecido de ação de redução da pressão intraocular prolongada também são contempladas pela presente invenção. Composições farmacêuticas adaptadas para administração oral podem ser providas como cápsulas ou comprimidos, como pós ou grânulos, como 5 soluções, xaropes ou suspensões (em líquidos aquosos ou não aquosos); como cremes batidos ou espumas comestíveis; ou como emulsões. Comprimidos ou cápsulas de gelatina duras podem compreender lactose, amido ou derivados dos mesmos, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio, ácido esteárico ou sais dos mesmos. As cápsulas de gelatina moles 10 podem compreender óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semi-sólidos ou sólidos, etc. As soluções e xaropes podem compreender água, polióis e açúcares.

Um agente ativo pretendido para administração oral pode ser revestido com ou misturado com um material que retarda a desintegração e/ou 15 absorção do agente ativo no trato gastrointestinal (por exemplo, monoestearato de glicerol ou diestearato de glicerila pode ser usado). Assim, a liberação sustentada de um agente ativo pode ser obtida durante muitas horas e, se necessário, o agente ativo pode ser protegido de ser degradado dentro do estômago. As composições farmacêuticas para administração oral podem ser 20 formuladas para facilitar a liberação de um agente ativo em um local gastrointestinal particular devido a condições de pH ou enzimáticas.

As composições farmacêuticas adaptadas para administração transdérmica podem ser providas como curativos discretos que se destinam a permanecer em contato íntimo com a epiderme do paciente durante um 25 período prolongado de tempo. As composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica podem ser providas como ungüentos, cremes, suspensões, loções, opôs, soluções, pastas, géis, pulverizações, aerossóis ou óleos. Para administração tópica à pele, boca, olho ou outros tecidos externos, um ungüento ou creme tópico é preferivelmente usado. Quando formulado em

um unguento, o ingrediente ativo pode ser empregado com uma base de unguento tanto parafínico como miscível em água. Alternativamente, o ingrediente ativo pode ser formulado em um creme com uma base óleo-em-água ou uma base água-em-óleo. AS composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica ao olho incluem colírios. Nestas composições, o ingrediente ativo pode ser dissolvido ou colocado em suspensão em um veículo apropriado, por exemplo, em um solvente aquoso. As composições farmacêuticas adaptadas para administração tópica na boca incluem losangos, pastilhas ou colutórios.

10 As composições farmacêuticas adaptadas para administração nasal e pulmonar podem compreender veículos sólidos como pós (preferivelmente tendo um tamanho de partícula na faixa de 20 a 500 microns). Os pós podem ser administrados no modo em que a aspiração é tomada, isto é, por inalação rápida através do nariz a partir de um recipiente de pó mantido junto ao nariz. Alternativamente, as composições adotadas para administração nasal podem compreender veículos líquidos, por exemplo, pulverizações nasais ou gotas nasais. Além disso, a inalação dos compostos diretamente nos pulmões pode ser realizada por inalação profundamente ou instilação através de um bocal na orofaringe. Estas composições podem compreender soluções aquosas ou oleosas do ingrediente ativo. As composições para administração por inalação podem ser fornecidas em dispositivos especialmente adaptados incluindo, mas não limitados a aerossóis pressurizados, nebulizadores ou insufladores, que podem ser construídos de modo a prover dosagens predeterminadas do ingrediente ativo. Em uma forma de realização preferida, as composições farmacêuticas da invenção são administradas na cavidade nasal diretamente ou nos pulmões via a cavidade nasal ou orofaringe.

As composições farmacêuticas adaptadas para administração retal podem ser providas como supositórios ou enemas. As composições

farmacêuticas adaptadas para administração vaginal podem ser providas como curativos, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização.

5 As composições farmacêuticas adaptadas para administração parenteral incluem soluções ou suspensões injetáveis estéreis, aquosas e não aquosas, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos que tornam as composições substancialmente isotônicas com o sangue de um recipiente. Outros componentes que podem estar presentes nestas composições incluem água, álcoois, polióis, glicerina e óleos vegetais, por exemplo. As composições adaptadas para administração parenteral podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou múltiplas doses, por exemplo, 10 ampolas e frascos vedados, e podem ser armazenadas em uma condição secada por congelamento (liofilizada) requerendo somente a adição de um veículo líquido estéril, por exemplo, solução salina estéril para injeções, imediatamente antes de usar. Soluções e suspensões de injeção extemporâneas 15 podem ser preparadas de pós estéreis, grânulos e comprimidos. Em uma forma de realização, um autoinjeter compreendendo uma solução injetável de um peptídeo protetor de tecido pode ser provido para uso emergencial por ambulâncias, salas de emergência e situações de campos de batalha, e até para auto-administração em um cenário doméstico, particularmente quando a possibilidade de amputação traumática pode ocorrer, como por uso imprudente de um cortador de grama. A possibilidade de que células e tecidos em um pé ou dedos do pé amputados irão sobreviver após sua nova união pode ser aumentada por administração de um peptídeo protetor de tecido nos 20 múltiplos sítios da parte amputada tão logo seja praticável, mesmo antes da chegada do pessoal médico ao local, ou chegada do indivíduo afetado com o dedo amputado em um pano à sala de emergência.

Em uma forma de realização preferida, a composição é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição

farmacêutica adaptada para administração intravenosa a seres humanos. Tipicamente, as composições para administração intravenosa são soluções em tampão aquoso isotônico estéril. Quando necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizante e um anestésico local como lidocaína para amenizar a dor no sítio da injeção. Em geral, os ingredientes são fornecidos tanto separadamente como misturados juntos na forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado isento de água em um recipiente hermeticamente vedado como uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Quando a composição deve ser administrada por infusão, ela pode ser dispensada com um frasco de infusão contendo água ou solução salina do tipo farmacêutico. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de solução salina estéril pode ser provida de modo que os ingredientes podem ser misturados antes da administração.

Os supositórios contêm geralmente ingrediente ativo na faixa de 0,5% a 10% em peso; as formulações orais contêm, preferivelmente, 10% a 95% de ingrediente ativo.

Uma composição de perfundido pode ser provida para uso em banhos de órgãos transplantados, para perfusão *in situ*, ou para administração à vasculatura de um doador de órgão antes da coleta do órgão. Estas composições farmacêuticas podem compreender níveis de peptídeos protetores de tecido, ou uma forma de peptídeos protetores de tecido não apropriados para administração aguda ou crônica, local ou sistêmica em um indivíduo, mas servirão para as funções pretendidas aqui em um cadáver, banho de órgão, perfundido do órgão, ou perfundido *in situ* antes de remover ou reduzir os níveis de peptídeo protetor de tecido contidos nas mesmas antes de expor ou retornar o órgão ou tecido tratado a circulação regular.

A invenção também provê um pacote ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes carregados com um ou mais dos

ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente associado com o(s) recipiente(s) pode estar um aviso na forma prescrita por uma agência governamental regulando a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência da
5 fabricação, uso ou venda para administração a humanos.

Em uma outra forma de realização, por exemplo, um peptídeo protetor de tecido pode ser liberado em um sistema de liberação controlada. Por exemplo, o peptídeo pode ser administrado usando infusão intravenosa, uma bomba osmótica implantável, um curativo transdérmico, lipossomas, ou
10 outros modos de administração. Em uma forma de realização, uma bomba pode ser usada (ver Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574, cada um dos quais incorporado por referência aqui em sua totalidade). Em uma outra forma de realização, o composto pode ser
15 liberado em uma vesícula, em particular um lipossoma (ver Langer, *Science* 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., em *Liposomes in the Therapy of Infections Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); WO 91/04014; patente US 4.704.355; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; ver geralmente *ibid.*). Em uma outra forma de
20 realização, materiais poliméricos podem ser usados (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Flórida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen e Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger e Peppas. J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61, 1953; ver também
25 Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105, (cada um dos quais incorporado por referência aqui em sua totalidade).

Em ainda uma outra forma de realização, um sistema de liberação controlada pode ser colocado em proximidade do alvo terapêutico,

isto é, as células, tecido ou órgão de alvo, requerendo, assim, somente uma fração da dose sistêmica (ver, por exemplo, Goodson, pp. 115-138 em Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, *supra*, 1984, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade). Outros sistemas de
5 liberação controlada são discutidos no estudo por Langer (1990, Science 249: 1527-1533, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade).

Em uma outra forma de realização, o peptídeo protetor de tecido, como apropriadamente formulado, pode ser administrado por administração nasal, oral, retal, vaginal, ocular, transdérmica, parenteral ou
10 sublingual.

Em uma forma de realização específica, pode ser desejável administrar um peptídeo protetor de tecido da invenção localmente à área em necessidade de tratamento; isto pode ser obtido por, por exemplo, e não para fins de limitação, infusão local durante cirurgia, aplicação tópica, por
15 exemplo, em conjunto com uma bandagem de ferimento após cirurgia, por injeção, por meio de um cateter, por meio de um supositório, ou por meio de um plante, referido implante sendo um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas, como membranas silásticas, ou fibras. Um exemplo não limitativo desta forma de realização pode ser um *stent*
20 coronariano revestido com um peptídeo protetor de tecido da presente invenção.

A seleção da dose efetiva preferida será prontamente determinável por um versado na arte baseada na consideração de vários fatores, que serão conhecidos de um versado na arte. Estes fatores incluem a
25 forma particular do peptídeo protetor de tecido, e seus parâmetros farmacocinéticos como biodisponibilidade, metabolismo, meia-vida, etc., que deverão ser estabelecidos durante os procedimentos de desenvolvimento usuais empregados tipicamente na obtenção da aprovação regulatória para um composto farmacêutico. Outros fatores em consideração à dose incluem a

condição ou doença a ser tratada ou o benefício a ser obtido em um indivíduo normal, a massa corporal do paciente, a via de administração, se a administração é aguda ou crônica, medicações concomitantes e outros fatores bem conhecidos que afetam a eficácia dos agentes farmacêuticos administrados. Assim, a dosagem exata deve ser decidida de acordo com o critério do clínico e das circunstâncias de cada paciente, por exemplo, dependendo da condição e do estado imune do paciente individual, e de acordo com técnicas clínicas padrão.

Em um outro aspecto da presente invenção, uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção pode incluir um peptídeo protetor de tecido em uma formulação com pelo menos uma molécula pequena que demonstra funcionalidade protetora de tecido. Moléculas pequenas apropriadas incluem, mas não estão limitadas a, esteróides (por exemplo, lazaróides e glucocorticóides), antioxidantes (por exemplo, co-enzima Q₁₀, ácido alfa lipóico, e NADH), enzimas anticatabólicas (por exemplo, glutathione peroxidase, superóxido dimutase, catalase, removedores catalíticos sintéticos, bem como miméticas), derivados de indol (pec indoleaminas, carbazóis e carbolinas), agentes neutralizantes de ácido nítrico, adenosina / agonistas de adenosina, fitoquímicos (flavanóides), extratos de ervas (ginkgo biloba e turmeric), vitaminas (vitaminas A, E e C), inibidores receptores de elétron oxidase (por exemplo, inibidores de elétron oxidase xantina), minerais (por exemplo, cobre, zinco e magnésio), fármacos antiinflamatórios esteroidais (por exemplo, aspirina, naproxen e ibuprofen), e combinações dos mesmos. Além disso, agentes incluindo, mas não limitados a, agentes antiinflamatórios (por exemplo, corticoesteróides, prednisona e hidrocortisona), glucocorticóides, esteróides, fármacos antiinflamatórios não esteroidais (por exemplo, aspirina, ibuprofen, diclofenac e inibidores de COX-2), agonistas beta, agentes anticolinérgicos e metil xantinas), agentes imunomodulatórios (por exemplo, moléculas orgânicas pequenas,

moduladores do receptor de células T, moduladores do receptor de citocina, agentes de depleção de células T, antagonistas de citocina, antagonistas de monocina, inibidores de linfócitos, ou agentes anticâncer), injeções de ouro, sulfasalazina, penicilamina, agentes antiangiogênicos (por exemplo, angiostatina), antagonistas de TNF- α (por exemplo, anticorpos anti-TNF α), e endostatina), dapsona, psoralens (por exemplo, metoxaleno e trioxsaleno), agentes antimalária (por exemplo, hidrocloroquina), agentes antivirais, e antibióticos (por exemplo, eritromicina e penicilina) podem ser usados em conjunto com as presentes composições farmacêuticas.

Em um outro aspecto da invenção, um perfundido ou solução de perfusão é provido para perfusão e armazenagem de órgãos para transplante, a solução de perfusão inclui uma quantidade de um peptídeo protetor de tecido efetivo para proteger células responsivas e células, tecidos ou órgãos associados. O transplante inclui mas não está limitado a alotransplante, em que um órgão (incluindo células, tecido ou outra parte do corpo) é coletado de um doador e transplantado em um recipiente diferente, ambos sendo da mesma espécie; autotransplante, em que o órgão é tomado de uma parte de um corpo e substituído por outro, incluindo procedimentos cirúrgicos de bancada, em que um órgão pode ser removido, e enquanto *ex vivo*, re-seccionado, reparado, ou de outro modo manipulado, como para remoção de tumor e então retornado ao local original, ou xenotransplante, em que tecidos ou órgãos são transplantados entre espécies. Em uma forma de realização, a solução de perfusão é a solução da Universidade de Wisconsin (UW) (patente US 4.798.824, que é incorporada por referência aqui em sua totalidade) que contém de cerca de 1 a cerca de 25 U/ml (10 ng = 1U) de peptídeo protetor de tecido, 5% de hidroxietil amido (tendo um peso molecular de cerca de 200.000 a cerca de 300.000 e substancialmente isenta de etileno glicol, cloridrato de etileno, cloreto de sódio e acetona); KH₂PO₄ 25 mM; glutatona 3 mM; adenosina 5 mM; glicose 10 mM; tampão de HEPES

10 mM; gluconato de magnésio 5 mM; CaCl_2 1,5 mM; gluconato de sódio 105 mM; 200.000 unidades de penicilina; 40 unidades de insulina; 16 mg de dexametasona; 12 mg de Vermelho fenol; e tem um pH de 7,4 – 7,5 e uma osmolalidade de cerca de 320 mOsm/l. A solução é usada para manter rins e

5 pâncreas cadavéricos antes do transplante. Usando a solução, a conservação pode ser prolongada além do limite de 30 horas recomendado para conservação de rim cadavérico. Este perfundido particular é meramente ilustrativo de um número destas soluções que pode ser adaptado para o uso

10 atual por inclusão de uma quantidade efetiva de um peptídeo protetor de tecido. Em uma outra forma de realização, a solução de perfundido contém de cerca de 1 a cerca de 500 ng/ml de um peptídeo protetor de tecido, ou de cerca de 40 a cerca de 320 ng/ml de peptídeo protetor de tecido. Como mencionado acima, qualquer forma de peptídeo protetor de tecido pode ser usada neste aspecto da invenção.

15 Apesar de um recipiente preferido de um peptídeo protetor de tecido para os presentes fins ser totalmente um humano, os presentes métodos aplicam-se igualmente a outros mamíferos, particularmente animais domesticados, de criação, de companhia, e animais do zôo. No entanto, a invenção não é tão limitativa e os benefícios podem ser aplicados a qualquer

20 mamífero.

Em outros aspectos da invenção *ex vivo*, qualquer peptídeo protetor de tecido como mas não limitado aos descritos acima pode ser empregado.

25 Em um outro aspecto da invenção, métodos e composições para melhorar a viabilidade de células, tecidos ou órgãos que não são isolados da vasculatura por uma barreira de células endoteliais são providos expondo as células, tecidos ou órgãos diretamente a uma composição farmacêutica compreendendo um peptídeo protetor de tecido, ou administrando ou contatando uma composição farmacêutica contendo um peptídeo protetor de

tecido à vasculatura do tecido ou órgão. A atividade melhorada de células responsivas no tecido ou órgão tratado é responsável pelos efeitos positivos exercidos.

Similar a outros compostos protetores de tecido com base em eritropoietina, é possível que os peptídeos protetores de tecido da presente invenção possam ser transportados da superfície luminal para a superfície de membrana de base de células endoteliais de capilares de órgãos com junções firmes de células endoteliais, incluindo, por exemplo, o cérebro, retina e testículos. Assim, as células responsivas através da barreira podem ser alvos suscetíveis para os efeitos benéficos de peptídeos protetores de tecido, e outros tipos de células ou tecidos ou órgãos que contêm e dependem no todo ou em parte de células responsivas nos mesmos podem ser alvos para os métodos da invenção. Apesar de não desejar ficar limitado por qualquer teoria particular, após transcitose de peptídeo protetor de tecido pode interagir com um receptor do protetor de tecido em uma célula responsiva, por exemplo, neuronal, do olho (por exemplo, retinal), adipose, conectivo, do cabelo, dente, mucosal, pancreático, endócrino, aural, epitelial, da pele, músculo, coração, pulmão, fígado, rim, intestino delgado, adrenal (por exemplo, córtex adrenal, medula adrenal), capilar, endotelial, do testículo, ovário, ou célula endometrial, e ligação de receptor pode iniciar uma cascata de transdução de sinal resultando na ativação de um programa de expressão de gene dentro da célula ou tecido responsivo, resultando na proteção da célula, tecido ou órgão, de dano, como por toxinas, agentes quimioterapêuticos, terapia de radiação, hipoxia, etc. Em uma outra forma de realização, o peptídeo protetor de tecido pode ser reticulado em um composto que pode cruzar a barreira, como eritropoietina carbamilada, a ser transportado através da barreira de acordo com o ensinamento do pedido PCT PCT/US01/49479, pedido de patente US nºs. 10/188.905 e 10/185.841, incorporado aqui por referência. Assim, os métodos para proteger tecido contendo células responsivas de dano ou tensão

hipóxica, e melhorar a função deste tecido são descritos em detalhe abaixo.

Na prática de uma forma de realização da invenção, um paciente mamífero está passando por quimioterapia sistêmica para tratamento de câncer, incluindo terapia de radiação, que comumente tem efeitos adversos como dano aos nervos, pulmão, coração ovário ou testicular. A administração de uma composição farmacêutica compreendendo um peptídeo protetor de tecido como descrito acima é realizada antes de e durante quimioterapia e/ou terapia de radiação, para proteger vários tecidos e órgãos de dano pelo agente quimioterapêutico, como para proteger os testículos. O tratamento pode ser continuado até os níveis de circulação do agente quimioterapêutico terem caído abaixo de um nível de perigo potencial para o corpo do mamífero.

Na prática de uma outra forma de realização da invenção, vários órgãos são planejados para ser coletados de uma vítima de um acidente automobilístico para transplante em um número de recipientes, alguns dos quais requereram transporte para uma distância e período de tempo prolongados. Antes da coleta do órgão, o doador é infundido com uma composição farmacêutica compreendendo peptídeos protetores de tecido como descrito aqui. Os órgãos coletados para embarque são perfundidos com um perfundido contendo peptídeos protetores de tecido como descrito aqui, e armazenados em um banho compreendendo peptídeos protetores de tecido. Certos órgãos são continuamente perfundidos com um dispositivo de perfusão pulsátil, utilizando um perfundido contendo peptídeos protetores de tecido de acordo com a presente invenção. Deterioração mínima da função do um órgão ocorre durante o transporte e quando do implante e reperfusão dos órgãos *in situ*.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, um participante em uma atividade perigosa, pode tomar uma dose de uma composição farmacêutica contendo um peptídeo protetor de tecido suficiente tanto para prevenir (isto é, retardar o início de, inibição ou parada), proteger

contra, ou mitigar o dano resultante de um dano a uma célula, tecido ou órgão responsivo. Em particular, este método de tratamento pode ter aplicação em várias profissões suscetíveis a dano, mas não limitadas a, atletas profissionais (mergulhadores, motoristas de carros de corrida, jogadores de futebol, etc.),
5 pessoal militar (soldados, pára-quedistas), pessoal de emergência (polícia, bombeiro, EMS, e pessoal de atendimento em desastres), auxiliares de filmagens e trabalhadores de construção. Além disso, o uso profilático de peptídeos protetores de tecido é contemplado em esforços recreacionais incluindo, mas não limitados a alpinismo, rapel, sky diving, corredores,
10 ciclistas, futebol, rugby, baseball e mergulhos que colocam um risco de dano.

Em uma outra forma de realização da invenção, um procedimento cirúrgico para reparar uma válvula cardíaca requer cardioplegia e oclusão da artéria temporárias. Antes da cirurgia, o paciente é infundido com um peptídeo protetor de tecido. Este tratamento evita dano celular
15 isquêmico hipóxico, particularmente após reperfusão. Além disso, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas profilaticamente para preparar um indivíduo para cirurgia em um esforço para limitar o trauma associado com o procedimento cirúrgico ou ajudar na recuperação do indivíduo do procedimento cirúrgico. Apesar do presente
20 método de tratamento usando composições farmacêuticas contendo peptídeos protetores de tecido prover um uso profilático para procedimentos cirúrgicos, ele pode ser particularmente utilizável em procedimentos que induzem eventos isquêmicos temporários incluindo, mas não limitados a procedimentos de desvios (desvio coronariano), procedimentos de
25 angioplastia, amputações e transplantes, bem como os realizados diretamente em células, tecidos ou órgãos responsivos como cirurgia do cérebro e da medula espinhal, e procedimentos de coração aberto. Estes procedimentos podem envolver o uso de desvio cardiopulmonar (coração pulmão).

Em uma outra forma de realização da invenção, em qualquer

procedimento cirúrgico, como em cirurgia de desvio cardiopulmonar, um peptídeo protetor de tecido da invenção pode ser usado. Em uma forma de realização, a administração de uma composição farmacêutica compreendendo os peptídeos protetores de tecido como descrito acima é realizada antes de, durante e/ou após o procedimento de desvio, para proteger a função do cérebro, coração e outros órgãos.

Nos exemplos acima em que o peptídeo protetor de tecido da invenção é usado para aplicações *ex vivo*, ou para aplicações *in vivo* para tratar células responsivas como tecido neuronal, tecido retinal, coração, pulmão, fígado, rim, intestino delgado, córtex adrenal, medula adrenal, capilar, endotelial, testículo, ovário ou células ou tecidos, a invenção provê uma composição farmacêutica na forma de dosagem unitária adaptada para proteção ou melhora de células, tecidos ou órgãos responsivos distais da vasculatura que compreende uma quantidade na faixa de cerca de 0,01 pg a 7,5 mg, 0,5 pg a 6,5 mg, 500 pg a 5 mg, 500 ng a 5 mg, 1 µg a 5 mg, 500 µg a 5 mg ou 1 mg a 5 mg de um peptídeo protetor de tecido, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma forma de realização preferida, a quantidade de peptídeo protetor de tecido está na faixa de cerca de 0,05 pg a 1 mg. Em uma forma de realização preferida, a formulação contém peptídeos protetores de tecido que são não eritropoiéticas.

Em um outro aspecto da invenção, a administração de peptídeos protetores de tecido pode ser usada para restaurar a função cognitiva em mamíferos que sofreram trauma cerebral. Após um retardo tanto de 5 dias como de 30 dias, a administração de peptídeos protetores de tecido deve ser capaz de restaurar a função como comparado a mamíferos tratados com placebo, indicando a capacidade do peptídeo protetor de tecido para regenerar ou restaurar a atividade cerebral. Assim, a invenção também refere-se ao uso de peptídeos protetores de tecido para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de trauma cerebral e outras

disfunções cognitivas, incluindo tratamento bem após o dano (por exemplo, três dias, cinco dias, uma semana, um mês, ou mais). A invenção refere-se também a um método para o tratamento de disfunção cognitiva após dano administrando uma quantidade efetiva de peptídeos protetores de tecido.

- 5 Qualquer peptídeo protetor de tecido como descrito aqui pode ser usado para este aspecto da invenção.

Além disso, este aspecto restaurativo da invenção refere-se ao uso de quaisquer destes peptídeos protetores de tecido para a preparação de uma composição farmacêutica para a restauração da disfunção celular, de
10 tecido ou órgão, em que o tratamento é iniciado após, e bem após, o insulto inicial responsável pela disfunção. Além disso, tratamento usando os peptídeos protetores de tecido da invenção pode transpor o curso da doença ou condição durante a fase aguda bem como uma fase crônica.

- Um peptídeo protetor de tecido da invenção pode ser
15 administrado sistemicamente em uma dosagem entre cerca de 1 ng e cerca de 100 µg/ peso corporal, preferivelmente cerca de 5-50 µg/kg-peso corporal, mais preferivelmente cerca de 10-30 µg/kg-peso corporal, por administração. Esta dose efetiva deve ser suficiente para obter níveis de soro de peptídeos protetores de tecido maiores do que cerca de 80, 120 ou 160 ng/ml de soro
20 após administração. Os níveis de soro podem ser obtidos em cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 horas pós-administração. Estas dosagens podem ser repetidas como necessário. Por exemplo, a administração pode ser repetida diariamente, tanto quanto necessário, ou após um intervalo apropriado, por exemplo, a cada 1 a 12 semanas, preferivelmente, a cada 1 a 3 semanas. Em
25 uma forma de realização, a quantidade eficaz do peptídeo protetor de tecido e um veículo farmacêuticamente aceitável pode ser embalada em um frasco de dose única ou outro recipiente. Em uma outra forma de realização, os peptídeos protetores de tecido, que são capazes de exercer as atividades descritas aqui mas não causando um aumento na concentração de

hemoglobina ou hematócrito, são usados. Os peptídeos protetores de tecido são preferidos nos casos em que os métodos da presente invenção são pretendidos para ser providos cronicamente.

5.4 TRANSCITOSE

- 5 Molécula veículo e peptídeo protetor de tecido. A presente invenção refere-se ainda a um método para facilitar o transporte de um peptídeo protetor de tecido através de uma barreira de células endoteliais em um mamífero administrando uma composição que compreende o tecido peptídeo protetor de tecido em associação com um peptídeo veículo, um
- 10 peptídeo capaz de cruzar a barreira de células endoteliais, como eritropoietina, como descrito acima. Junções firmes entre células endoteliais em certos órgãos no corpo criam uma barreira para a entrada de certas moléculas. Para o tratamento de várias condições no órgão com barreiras, meios para facilitar a passagem do peptídeo protetor de tecido podem ser desejados.
- 15 Peptídeo protetor de tecido como molécula veículo. Os peptídeos protetores de tecido desta invenção podem ser utilizáveis como veículos para liberar outras moléculas através das barreiras sangue-cérebro e outras similares que podem deslocar-se através. Uma composição compreendendo uma molécula que deseja cruzar a barreira com um peptídeo
- 20 protetor de tecido é preparada e a administração periférica da composição resulta na transcitose da composição através da barreira. A associação entre a molécula a ser transportada através da barreira e o peptídeo protetor de tecido pode ser uma ligação covalente lábil, caso em que a molécula é liberada da associação com o peptídeo protetor de tecido após cruzar a barreira. Se a
- 25 atividade farmacológica desejada da molécula é mantida ou não afetada por associação com peptídeos protetores de tecido, este complexo pode ser administrado.

O versado na arte estará ciente de vários meios para associar moléculas com os peptídeos protetores de tecido da invenção e a outros

agentes descritos acima, por meios covalentes, não covalentes, e outros. Além disso, a avaliação da eficácia da composição pode ser prontamente determinada em um sistema experimental. A associação de moléculas com os peptídeos protetores de tecido pode ser obtida por qualquer número de meios, incluindo ligação lábil, covalente, reticulação, etc. Interações biotina/ avidina podem ser empregadas; por exemplo, peptídeos protetores de tecido biotinilados da invenção podem ser complexados com um conjugado lábil de avidina e uma molécula desejavelmente transportada. Como mencionado acima, uma molécula híbrida pode ser preparada por meios recombinantes ou sintéticos, por exemplo, um polipeptídeo de fusão ou quimérico que inclui ambos o domínio da molécula com atividade farmacológica e o domínio responsável pela modulação da atividade do receptor de peptídeo protetor de tecido. Sítios de clivagem de protease podem ser incluídos na molécula.

Uma molécula pode ser conjugada a um peptídeo protetor de tecido da invenção através de uma molécula polifuncional, isto é, um reticulador polifuncional. Como usado aqui, o termo “molécula polifuncional” engloba moléculas tendo um grupo funcional que pode reagir mais do que uma vez em sucessão, como formaldeído, bem como moléculas com mais do que um grupo reativo. Como usado aqui, o termo “grupo reativo” refere-se a um grupo funcional no reticulador que reage com um grupo funcional em uma molécula (por exemplo, peptídeo, proteína, carboidrato, ácido nucleico, particularmente um hormônio, antibiótico, ou agente anticâncer a serem liberados através de uma barreira de células endoteliais) de modo a formar uma ligação covalente entre o reticulador e a molécula. O termo “grupo funcional” retém seu significado padrão em química orgânica. As moléculas polifuncionais que podem ser usadas são preferivelmente ligadores biocompatíveis, isto é, elas são não carcinogênicas, não tóxicas, e substancialmente não imunogênicas *in vivo*. Reticuladores polifuncionais como os conhecidos na arte e descritos aqui podem ser prontamente testados

em modelos animais para determinar sua biocompatibilidade. A molécula polifuncional é preferivelmente bifuncional. Como usado aqui, o termo “molécula bifuncional” refere-se a uma molécula com dois grupos reativos. A molécula bifuncional pode ser heterofuncional ou homobifuncional. Um reticulador heterobifuncional permite uma conjugação vetorial. É particularmente preferido para a molécula polifuncional ser suficientemente solúvel em água para as reações de reticulação ocorrerem em soluções aquosas como em soluções aquosas tamponadas em pH 6 a 8, e para o conjugado resultante permanecer solúvel em água para bio-distribuição mais efetivo. Tipicamente, a molécula polifuncional liga-se covalentemente com um grupo funcional amino ou sulfidril. No entanto, as moléculas polifuncionais reativas com outros grupos funcionais, como ácidos carboxílicos ou grupos hidroxila, são contempladas na presente invenção.

As moléculas homobifuncionais têm pelo menos dois grupos funcionais reativos, que são iguais. Os grupos funcionais reativos em uma molécula homobifuncional incluem, por exemplo, grupos aldeído e grupos éster ativos. As moléculas homobifuncionais tendo grupos aldeído incluem, por exemplo, glutaraldeído e subaraldeído. O uso de glutaraldeído como um agente de reticulação foi descrito por Poznansky et al., Science 223, 1304-1306 (1984). Moléculas homobifuncionais tendo pelo menos duas unidades éster ativas incluem ésteres de ácidos dicarboxílicos e N-hidroxissuccimida. Alguns exemplos de ésteres de N-succinimidila incluem suberato de dissuccinimidila e ditio-bis- (propionato de succinimidila), e seus ácido bissulfônico e sais de bissulfonato como seus sais de sódio e potássio. Estes reagentes homobifuncionais estão disponíveis de Pierce, Rockford, Illinois.

As moléculas heterobifuncionais têm pelo menos dois grupos reativos diferentes. Os grupos reativos reagem com grupos funcionais diferentes, por exemplo, presentes no peptídeo e na molécula. Estes dois grupos funcionais diferentes que reagem com o grupo reativo no reticulador

heterobifuncional são geralmente um grupo amino, por exemplo, o grupo amino epsilon de lisina; um grupo sulfidril, por exemplo, um grupo tiol de cisteína; um ácido carboxílico, por exemplo, o carboxilado em ácido aspártico; ou um grupo hidroxila, por exemplo, o grupo hidroxila em serina.

5 Naturalmente, alguns dos vários peptídeos protetores de tecido da invenção podem não ter grupos reativos apropriados disponíveis para uso com certo agente de reticulação; no entanto, um versado na arte estará amplamente ciente da escolha dos agentes de reticulação com base nos grupos disponíveis para reticulação nos peptídeos protetores de tecido da invenção.

10 Quando um grupo reativo de uma molécula heterobifuncional formar uma ligação covalente entre um grupo amino, a ligação covalente será geralmente uma ligação amido ou imido. O grupo reativo que formar uma ligação covalente com um grupo amino pode, por exemplo, ser um grupo carboxilato ativado, um grupo halocarbonila, ou um grupo éster. O grupo
15 halocarbonila preferido é um grupo clorocarbonila. Os grupos éster são preferivelmente grupos éster reativos como, por exemplo, um grupo N-hidróxi-succinimida.

O outro grupo funcional é tipicamente tanto um grupo tiol, um grupo capaz de ser convertido em um grupo tiol, como um grupo que formar
20 uma ligação covalente com um grupo tiol. A ligação covalente será geralmente uma ligação tioéter ou um dissulfeto. O grupo reativo que formar uma ligação covalente com um grupo tiol pode, por exemplo, ser uma ligação dupla que reage com grupos tiol ou um dissulfeto ativado. Um grupo reativo contendo uma ligação dupla capaz de reagir com um grupo tiol é o grupo
25 maleimido, embora outros, como acrilonitrila, também sejam possíveis. Um grupo dissulfeto reativo pode, por exemplo, ser um grupo 2-piridilditio ou um grupo 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico). Alguns exemplos de reagentes heterobifuncionais contendo ligações de dissulfeto reativas incluem propionato de 3-(2-piridil-ditio) propionato de N-succinimidila (Carlsson et

al., 1978, Biochem J., 173: 723-737), S-4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metilbenziltiossulfato de sódio e 4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-(2-piridiltio) tolueno. 3-(2-piridiltio) propionato de N-succinimidila é preferido. Alguns exemplos de reagentes heterobifuncionais compreendendo grupos reativos tendo uma ligação dupla que reage com um grupo tiol incluem 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidila e m-maleimidobenzoato de succinimidila.

Outras moléculas heterobifuncionais incluem 3-(maleimido) propionato de succinimidila, 4-(p-maleimido-fenil) butirato de sulfossuccinimidila, 4-(N-maleimidometil-ciclohexano)-1-carboxilato de sulfossuccinimidila, éster maleimidobenzoil-N-hidróxi-succinimida. O sal de sulfonato de sódio de m-maleimidobenzoato de succinimidila é preferido. Muitos dos reagentes heterobifuncionais acima mencionados e seus sais de sulfonato são disponíveis de Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois US.

A necessidade para o conjugado acima descrito ser reversível ou lábil pode ser prontamente determinada pelo versado na arte. Um conjugado pode ser testado in vitro para atividade farmacológica desejável. Se o conjugado reter ambas as propriedades (as propriedades da molécula conjugada e as propriedades do peptídeo protetor de tecido), sua apropriabilidade pode ser então testada in vivo. Se a molécula conjugada requerer separação do peptídeo protetor de tecido para atividade, uma ligação lábil ou associação reversível com eritropoietina de ação longa ou citocina protetora de tecido de ação longa serão preferíveis. As características de labilidade também podem ser testadas usando procedimentos in vitro padrões antes do teste in vivo.

A informação adicional com relação a como fazer e usar estes assim como outros reagentes polifuncionais pode ser obtida a partir das seguintes publicações ou outros disponíveis na arte.

Carlsson, J. et al, 1987, Biochem, J. 173: 723- 737

Cumber, J.A. et al., 1985, *Methods in Enzymology* 112:207-224;

Jue, R. et al., 1978, *Biochem* 17:5399-5405;

Sun, T.T. et al., 1974, *Biochem.* 13:2334-2340;

Blattler, W.A. et al., 1985, *Biochem.* 24:1517-152;

5 Liu, F.T. et al., 1979, *Biochem.* 18:690-697;

Youle, R.J. e Neville, D.M. Jr., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5483-5486;

Lerner, R.A. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3403-3407;

Jung, S.M. e Moroi, M., 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761:162;

10 Caulfield, M.P. et al., 1984, *Biochem.* 81:7772-7776;

Staros, J.V., 1982, *Biochem.* 21:3950-3955;

Yoshitake, S. et al., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399;

Yoshitake, S. et al., 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424;

Pilch, P.F. e Czech, M.P., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:3375-3381;

15 Novick, D. et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487; Lomant, A.J. and Fairbanks, G., 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261;

Hamada, H. e Tsuruo, T., 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488; ou

Hashida, S. et al., 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63, cada incorporada aqui por referência em sua totalidade.

20 Adicionalmente, métodos de reticulação foram estudados por Means e Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

 As barreiras que são cruzadas pelos métodos acima mencionados e composições da presente invenção incluem, mas não são
25 limitadas a barreira sangue-cérebro, a barreira sangue-olho, a barreira sangue-testículos, a barreira sangue-ovário, barreira sangue- nervo, barreira sangue-medula espinhal, e barreira sangue-placenta.

 As moléculas candidatas para transporte através de uma barreira de célula endotelial, incluem, por exemplo, hormônios, como

hormônio de crescimento, fatores neurotróficos, antibióticos, antivirais, ou antifúngicos, como os normalmente excluídos do cérebro e outros órgãos com barreira, radio-fármacos de peptídeos, fármacos anti-sentido, anticorpos e antivirais contra agentes biologicamente ativos, fármacos, e agentes anti-câncer. Os exemplos não limitativos destas moléculas incluem hormônios, como hormônio de crescimento, fator de crescimento de nervos (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento de transformação β 1 (TGF β 1), fator de crescimento de transformação β 2 (TGF β 2), fator de crescimento de transformação β 3 (TGF β 3), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, e interleucina 6, AZT, anticorpos contra fator de necrose de tumor, e agentes imunossupressivos como ciclosporina. Adicionalmente, corantes ou marcadores podem ser fixados aos peptídeos protetores de tecido da presente invenção a fim de visualizar células, tecidos ou órgãos dentro do cérebro e outros órgãos de barreira para fins diagnósticos. Como um exemplo, um marcador usado para visualizar placas dentro do cérebro podem ser fixados a peptídeos protetores de tecido a fim de determinar a progressão do mal de Alzheimer em um paciente.

A presente invenção é também dirigida a uma composição compreendendo uma molécula a ser transportada via transcitose através da barreira da junção firme da célula endotelial e um peptídeo protetor de tecido como mencionado acima. A invenção é ainda dirigida ao uso de um conjugado entre uma molécula e uma citocina de peptídeo protetor de tecido como descrito acima para a preparação de uma composição farmacêutica para a distribuição da molécula através de uma barreira como descrito acima.

Vários modelos de animal e testes in vitro para neuro-proteção e transcitose são providos em PCT / US 01/494979 (incorporado aqui por referência em sua totalidade) para demonstrar a eficácia dos peptídeos protetores de tecido da invenção. Para transcitose, proteínas de modelo

conjugadas às eritropoietinas de ação longa da invenção são avaliadas para transporte no cérebro após administração parenteral. Estes testes em modelos in vitro e modelos de animais são precursores da eficácia dos presentes compostos em outras espécies de mamíferos, incluindo humanos.

5 A presente invenção pode ser melhor compreendida por referência aos seguintes exemplos não limitativos, que são providos como exemplos da invenção. Os seguintes exemplos são apresentados a fim de mais completamente ilustrar as formas de realização preferidas da invenção. Elas não devem de nenhum modo ser construídas, no entanto, como limitando o
10 escopo amplo da invenção.

6. EXEMPLOS

EXEMPLO 1 - MÉTODO DE SÍNTESE DE PEPTÍDEO

A. Síntese de peptídeo protetor de tecido A (SEQ ID NO:32, correspondendo a sequência de aminoácido EPO 38-57) e peptídeo B (SEQ
15 ID NO:34, correspondendo a sequência de aminoácido EPO 58-82).

Peptídeo A, SEQ ID NO:32, e Peptídeo B, SEQ ID NO:34, fragmentos de EPO (ver tabela 1) foram sintetizados usando síntese de peptídeo em fase sólida em etapas Boc- Química de "neutralização in situ" como descrito em Band, D., Chopra, N e Kent, S., "Total Synthesis of
20 Crambin," J.AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 1377-1383 (incorporado por referência aqui em sua totalidade). Brevemente dois fragmentos correspondendo a sequência de aminoácido EPO 38-57 (peptídeo C, NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29) e sequência de aminoácido EPO 58-82 (peptídeo D,
25 QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30) foram sintetizados em resinas -OCH₂-Pam- (peptídeos sem carboxila) ou em resina HSCH₂CH₂CO-Leu-OCH₂-Pam- (peptídeos tioéster). Durante a síntese das cadeias laterais de vários aminoácidos foram protegidos como a seguir: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(4-CH₃Bzl) ou Cys(ACM),

Glu(OcHex), Lys(2-Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Br-Z). Após a cadeia de peptídeo ser montada, os peptídeos foram desprotegidos e simultaneamente clivados do suporte da resina por tratamento com HF anidro contendo *p*-cresol (90:10, v/v) durante 1 h a 0 °C. Após evaporação do HF sob pressão reduzida, produtos brutos foram precipitados e triturados com éter dietílico resfriado, e os peptídeos foram dissolvidos em 50% acetonitrila aquosa contendo 0,1% TFA e purificados pelo sistema HPLC preparativo. As composições de peptídeo foram confirmadas usando LC-MS.

EXEMPLO 2 - VALIDAÇÃO DE PROTEÇÃO DE TECIDO MEDIADA POR PEPTÍDEO

Os peptídeos protetores de tecido foram testados para qualquer atividade de proteção de tecido usando um teste de nervo ciático. Ratos Sprague - Dawley (250- 300 g) (seis por grupo, incluindo controle) foram anestesiados usando isoflurano (Baxter NPC 10019- 733-60) e um sistema de anestesia de laboratório TAbLe Top (medidor de fluxo a 2-3 litros/ min a 3,86 kg/cm² durante pelo menos 3 min. O rato foi então colocado em um lençol homeotérmico para assegurar que a temperatura do núcleo do rato fosse mantida a 35- 37 °C durante a operação. A temperatura do núcleo foi monitorada com sonda retal. O nervo ciático direito do rato anestesiado foi exposto no quarto traseiro através de dissecação do músculo quadríceps; uma incisão de 2 cm com um escalpe de lâmina 15 através da pele paralela e sobre o músculo quadríceps e o músculo quadríceps foi cortado para expor o nervo ciático usando um par de tesouras de dissecação. O nervo ciático foi então isentado das membranas circundantes. Um fio de seda 2.0 (Ethicon, 685-G) foi passado sob o nervo e as extremidades da sutura passada através de um guia que foi mantido perpendicular ao nervo. A extremidade da sutura foi então amarrada a uma corda não elástica que foi então passada em torno de um sistema de polia (uma polia NYL contendo MTD 0,63 cm B (número PO 04174-01) com estabilizador) e um peso de 100 g fixado à corda não elástica

foi lentamente liberado. O peso foi deixado pendurar durante 1 min antes da sutura de seda ser cortada para liberar o peso.

Uma dose de 289 pmol/kg de eritropoietina carbamilada, uma dose de 289 pmol/kg de um peptídeo da série A-J (ver tabela 1), ou PBS foi então injetada na veia caudal usando uma seringa de insulina de 0,5 cm³. Um fragmento de 20 meros (correspondendo a aminoácidos 102- 121) de fator de crescimento derivado de epitélio de pigmento (PEDF) que não segue o ensinamento acima foi usado como controle.

O músculo e a incisão cirúrgica foram então fechados e 5 ml de solução de Ringer lactada foram injetados subcutaneamente no rato. A temperatura do rato foi mantida a 35- 37 °C usando um lençol térmico durante a recuperação.

Nos próximos quatro dias, o dedo do pé chanfrado dos ratos foi determinado por colocação do rato em um tubo acrílico com um diâmetro de 30 cm na superfície de varredura digital. Após esperar 5 min para permitir aclimação, uma varredura foi realizada dos pés de trás do rato que mostraram claramente todos os 5 dedos. Três varreduras aceitáveis de cada rato foram tomadas. A partir da varreduras, a distância entre os dedos (a distância entre a bola do primeiro dedo e a bola do quinto dedo) e a distância dos dedos intermediária (a distância entre a bola do segundo dedo e a bola do quarto dedo) foram medidas. O índice ciático estático foi então computado de acordo com S. Erbayrakatar et al, 2003, Proc. Natl. Ac. Sci USA 100, 6741-6746 (incorporado aqui por referência em sua totalidade) e a análise estatística realizada.

Todos os peptídeos exceto B (SEQ ID NO: 34), H (SEQ ID NO: 47) e o derivado PEDF foram igualmente protetores, provendo um índice ciático estático ("SSI") de cerca de - 0,57 versus um SSI de cerca de -67 a cerca de -68 para fragmento PBS/ PEDF (figura 2). A figura 2 também mostra que a eficácia dos peptídeos positivos foi pelo menos equivalente, se não

melhorada, sobre a de eritropoietina carbamilada.

- A tabela 1 também apresenta a distância aproximada entre carbonil carbonos para os peptídeos testados. As distâncias foram calculadas usando as coordenadas tri-dimensionais de Cheetham et al, 1998, Nat. Struct. Biol. 5: 861- 866, incorporado aqui por referência. Os peptídeos que testaram positivo para atividade de proteção de tecido tinham, cada, uma distância / separação de carbonil carbono para carbonil carbono de entre cerca de 3 Å a cerca de 5 Å.

Tabela 1. Eficácia de proteção de tecido de peptídeos representativos usando um bioteste in vivo (modelo de dano de nervo ciático)

Classe de peptídeo	Peptídeo	Sequência de EPO	Estrutura	Distância aproximada entre carbonil carbonos (Angstroms)	Dose [nmoles/kg-peso corporal]	Teste de nervo ciático
A) Fragmento EPO	A	1-2	APPRLICDSRVLE <u>RY</u> LL <u>E</u> AKEAE (SEQ ID NO: 32) APPRLICDSRVLE <u>RRY</u> LL <u>E</u> AKEAE (SEQ ID NO: 32)	4,6 4,4	290, 290, 1450	+
	B	24-37	NITTGCAEHCSLNE (SEQ ID NO: 34)	2,8	290	-
	C	38-57	NITVPDTKVN <u>F</u> YAWKRMEVG (SEQ ID NO: 29)	4,6	290	+
	D	58-82	QQAVEVWQGLALLSE <u>AV</u> LRGQALLV (SEQ ID NO: 30)	4,8	29, 290, 1459	+
	E	28-47	GCAEHCSLNENITVPDTK <u>V</u> N (SEQ ID NO 31)	4,4	290	+
	F	14-29	RYLLEAKE <u>A</u> ENITTCG (SEQ ID NO: 33)	3,6	290	+
B) Face de hélice						
	G	58, 62, 65, 69 72, 76, 79, 80, 83, 84, 85	QEQL <u>E</u> RALNSS (SEQ ID NO: 40)	3,6	290	+
	H	71, 72, 75, 76, 77	SEL <u>R</u> GQ (SEQ ID NO: 47)	7,2	290	-

C) Quimera									
I			Peptídeo G + folha β dobrada (33-39)		CSLNENIQEQLERALNSS (SEQ ID NO: 43)		290		+
J			Peptídeo G + hélice de polipeptídeo pancreático		QEQLERALNSSLRRYNMLTRTR (SEQ ID NO: 41)		290		+
D) Motivo de citocina tipo 1	K		GM-CSF Hélice A (13-26)		WEHVNAIQEARRLL (SEQ ID NO: 35) WEHVNAIQEARRLL (SID NO: 35) WEHVNAIQEARRLL (SEQ ID NO: 35)	3,6 4,6 4,6	290		+
	L		CNTF hélice A (26-41)		KIRSDLTALTESYVKH (SEQ ID NO: 37)	4,7	290		+

EXEMPLO 3 PEPTÍDEOS PROTETORES DE TECIDO NÃO SÃO ERITROPOIÉTICOS

A. Avaliação *in vitro*

UT-7epo, uma linhagem de células de leucemia dependente de eritropoietina humana, foi usado para a determinação da potência de eritropoietina dos peptídeos. As células UT-7epo Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), cat. No. ACC 363) foram cultivadas em um meio RPMI 1640- completo com 10% FBS e 5 ng/ml eritropoietina. A resposta de proliferação / sobrevivência (= aumento de viabilidade) das células expostas a eritropoietina é mediada pelo receptor de eritropoietina de tipo eritrócitos clássico e é uma medida quantitativa da capacidade de variantes de eritropoietina para estimular o receptor de eritropoietina clássico.

As células UT-7epo foram transferidas para meio RPMI 1640 completo novo contendo 10% de soro de bezerro doador, 4 mM L- glutamina, e suplementado com 5 ng/ml de eritropoietina humana recombinante. As células foram mantidas em frascos de 75 cm² com 20 ml de meio/ frasco em um incubador umedecido com 5% CO₂ a 37 °C durante 48 h. No dia dois do teste, isto é, em 48 h, as células foram transferidas do frasco com um tubo cônico de 50 ml e centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes com 10 ml de meio em inanição (3% soro bezerro doador, 4 mM L- glutamina). As células foram então recolocadas em suspensão em meio de inanição, usando ação de pipeta ascendente e descendente para obter uma suspensão de célula única. As células re-suspensas foram diluídas com meio de inanição para obter uma densidade de 4 x 10⁵ células / ml, e colocadas em placas em um volume de cultura total de 10 ml por 25 cm² frasco. Após uma incubação de 4 h, as células foram novamente transferidas para um tubo cônico de 50 ml. AS células de controle foram mantidas o tempo todo com 5 ng/ml de rhu-

eritropoietina.

As células foram diluídas a 200.000 células / ml em meio de inanição, colocadas em 100 µg/ cavidade em uma placa de 96 cavidades, e expostas a variadas concentrações de eritropoietina, eritropoietina carbamilada e peptídeo D, SEQ ID NO: 30. Uma série de diluições de 10 vezes em meio RPMI 1640 contendo 3% soro foi usada para gerar concentrações de compostos de teste de 0,2 pM a 20 nM. Após mais 48 h de incubação, uma solução de 15 ml de reagente de proliferação de células WST-1 (Roche) foi adicionada para cada cavidade, e incubada durante 1 h a 37 °C em CO₂. Após misturar 1 min, a placa foi lida em uma leitora (absorção a 450 nm, subtraída da absorção de fundo a 650 nm).

O peptídeo D não mostrou atividade eritropoiética em doses tão elevadas como 10.000 pM (figura 3). Preferivelmente, o peptídeo não terá atividade eritropoiética para uma dose menor do que 1 µg/ml e mais preferivelmente para uma dose menor que 10 µg/ml.

B. Avaliação *in vivo*

Para avaliar a atividade eritropoiética de peptídeo protetor de tecido F (SEQ ID NO: 33) ou peptídeo G (SEQ ID NO: 40, como discutido supra, um peptídeo construído dos resíduos apresentados de hélice B), os peptídeos foram administrados 0,8 µg/ kg subcutaneamente três vezes por semana a ratos machos Sprague Dawley. O esquema de dosagem correspondia à dose equivalente (em uma base molar) de EPO previamente determinado para elicitar uma eritropoiese máxima. A concentração de hemoglobina foi determinada periodicamente por uso de um analisador automatizado (Keska Corporation).

Nem peptídeo B nem peptídeo C mostraram qualquer aumento em hematócritos no curso do estudo (figura 4, a resposta a uma dosagem equivalente de EPO é apresentada para comparação). A diminuição na hemoglobina notada por EPO após 3 semanas é devido à produção de

anticorpos neutralizantes anti-EPO que causam aplasia de glóbulos vermelhos pura. Em contraste, não foi observada resposta de anticorpo neutralizante para ou peptídeo G ou peptídeo F.

EXEMPLO 4 PEPTÍDEO É PROTETOR DE TECIDO EM TESTES IN VITRO

Os peptídeos podem ser prontamente avaliados para proteção de tecido usando qualquer número de testes in vitro. Por exemplo, proteção de excitotoxicidade pode ser determinada usando morte induzida por cainita de motoneurônios de camundongo. As medulas espinais foram obtidas de embriões de rato Sprague Dawley de 15 dias de idade, como previamente descrito (Sirene et al, 2001, PNAS 98: 4044, incorporado aqui por referência em sua totalidade). O chifre ventral foi tripsinizado e centrifugado através de uma almofada de BSA a 4% durante 10 min a 300 X g. Células (representando cultura de neurônios- glica mista) foram semeadas a uma densidade de 2.000 células / cm² em placas de cavidades de 24 mm pré-revestidas com poli-DL ornitina e laminina. Os moto-neurônios foram ainda purificados por imuno-bateia e as células semeadas em baixa densidade (20.000 células / cm²) sobre placas de cavidades de 24 mm com poli- DL-ornitina e laminina, e contendo meio de cultura completo (Neurobasal / L27 (2%)), 5 mM L- glutamina, 2% soro de cavalo, 25 mM 2- mercaptoetanol, 25 mM glutamato, 1% penicilina e estreptomicina, 2 ng/ ml BDNF). O meio (sem glutamato) foi re-adicionado às culturas em dias 4 e 6.

A morte das células foi induzida em dia 6 em cultura por incubação durante 48 h com ácido cáínico (5 mM para culturas de neurônio-glia mistas, 50 mM para culturas purificadas. Peptídeo D (5 ng/ mL) ou veículo foi adicionado às culturas 72 h antes de indução de morte celular, e o tratamento continuou durante 48 h. O meio foi então descartado e as células fixadas com 4% (vol/vol) paraformaldeído em PBS durante 30 min, permeabilizados com 0,2% Triton X- 100, bloqueado com 10% (vol/vol) FCS

em PBS, incubado com anticorpos contra neuro-filamentos não fosforilados (SMI -32, 1: 9.000) durante a noite, e visualizados por uso do método avidina-biotina com diaminobenzimida. A viabilidade dos moto-neurônios foi avaliada morfológicamente por contagem de células positivas SMI- 32 através de quatro lados da cobertura e coloração para corpos apoptóticos foi feita usando H33258.

O peptídeo D (SEQ ID NO: 30, correspondendo a aminoácidos 58- 82 de SEQ ID NO: 1) completamente protegeu os moto-neurônios de dano causado por cainato (figura 5).

Alternativamente, a proteção do tecido obtida pelos peptídeos pode ser determinada usando um teste empregando células P19 de camundongo que são de tipo neuronal e morrem via apoptose quando da retirada de soro. A proteção de tecido de peptídeo D (SEQ ID NO: 30) foi comparada com a de EPO usando clone P19 PI19S1801A1 como previamente publicado (Sirene t al, 2001, PNAS 98: 4044, incorporado aqui por referência em sua totalidade). As células foram mantidas não diferenciadas em DMEM suplementado com 2 mM L- glutamina, 100 unidades / ml penicilina G; 100 mg/ml sulfato de estreptomicina (GIBCO), 10% (vol/vol) FBS (HyClone), contendo 1,2 g/ litro NaHCO₃ e 10 mM tampão Hepes, a seguir referido como meio completo. O meio isento de soro continha os mesmos componentes como acima com a deleção de soro e a adição de 5 mg/mol de insulina, 100 mg/ml de transferrina, 20 nM de progesterona, 100 mM putrescina, 30 nM Na₂SeO₃ (de Sigma). Para as experiências, 50% células confluentes foram pretratadas durante a noite com EPO ou veículo, dissociadas com tripsina, lavadas em meio sem soro, e colocadas em placas de frascos de cultura de tecido de 25 cm² a uma densidade final de 10⁴ células / cm² em meio sem soro sozinho ou com EPO adicionado. A viabilidade das células foi determinada por exclusão de azul triptano e um hemacitômetro.

Peptídeo C, SEQ ID NO: 29 (correspondendo a aminoácidos

38-57 de SEQ ID NO: 1) foi pelo menos 10 vezes mais potente em uma base em peso do que EPO na prevenção de apoptose de células p19 (figura 6).

EXEMPLO 5 - Modelo de oclusão de artéria cerebral do meio

Ratos machos Crl: CD(SD) BR pesando 250- 280 g foram obtidos de Charles River, Calco, Itália. A cirurgia foi realizada de acordo com os ensinamentos de Briens et al 2000, PNAS USA 97: 10526 -10531 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Brevemente, os ratos foram anestesiados com hidrato cloral (400 mg/ kg-peso corporal, i.p.) as artérias carótidas foram visualizadas, e a carótida direita foi ocluída por suas suturas e costurada. Um furo cego adjacente e rostral à órbita direita permitiu a visualização da artéria cerebral do meio ("MCA") que foi cauterizada distal à artéria rinal. Para produzir uma penumbra (zona de borda) circundando esta lesão de MCA fixa, a artéria carótica contralateral foi ocluída durante 1 h usando tração provida por um fórceps fino e então re-aberto.

Os ratos Sprague- Dawley (8 por grupo) foram submetidos ao protocolo MCAO acima notado. Os ratos foram administrados com PBS, eritropoietina carbamilada (44 µg/ kg) ou peptídeo D (aa 58-82, 4,4 µg/ kg) quando da liberação da oclusão. Adicionalmente, peptídeo D (aa 58-82, 4,4 µg/kg) foi administrado em quatro doses a intervalos de 2 h após oclusão em um grupo separado. Para avaliação de dano, ratos foram submetidos a teste de comportamento ou o volume da lesão foi determinado por coloração de tetrazólio de seções do cérebro realizadas 24 h após a cirurgia de acordo com o protocolo previamente notado.

Figura 7A apresenta um gráfico demonstrando o volume de lesões resultando de protocolo MCAO. O tratamento com peptídeo D (SEQ ID NO: 30) ou como uma dose simples ou múltiplas, reduziu o volume da lesão resultante da cirurgia MCAO em cerca de dois terços, estatisticamente equivalente aos efeitos de proteção de tecido da eritropoietina carbamilada.

(b) Janela terapêutica de citocinas protetoras de tecido

O protocolo MCAO como acima foi repetido para o presente exemplo. Após o procedimento de oclusão, PBGS, eritropoietina carbamilada (44 ug/kg, i.v.) ou peptídeo D (SEQ ID NO: 30) (4,4 ug/kg) foram administrados aos ratos imediatamente após re-circulação ser estabelecida na carótida (isto é, um hora do início da isquemia). Além disso, peptídeo D (SEQ ID NO: 30) foi administrado em quatro doses (cada 4,4 ug/kg -peso corporal) em 2 h de intervalos após a oclusão. (8 ratos por grupo).

(c) Teste comportamental

Um grupo separado de ratos também foi testado em um protocolo comportamental de falta de pés. Os ratos foram testados em um piso de grade de aço inoxidável elevado 30 cm x 30 cm com tamanho de grade de 30 mm de acordo com o protocolo de Markgraf et al, 1992, Brain Research 575: 238 - 246 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Quando colocado na grade, o rato deve tentar se movimentar em torno e ocasionalmente colocar um pé, em vez de sobre a grade, através da abertura da grade ("falta de pé"). O número de faltas de pés foi medido durante um período de 1 min.

Os ratos tratados com peptídeo D (SEQ ID NO: 30) após reperfusão sofreram de menos faltas de pés do que os tratados com PBS (figura 7B). Não foi observado benefício adicional significativo após a administração de doses múltiplas de peptídeo D (SEQ ID NO: 30). Apesar do número médio de faltas ser menor no grupo recebendo doses múltiplas de peptídeo, a diferença observada não foi diferente de modo significativo do grupo recebendo uma dose única.

EXEMPLO 6 - NEUROPATIA DIABÉTICA

Diabetes foi induzido em ratos machos Sprague Dawley (Charles River (Calco, IT) usando estreptozocina administrada em uma dose única de 60 mg/ kg ip em ratos em jejum como previamente descrito (Biachi et al, 2004, Proc Natl Acad Sci Usa 101, 823- 828, incorporado aqui por

referência em sua totalidade). Diabetes foi confirmado por níveis de glicose no soro aumentados a mais do que 300 mg por decilitro(mg %) (níveis normais são < 100 mg%). Os animais diabéticos foram então tratados com peptídeo D (SEQ ID NO: 30- 4 ug/kg) ou veículo 5 vezes por semana intraperitonealmente. Duas semanas após indução do estado diabético, a velocidade de condução o nervo foi determinada usando o nervo caudal.

Como mostrado na figura 8A, os animais diabéticos mostraram uma redução em velocidade de condução de nervo caudal de cerca de 22 m/s (normal) a cerca de 19 m/s. A administração de peptídeo D (SEQ ID NO: 30) foi associada com um aumento na velocidade de condução para cerca de 23 m/s.

Adicionalmente, o limiar nociceptivo térmico foi quantificado por medida do tempo até a retirada da pata em um teste de "placa quente". A latência de retirada foi definida como o tempo entre a colocação sobre a placa quente e o tempo de retirada e a lambida na pata traseira. Cada animal foi testado em separado por um intervalo de repouso de 30 min. O limiar térmico de pata traseira foi medido 4 semanas após indução de diabetes. O peptídeo D (SEQ ID NO: 30) reduziu o tempo de latência gasto sobre a placa quente pela animal diabético (figura 8B).

EXEMPLO 7 - Proteção de nervo ciático e rim de dano induzido por cisplatina

Cisplatina (CDDT) foi administrada intraperitonealmente a ratos machos Sprague Dawley a 2 mg/kg duas vezes por semana durante 5 semanas, como descrito em Bianchi et al, 2006, Clin Câncer Res. 12: 2607-2612, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Os animais foram separados em grupos de 6 cada. Durante a administração de CDDT de 5 semanas, os animais também receberam ou peptídeo G (SEQ ID NO: 40) a 0,4 µg/kg - peso corporal ou PBS i.p. três vezes por semana. Um grupo de controle recebeu PBS em vez de CDDT. A latência de placa quente foi

determinada como descrito no exemplo 6 acima.

Os animais que receberam CDDT e somente PBS demonstraram um aumento na latência comparada a controles; isto é, CDDT foi associado com sensibilidade térmica prejudicada. Em contraste, animais que receberam o peptídeo demonstraram latência em chapa quente normal (figura 9A).

O tratamento com peptídeo também evitou a poliúria induzida por CDDT (figura 9B). Especificamente, os animais que tinham recebido PBS demonstraram um aumento significativo em produção de urina diária de cerca de 30 mL/dia a cerca de 47 mL/dia. Em contraste, animais tendo recebido o peptídeo protetor de tecido não diferem de modo significativo de animais de controle que receberam PBS em vez de CDDT.

EXEMPLO 8 - PROTEÇÃO DE VAZAMENTO VASCULAR RETINAL INDUZIDA POR DIABETE

Os efeitos benéficos de peptídeos protetores de tecido em vazamento vascular retinal induzida por hiperglicemia podem ser determinados usando um modelo de rato de retinopatia diabética. Neste modelo, azul Evans é usado para determinar o vazamento de vaso sanguíneo em tecidos como descrito por Xu et al, 2001, Invest. Ophtal. Vis. Sci. 42: 789-794 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Azul Evans é firmemente ligado a albumina e é, assim, retido dentro da circulação salvo se o vazamento da parede do vaso ocorrer, como causado por diabetes melito não controlado.

Neste modelo, ratos machos Sprague Dawley em jejum receberam uma dose única de estreptozotocina (60 mg.kg ip). Dois dias depois, após verificação do desenvolvimento de diabetes melito (glicose no soro em jejum maior do que 300 mg %, animais foram divididos em grupos de 6 animais cada assim como um grupo de controle que não recebeu estreptozotocina. Os dois grupos diabéticos foram administrados ou com

peptídeo D (SEQ ID NO: 30) a 4 µg/kg intraperitonealmente 5 dias por semana ou PBS no mesmo esquema. Após três semanas de diabetes não controlada, animais foram anestesiados e administrados com corante azul Evans (30 mg/kg) intravenosamente, que tinha deixado de circular durante 2 h. Usando punção transcardíaca, os animais foram então perfundidos com PBS até o efluente ficar límpido, seguido por 4% paraformaldeído. Os olhos foram então removidos e as retinas cuidadosamente dissecadas do glóbulo. O teor retinal de azul Evans foi determinado por incubação das retinas em formamida a 80 °C durante 18 h. O sobrenadante foi então removido e guardado para análise e as retinas completamente secadas e pesadas. A concentração de azul Evans no sobrenadante foi determinada por um espectrofotômetro e uma curva padrão de azul Evans dissolvida em formamida estabelecida.

Como visto na figura 10, animais que receberam administração de peptídeo D (SEQ ID NO: 30) não experimentaram aumento em corante azul Evans dentro da retina, comparado com controle. Em contraste, animais diabéticos que receberam somente PBS demonstraram um aumento em teor de azul Evans retinal, indicando que o vazamento vascular tinha ocorrido.

EXEMPLO 9: PROTEÇÃO DE FALHA RENAL AGUDA

Os peptídeos protetores de tecido são também efetivos na prevenção de dano aos rins no conjunto de isquemia. Os ratos Wistar machos adultos foram anestesiados e uma incisão abdominal feita para visualizar ambas as artérias renais. Usando um grampo vascular não traumático, ambas as artérias foram comprimidas durante 60 min, completamente parando o fluxo de sangue renal. Os grampos foram então removidos para restaurar a circulação e peptídeo F (SEQ ID NO: 33) ou peo G (SEQ ID NO: 40) foram administrados a 290 pmol/kg - peso corporal intravenosamente. Um grupo adicional com isquemia recebeu somente PBS intravenosamente.

Setenta e duas horas após reperusão, os animais foram

anestesiados e sofreram uma fixação - perfusão usando paraformaldeído. Os animais fixados foram seccionados sagitalmente em metades e ainda fixados por imersão em 10% formaldeído a temperatura ambiente durante um dia. A avaliação histológica dos rins foi realizada de acordo com o protocolo de Sharples et al, 2005, J Amerc Soc. Nephrol. 15: 2115 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Brevemente, após desidratação usando etanol graduado, peças do rim foram incrustadas em parafina, cortadas em seções de 5 micrometros e montadas em lâminas de vidro. As seções nas lâminas foram desparafinizadas com xileno, contra-coloridas com hexatxilina e eosina, e examinadas sob microscópio luminoso. Cem campos foram examinados para cada rim, e um escore de 0 a 3 foi dado para cada perfil tubular: 0, histologia normal; 1 intumescimento de célula tubular, perda de borda da escova, e condensação nuclear com até um terço de perda nuclear; 2, como para escore 1, mas maior do que um terço e menor do que dois terços de perfis tubulares mostrando perda nuclear; e 3, maior do que dois terços de perfil tubular mostrando perda nuclear. O escore histológico para cada rim foi calculado por adição de todos os escores, com um escore máximo de 300.

A administração de ou peptídeo F (SEQ ID NO: 33) ou peptídeo G (SEQ ID NO: 40) foi associada com uma redução significativa em escore de dano ($p < 0,05$) comparado com controles.

EXEMPLO 11 - EFICÁCIA DE PEPTÍDEOS PROTETORES DE TECIDO EM MALÁRIA CEREBRAL

Um modelo de roedor de malária cerebral foi desenvolvido de acordo com Kaiser et al, 2006, J. Infect. Dis. 193: 987 - 995 (incorporado aqui por referência em sua totalidade). Os camundongo CBA/J fêmeas, de 7 semanas de idade, foram separados em grupos de 20 animais. Cada grupo foi infectado com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) administrado intraperitonealmente como uma dose de 10^6 eritrócitos infectados com PbA. Os camundongos receberam ou PBS ou peptídeo F (SEQ ID NO: 33) em dias

4, 5 e 6 como injeção intraperitoneal a uma dose de 2,6 µg/kg. O estado clínico e dados do esfregaço de sangue foram reunidos durante o acompanhamento (ponto final D30). A sobrevivência a longo prazo cumulativa foi calculada de acordo com o método de Kaplan - Méier e grupos foram comparados com o teste de fileira log. O tempo de sobrevivência foi a variável dependente. Um valor p de $< 0,05$ foi considerado significativo.

Como mostrado na figura 2, todos os camundongos no grupo de controle (solução salina) morreram em dia 8. Em contraste, os camundongos que receberam peptídeo F (SEQ ID NO: 33) demonstraram uma sobrevivência prolongada, diferente de modo significativo do grupo de controle ($p < 0,005$) usando um teste de faixa log.

EXEMPLO 12 - EFICÁCIA DE PEPTÍDEOS PROTETORES DE TECIDO EM MODELO EAE DE MURINOS

Encefalomielite autoimune experimental ("AEA" foi induzida em camundongos fêmeas C57BL/6 (6-8 semanas de idade) de acordo com Savino et al, 2006, J Neuroimmunol 172: 27-37, incorporado aqui por referência em sua totalidade. EAE foi induzido por imunização subcutânea nos flancos com um total de 200 µg de MOG356- 55 (Multiple Peptide Systems, San Diego, CA USA) em adjuvante de Freund incompleto (Sigma St Louis, MO USA), suplementado com 8 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis (cepa H37RA, Difco, Detroit MI, USA). Os animais foram alojados em condições sem patógenos específicas, permitindo acesso a alimentos e água ad libitum. Os camundongos receberam 500 ng de toxina pertussina (Sigma) i.v. no momento da imunização e 48 h depois. Os escores de peso e clínicos foram registrados diariamente (0 = saudável, 1 - rabo flácido, 2 = ataxia, e/ou parese de membros de trás, ou reflexo de se endireitar lento, 28 C. 3 = paralisia de membros traseiros e/ou parese de membros dianteiros, 4 = paraparese de membros dianteiros, 5 = moribundo ou morto). As pelotas de alimentos e a água de beber foram colocados em placas de Petri

no piso da gaiola para permitir aos camundongos doentes comer e beber. O peptídeo E (SEQ ID NO: 31) foi administrado diariamente subcutaneamente a uma dose de 4,4 microgramas/ kg- peso corporal, em dia 4 após imunização.

5 A administração de peptídeo E (SEQ ID NO: 31) reduziu de modo significativo tanto o curso do tempo como a severidade de apresentação clínica de AEA nos animais tratados ($p < 0,01$ (figura 13).

A invenção não é limitada pelo escopo das formas de realização específicas descritas que se destinam como lustrações únicas de aspectos individuais da invenção, e métodos e componentes funcionalmente
10 equivalentes estão no escopo da invenção. De fato, várias modificações da invenção, além das mostradas e descritas aqui se tornarão evidentes para os versados na arte a partir da descrição acima e desenhos anexos. Estas modificações se destinam a estar no escopo de acordo com a reivindicação anexa.

15 Todas as referências citadas aqui são incorporadas aqui por referência em sua totalidade para todos os fins.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Brines, Michael Cerami, Anthony Coleman, Thomas
 <120> Peptídeos protetores de tecido e usos dos mesmos
 <130> 10165-032-228
 <150> 60/705,741 <151> 2005-08-05
 <150> 60/706,276 <151> 2005-08-08
 <150> 60/831,737 <151> 2006-07-18
 <160> 58
 <170> FastSEQ para Windows Versão 4.0
 <210> 1
 <211> 165 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo de eritropoietina
 <400> 1
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
 85 90 95
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
 115 120 125
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Cys Arg Thr Gly Asp
 165

 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> aminoácidos 44-49 de EPO associados com um sítio 1 de ligação de
 receptor de alta afinidade
 <400> 2
 Thr Lys Val Asn Phe Tyr 1 5
 <210> 3 <211> 6 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> aminoácidos 146-151 de EPO associados com um sítio 1 de ligação de
 receptor de alta afinidade
 <400> 3
 Ser Asn Phe Leu Arg G y 1 5
 <210> 4 <211> 5 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Aminoácidos 11-15 de EPO interagindo com um sítio 2 de ligação de
 receptor de baixa afinidade
 <400> 4
 Val Leu Glu Arg Tyr
 1 5
 <210> 5

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Aminoácidos 100-104 de EPO interagindo com um sítio 2 de ligação de
 receptor de baixa afinidade
 <400> 5
 Ser Gly Leu Arg Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Polipeptídeos isolados compreendendo um motivo A estrutural de
 aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 4
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 3
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <400> 6
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 1
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido
 <400> 7
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 6
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 5

<223> Xaa = Qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <400> 8
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 9
 <211> 7
 <212>
 PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 7
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 6
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <400> 9
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 8
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 7
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5, 6
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <400> 10
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A estrutural de aminoácidos

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 9
 <223> Xaa = qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 8
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5, 6, 7
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 3
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <400> 12
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 1
 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Variante de polipeptídeos de EPO isoladoscompreendendo motivo A estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido negativamente carregado
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <400> 13
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

```

1          5
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> VARIANTE polipeptídeos isolados compreendendo motivo A estrutural de
aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 5
<223> Xaa - Qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3, 4
<223> Xaa - Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 6
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<400> 14
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5
<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
estrutural de aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 6
<223> Xaa - Qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3, 4, 5
<223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 7
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<400> 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5
<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
estrutural de aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1

```

<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 7
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5, 6
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <400> 16
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 8
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4, 5, 6, 7
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <400> 17
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 3
 <223> Xaa - Qualquer aminoácidos negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <400> 18
 Xaa Xaa Xaa Xaa

1
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos de EPO com'reendendo motivo A estrutural de
 aminpácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <400> 19
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 5
 <223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou
 diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3, 4
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <400> 20
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE

```

<222> 1
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 6
<223> Xaa - Qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3, 4, 5
<223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 7
<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
<400> 21
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
estrutural de aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 7
<223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3, 4, 5, 6
<223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 8
<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
<400> 22
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5
<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
estrutural de aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2, 8
<223> Xaa = qualquer aminoácido negativamente carregado (igual ou
diferente)
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3, 4, 5, 6, 7
<223> Xaa = Qualquer aminoácido (igual ou diferente)

```

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <400> 23
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 24
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 4
 <223> Xaa - Qualquer aminoácido hidrofóbico (igual ou diferente)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido negativamente carregado
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido positivamente carregado
 <400> 24
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 1
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 5
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido negativamente carregado
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3
 <223> Xaa Qualquer aminoácido polar
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Qualquer aminoácido positivamente carregado
 <400> 25
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 <210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
 estrutural de aminoácidos
 <220>

```

<221> VARIANTE
<222> 1,4
<223> Xaa = Qualquer aminoácido hidrofóbico
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa = Qualquer aminoácido positivamente carregado
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = Qualquer aminoácido negativamente carregado
<400> 26
Xaa Xaa Xaa Xaa
1
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> VARIANTE de polipeptídeos isolados de EPO compreendendo um motivo A
estrutural de aminoácidos
<220>
<221> VARIANTE
<222> 1,5
<223> Xaa - Qualquer aminoácido hidrofóbico
<220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> Xaa = Qualquer aminoácido positivamente carregado
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = Qualquer aminoácido polar
<220>
<221> VARIANTE
<222> 4
<223> Xaa = Qualquer aminoácido negativamente carregado
<400> 27
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5
<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> Hélice anfifática de polipeptídeo pancreático
<400> 28
Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro
1          5          10
<210> 29 <211> 20 <212> PRT
<213> Seqüência artificial
<220>
<223> Peptídeo C - laço AB end porção N-terminal de hélice B correspondendo a
aminoácidos 38-57 de EPO
<400> 29
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
1          5          10          15
Met Glu Val Gly
          20
<210> 30
<211> 25
<212> PRT
<213> Seqüência artificial

```

<220>
 <223> Peptídeo D - a porção C-terminal de hélice correspondendo a aminoácidos 58-82 de EPO
 <400> 30
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val
 20 25
 <210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo E - uma porção do laço AB consistindo de um pequeno laço de cisteína e uma folha beta-dobrada correspondendo aos aminoácidos 28-47 de EPO
 <400> 31
 Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp
 1 5 10 15
 Thr Lys Val Asn
 20
 <210> 32 <211> 23 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo A - consiste da porção N-terminal de hélice A correspondendo aos amino acids 1-23 de EPO
 <400> 32
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu
 20
 <210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo F - consiste de aminoácidos 14-19 de EPO
 <400> 33
 Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo H - consiste de aminoácidos 24-37 de EPO
 <400> 34
 Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> GM-CSF helix A fragment
 <400> 35
 Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> Fragmento de hélice A de TPO
 <400> 36
 Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Fragmento de hélice A de CNTF
 <400> 37
 Lys Ile Arg Ser Asp Leu Thr Ala Leu Thr Glu Ser Tyr Val Lys His
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> LIF helix B fragment
 <400> 38
 Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr
 1 5 10 15
 Leu
 <210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Fragmento de hélice A de Interleucina 3 (IL-3)
 <400> 39
 Ser Ile Met Ile Asp Glu Ile Ile His His Leu Lys Arg Pro Pro Asn
 1 5 10 15
 Pro Leu
 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo G - todos os aminoácidos apresentando no exterior de hélice
 B de EPO
 <400> 40
 Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn Ser Ser
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo J - um peptídeo de quimera de peptídeo G ligado a hélice de
 polipeptídeo pancreático
 <400> 41
 Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn Ser Ser Leu Arg Arg Tyr Ile
 1 5 10 15
 Asn Met Leu Thr Arg Thr Arg
 20
 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Folha beta-dobrada encontrada dentro do laço AB de EPO
 <400> 42
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile

1 5
 <210> 43
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo I - um peptídeo de quimera ligando os aminoácidos apresentando exterior de hélice B para a folha beta-dobrada encontrada dentro do laço AB do EPO
 <400> 43
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn
 1 5 10 15
 Ser Ser
 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Porção terminal de hélice C correspondendo a aminoácidos 111, 112, 113, 116 e 118 de EPO
 <400> 44
 Ala Leu Gly Lys Ala
 1 5
 <210> 45 <211> 22 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Laço CD parcial correspondendo a aminoácidos 112- 133 de EPO
 <400> 45
 Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 20
 <210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Fragmento de aminoácido do peptídeo F
 <400> 46
 Glu Ala Lys Glu
 1
 <210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Peptídeo H - Consiste dos aminoácidos de EPO 61, 72, 75, 76, 77
 <400> 47
 Ser Glu Leu Arg Gly Gln
 1 5
 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Calcitonina
 <400> 48
 Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Hormônio de liberação de corticotrofina
 <400> 49
 Vai Ala Leu Leu Pro Cys Pro Pro Cys Arg Ala
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Beta Endorfina
 <400> 50
 Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Glucagon
 <400> 51
 Gly Ser Trp Gln Arg Ser Leu Gln Asp Thr Glu
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> Secretina
 <400> 52
 Gly Gly Ser Ala Ala Arg Pro Ala Pro Pro
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220> <223> VIP
 <400> 53
 Asn Ala Leu Ala Glu Asn Asp Thr Pro Tyr Tyr
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> NP-Y
 <400> 54
 Gly Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys Pro
 1 5 10
 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> GNRH
 <400> 55
 Gly Cys Ser Ser Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

```

<220>
<223> Hormônio da paratiróide
<400> 56
Val Met Ile Val Met Leu Ala Ile Cys Phe Leu
1           5           10
<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> CGRP
<400> 57
Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Tyr Gln Ala
1           5           10
<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> Um motivo localizado proximal para o domínio de transmembrana da
proteína do receptor de eritropoietina ("EPOR")
<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = qualquer aminoácido
<400> 58
Trp Ser Xaa Trp Ser
1           5

```

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de consistir de uma seqüência de não mais que 30 aminoácidos e compreendendo o motivo de aminoácido:

- 5 (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0-5;
 (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$, em que n é 0-5; ou
 (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$, em que n é 0-5;

e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, X é qualquer aminoácido, e L_1 é um aminoácido polar; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

2. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de consistir de uma seqüência de não mais que 30 aminoácidos e compreendendo o motivo de aminoácido:

- 15 (a) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é 0-1; ou
 (b) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0-1 ;

e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 é um aminoácido negativamente carregado, L_1 é um aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente carregado; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

3. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender:

(i) uma seqüência de aminoácido tendo menos do que 90% de identidade de seqüência com qualquer porção de SEQ ID NO:1 tendo o mesmo número de resíduos de aminoácidos como referido polipeptídeo; e

(ii) o motivo de aminoácido:

- (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0-5 ;
 (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$, em que n é 0-5; ou
 (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$, em que n é 0-5 ;

e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, X é qualquer aminoácido, e L_1 é um aminoácido polar; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

5 4. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender:

(i) uma seqüência de aminoácido tendo menos do que 90% de identidade de seqüência com qualquer porção de SEQ ID NO:1 tendo o mesmo número de resíduos de aminoácidos como referido polipeptídeo; e

10 (ii) o motivo de aminoácido:

(a) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é 0-1 ; ou

(b) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0-1 ;

15 e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 é um aminoácido negativamente carregado, L_1 é um aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente carregado;

e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

20 5. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 1 ou 3, caracterizado pelo fato de que a distância entre N_1 e N_2 como um resultado da estrutura terciária de referido polipeptídeo está entre cerca de 3 Å a cerca de 5 Å.

6. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que referida distância está entre cerca de 4 Å a cerca de 5 Å.

25 7. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que referida distância está entre cerca de 4,4 Å a cerca de 4,8 Å.

8. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 2 ou 4, caracterizado pelo fato de que a distância entre N_1 e P_2 como um resultado da

estrutura terciária de referido polipeptídeo está entre cerca de 3 Å a cerca de 5 Å.

9. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que referida distância está entre cerca de 4 Å a cerca de 5 Å.

10. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que referida distância está entre cerca de 4,4 Å a cerca de 4,8 Å.

11. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de consistir de uma seqüência de não mais que 30 aminoácidos e compreendendo o motivo de aminoácido:

(a) $H_1N_1N_2H_2$;

(b) $H_1N_1N_2L_1$; ou

(c) $L_1N_1N_2H_1$,

15 que é formado como um resultado da estrutura terciária de referido polipeptídeo de modo que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e N_2 é cerca de 3 Å a cerca de 5 Å, em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, e L_1 é um aminoácido polar; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

20 12. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de consistir de uma seqüência de não mais que 30 aminoácidos e compreendendo o motivo de aminoácido:

(a) $H_1N_i(L)_nP_1H_2$, em que n é 0-1; ou

25 (b) $H_1P_1(L)_nN_1H_2$, em que n é 0-1;

que é formado como um resultado da estrutura terciária de referido polipeptídeo de modo que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e P_2 é cerca de 3 Å a cerca de 5 Å, em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 é um aminoácido negativamente carregado, L_1 é um

aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente carregado; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

5 13. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender:

(i) uma seqüência de aminoácido tendo menos do que 90% de identidade de seqüência com qualquer porção de SEQ ID NO: 1 tendo o mesmo número de resíduos de aminoácidos como referido polipeptídeo; e

(ii) o motivo de aminoácido:

10 (a) $H_1N_1N_2H_2$; 5 Å

(b) $H_1N_1N_2L_1$; ou

(c) $L_1N_1N_2H_1$,

15 que é formado como um resultado da estrutura terciária de referido polipeptídeo de modo que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e N_2 é cerca de 3 Å a cerca de 5 Å, em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos, N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, e L_1 é um aminoácido polar; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

20 14. Polipeptídeo isolado, caracterizado pelo fato de compreender:

(i) uma seqüência de aminoácido tendo menos do que 90% de identidade de seqüência com qualquer porção de SEQ ID NO:1 tendo o mesmo número de resíduos de aminoácidos como referido polipeptídeo; e

(ii) o motivo de aminoácido:

25 (a) $H_1N_1(L)_nP_1H_2$, em que n é 0-1 ; ou

(b) $H_1P_1(L)_nN_1H_2$, em que n é 0-1;

que é formado como um resultado da estrutura terciária de referido polipeptídeo de modo que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e P_2 está entre cerca de 3 Å e cerca de 5 Å, em que H_1 e H_2 são

aminoácidos hidrofóbicos, N_1 é um aminoácido negativamente carregado, L_1 é um aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente carregado; e em que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula, tecido ou órgão responsivo.

5 15. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, e 5- 7, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) e em que H_1 e H_2 são o mesmo aminoácido hidrofóbico.

 16. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 11 ou 13, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) e em
10 que H_1 e H_2 são o mesmo aminoácido hidrofóbico.

 17. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, e 5- 7, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos diferentes.

 18. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 11 ou
15 13, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos diferentes.

 19. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 4, e 8-10, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) ou (b) e em que H_1 e H_2 são o mesmo aminoácido
20 hidrofóbico.

 20. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 12 ou 14, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) ou (b) e em que H_1 e H_2 são o mesmo aminoácido hidrofóbico.

 21. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 2, 4, e 8-10, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) ou (b) e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos diferentes.

 22. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 12 ou 14, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a) ou (b)

e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos diferentes.

23. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, e 5-7, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a), (b), ou (c) e em que N_1 e N_2 são o mesmo aminoácido negativamente carregado.

24. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 11 ou 13, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a), (b), ou (c) e em que N_1 e N_2 são o mesmo aminoácido negativamente carregado.

25. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, e 5-7, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a), (b), ou (c) e em que N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados diferentes.

26. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 11 ou 13, caracterizado pelo fato de que referido motivo de aminoácido é (a), (b), ou (c) e em que N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados diferentes.

27. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, caracterizado pelo fato de que referido peptídeo é derivado de uma citocina tipo 1.

28. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a citocina tipo 1 é um fator estimulante de colônia de granulócitos - macrófagos, interleucina-3, Trombopoietina, fator neurotrófico ciliar ou fator inibitório de leucemia.

29. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo ainda compreende pelo menos um outro dos seguintes motivos de aminoácidos:

- a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$, em que n é 0-5;
- (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$, em que n é 0-5;
- (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$, em que n é 0-5

(d) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$, em que n é 0-1;

(e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$, em que n é 0-1

(f) $H_1N_1N_2H_2$;

(g) $H_1N_1N_2L_1$;

5 (h) $L_1N_1N_2H_1$

(i) $H_1N_1(L)_nP_1H_2$, em que n é 0-1; ou

j) $H_1P_1(L)_nN_1H_2$, em que n é 0-1;

em que motivo (f), (g), ou (h) é formado como um resultado da

estrutura terciária de referido polipeptídeo de modo que a distância entre os

10 carbonil carbonos de N_1 e N_2 é cerca de 3 Å a cerca de 5 Å; em que o motivo

(i) ou (j) é formado como um resultado da estrutura terciária de referido

polipeptídeo de modo que a distância entre os carbonil carbonos de N_1 e P_2 é

cerca de 3 Å a cerca de 5 Å; e em que H_1 e H_2 são aminoácidos hidrofóbicos,

N_1 e N_2 são aminoácidos negativamente carregados, X é qualquer

15 aminoácido, L_1 é um aminoácido polar, e P_1 é um aminoácido positivamente

carregado.

30. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 29,

caracterizado pelo fato de que pelo menos dois dos referidos motivos de

aminoácidos são diferentes.

20 31. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 -29, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo é

peptídeo quimérico, ainda compreendendo uma hélice de peptídeo anfipática.

32. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 31,

caracterizado pelo fato de que referida hélice de peptídeo anfipática

25 compreende a sequência de aminoácido ALSILVLLQAGS (SEQ ID NO:48);

VALLPCPPCRA (SEQ ID NO:49); NAIKNAYKKG (SEQ ID NO:50);

GSWQRSLQDTE (SEQ ID NO:51); GGSAARPAPP (SEQ ID NO:52);

NALAENDTPYY (SEQ ID NO:53); GALAEAYPSKP (SEQ ID NO:54);

GCSSQHWSYGL (SEQ ID NO:55); VMIVMLAICFL (SEQ ID NO:56);

LRRYINMLTRP (SEQ ID NO:28); ou LALSILVLYQA (SEQ ID NO:57).

33. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-30, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo não aumenta a hemoglobina no recipiente

5 34. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, caracterizado pelo fato de que a atividade protetora celular é de proteção, manutenção, melhora ou restauração da função e/ou viabilidade de referidos célula, tecido ou órgão.

10 35. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em células ou tecidos neuronais, osso, olho, adiposo, conectivo, cabelo, dentes, mucosal, pâncreas, endócrino, orelha, epitelial, pele, músculo, coração, pulmão, fígado, rim, intestino, adrenal, capilar, endotelial, testículos, ovário, ou endometrial.

15 36. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-32, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em uma célula-tronco.

20 37. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação qualquer uma das reivindicações 1-32, caracterizado pelo fato de que referido polipeptídeo tem atividade protetora celular em tecido excitável.

38. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que referido tecido excitável é tecido do sistema nervoso central, tecido do sistema nervoso periférico, tecido cardíaco ou tecido retinal.

25 39. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 -36, caracterizado pelo fato de que referido peptídeo é capaz de atravessar a barreira de célula endotelial.

40. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a barreira de célula endotelial compreende a

barreira sangue-cérebro, a barreira sangue-olho, a barreira sangue-testículos, barreira sangue-ovário, barreira sangue-nervos ou sangue- medula espinhal.

5 41. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender o polipeptídeo isolado como definido em qualquer das reivindicações 1-38 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

 42. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que referida composição é formulada para administração oral, intranasal, ocular, inalacional, transdérmica, retal, sublingual ou parenteral.

10 43. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que referida composição é formulada como uma solução de perfundido.

 44. Método para proteger, manter ou melhorar a viabilidade de uma célula, tecido ou órgão responsivos isolados do corpo do mamífero, caracterizado pelo fato de compreender a exposição da referida célula, tecido ou órgão a uma composição farmacêutica compreendendo expor referida célula, tecido ou órgão à composição farmacêutica como definida na reivindicação 39, 40, ou 41.

20 45. Uso de um polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-38, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para a proteção contra e/ou a prevenção de um dano ao tecido, para a restauração de, ou para o rejuvenescimento de tecido e/ou função de tecido em um indivíduo em necessidade do mesmo.

25 46. Uso de um polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-38, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento terapêutico ou tratamento profilático em um indivíduo em necessidade do mesmo de uma doença cardiovascular, doença cardiopulmonar, doença

respiratória, doença do rim, doença do sistema urinário, doença do sistema reprodutivo, doença dos ossos, doença da pele, doença gastrointestinal, anormalidade endócrina, anormalidade metabólica, disfunção cognitiva, ou uma doença ou distúrbios do sistema nervoso central ou periférico.

5 47. Uso de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um mamífero.

 48. Uso de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

 49. Método para facilitar a transcitose de uma molécula
10 através de uma barreira de célula endotelial em um indivíduo em necessidade do mesmo, caracterizado pelo fato de compreender a administração ao referido indivíduo de uma composição compreendendo referida molécula em associação com um peptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-38.

15 50. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que referida associação é uma ligação covalente lábil, uma ligação covalente estável, ou uma associação não covalente com um sítio de ligação para referida molécula.

20 51. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de compreender a seqüência de nucleotídeo codificando o peptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-38.

 52. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender o ácido nucleico como definido em reivindicação 49.

25 53. Vetor de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de ser um vetor de expressão.

 54. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de conter o vetor de expressão da reivindicação 51.

 55. Método para produzir recombinantemente o polipeptídeo isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1-38,

caracterizado pelo fato de compreender i) cultivar em um meio a célula hospedeira da reivindicação 52, sob condições apropriadas para a expressão de referido peptídeo, e ii) recuperar e isolar referido peptídeo do referido meio.

5 56. Polipeptídeo isolado de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido peptídeo compreender a sequência de aminoácido de peptídeo A (APRLICDSRVLERYLLEAKEAE, SEQ ID NO:32), peptídeo C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29), peptídeo D (QQAQEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30),
 10 peptídeo E (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO:31), peptídeo F (RYLLUNITTGC, SEQ ID NO:33), peptídeo G (QEQLERALNSS, SEQ ID NO:40), peptídeo I (CSLNENIQEQLERALNSS, SEQ ID NO:43), peptídeo J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEQ ID NO:41), peptídeo K (WEHVNAIQEARLL, SEQ ID NO:35), ou peptídeo L
 15 (KIRSDLTALTESYVKH, SEQ ID NO:37).

57. Polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-38, caracterizado pelo fato de que referida pelo menos uma atividade protetora celular é neuroproteção, cuja atividade é avaliada *in vitro* por um método compreendendo:

20 (a) contatar uma cultura de teste de neurônios hipocâmpais com N-metil-D- aspartato e referido peptídeo, e

(b) determinar a viabilidade celular a 48 horas após referido contato,

de modo que se a viabilidade celular determinada na etapa (b)
 25 for maior do que a de uma cultura de controle na ausência de referido peptídeo, o peptídeo possui atividade protetora celular.

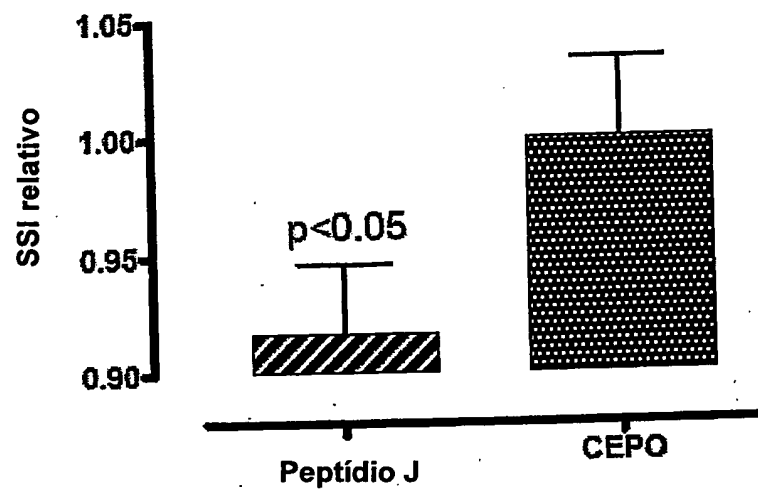


FIG. 1

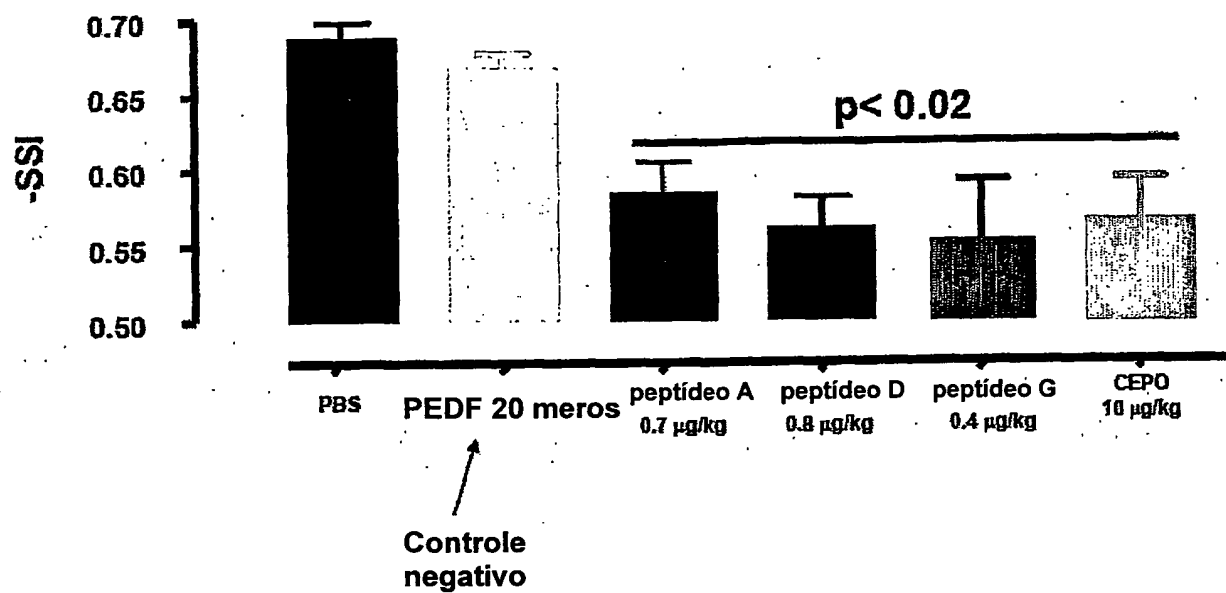


FIG. 2

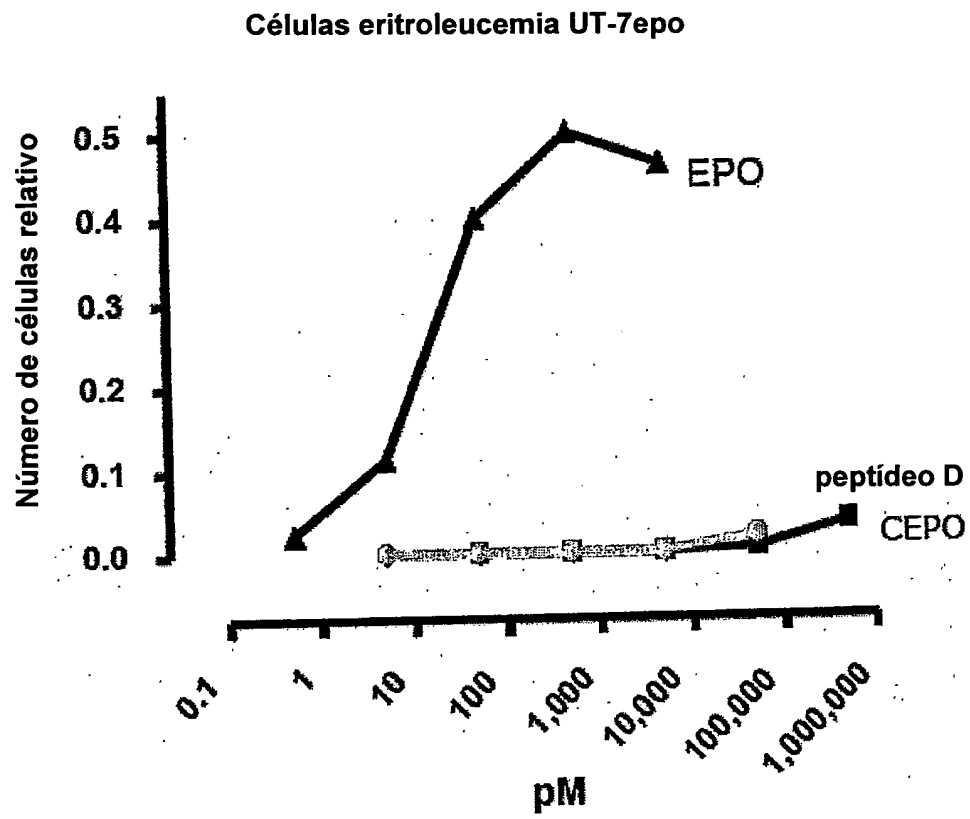


FIG. 3

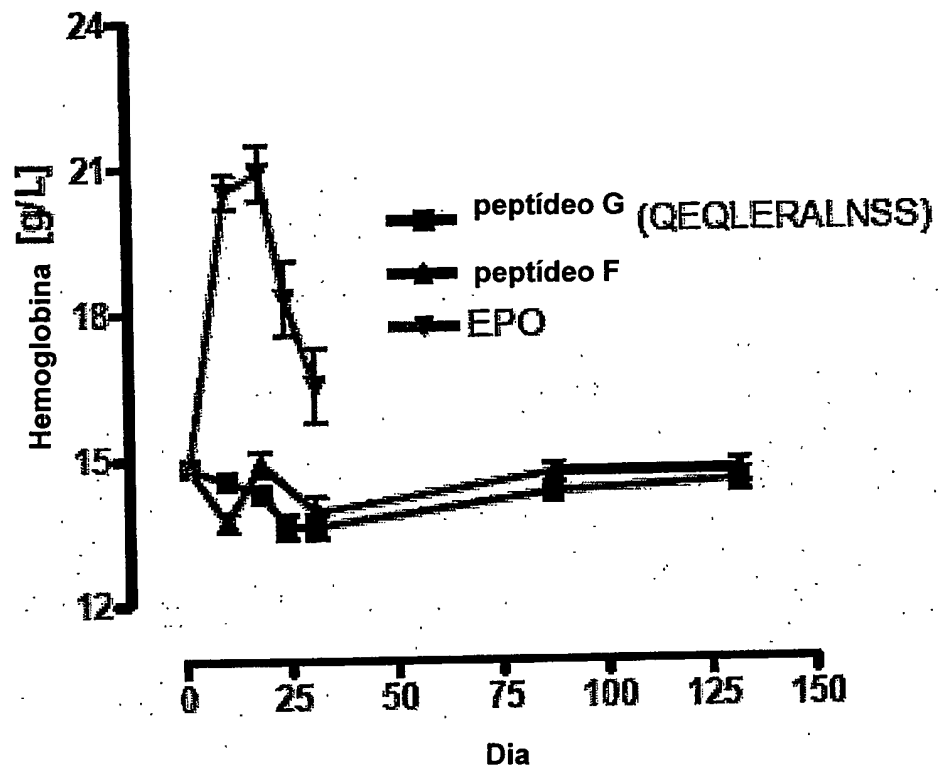


FIG. 4

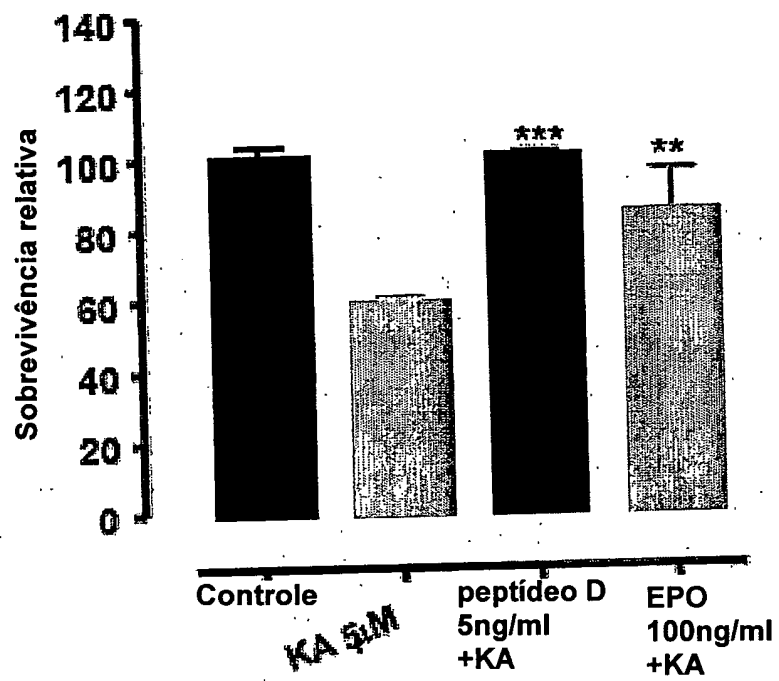


FIG. 5

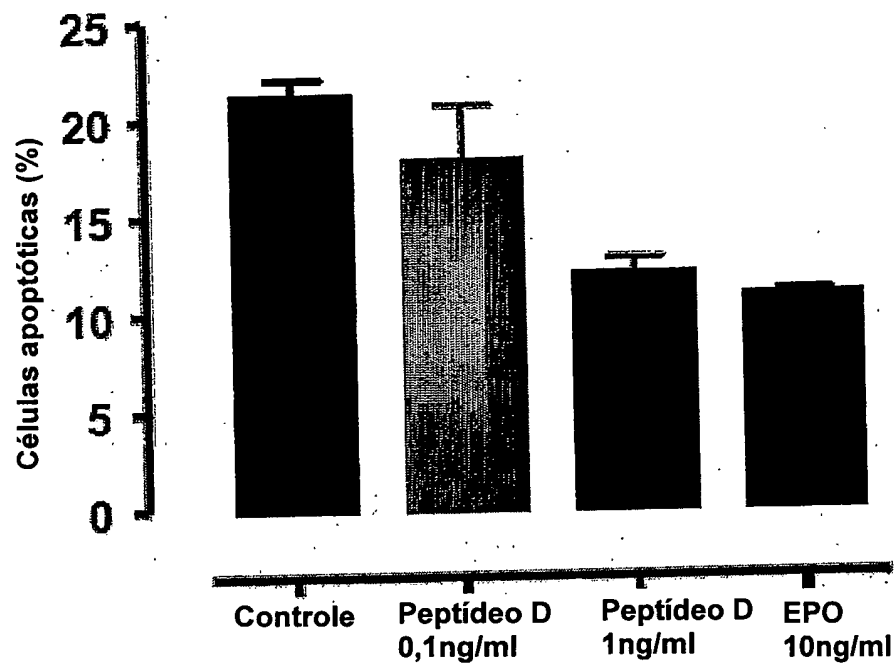


FIG. 6

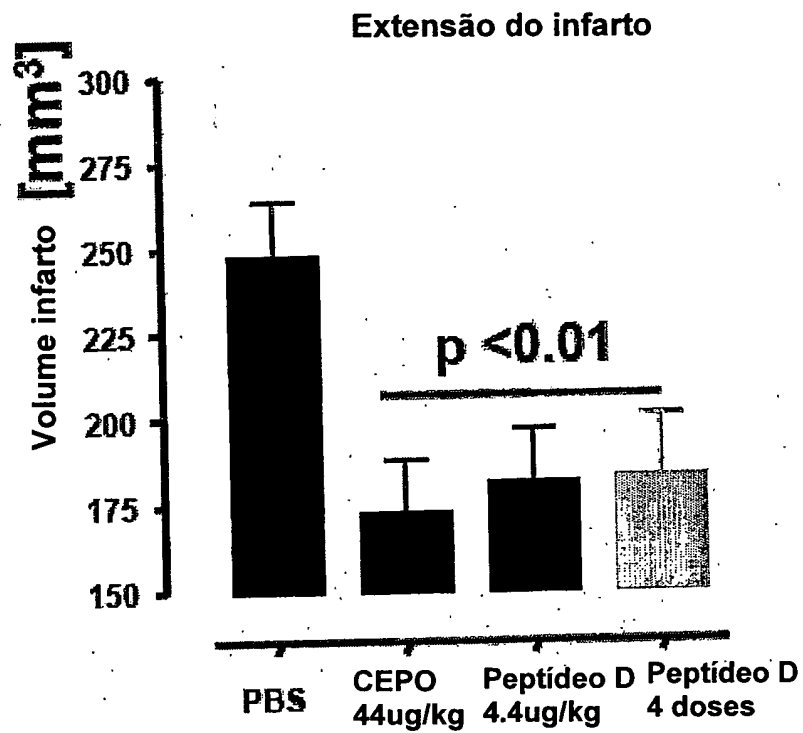


FIG. 7A

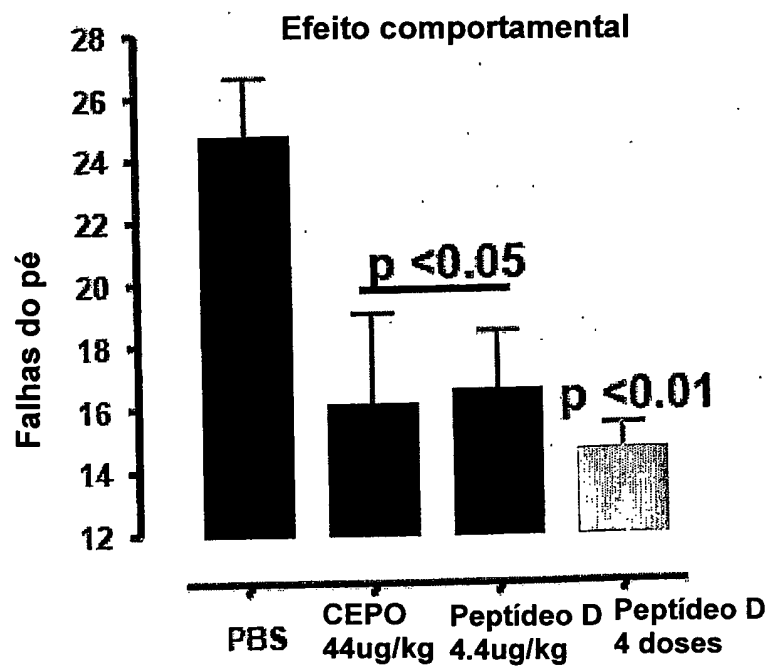


FIG. 7B

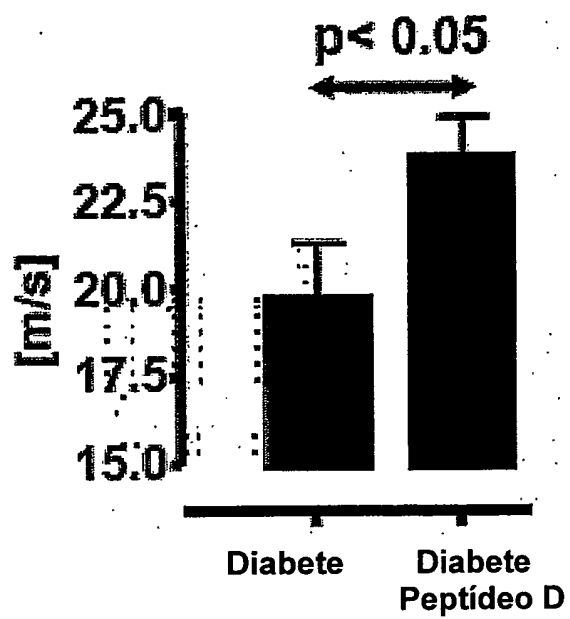


FIG. 8A

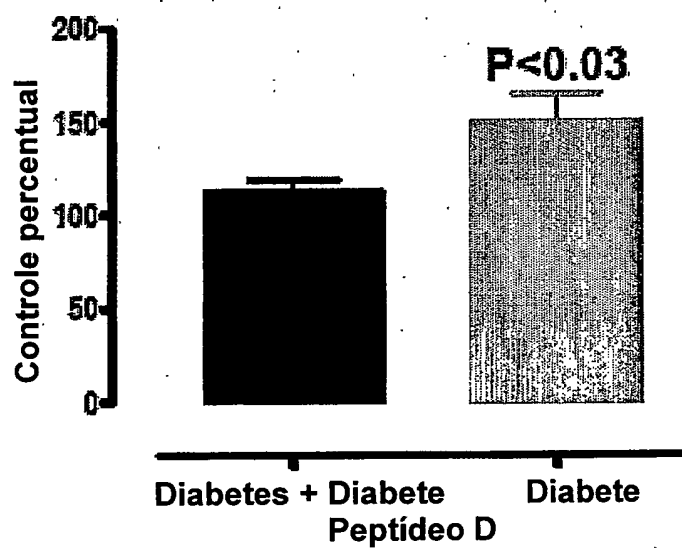


FIG. 8B

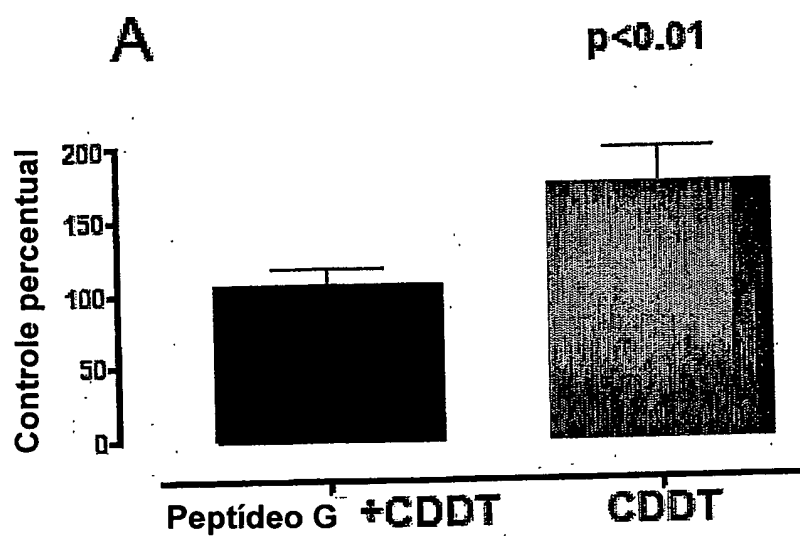


FIG. 9A

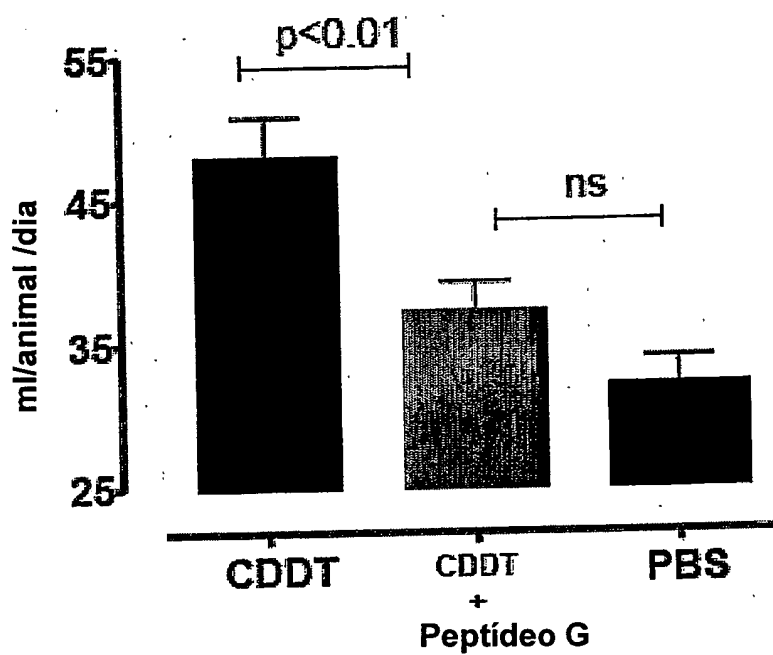


FIG. 9B

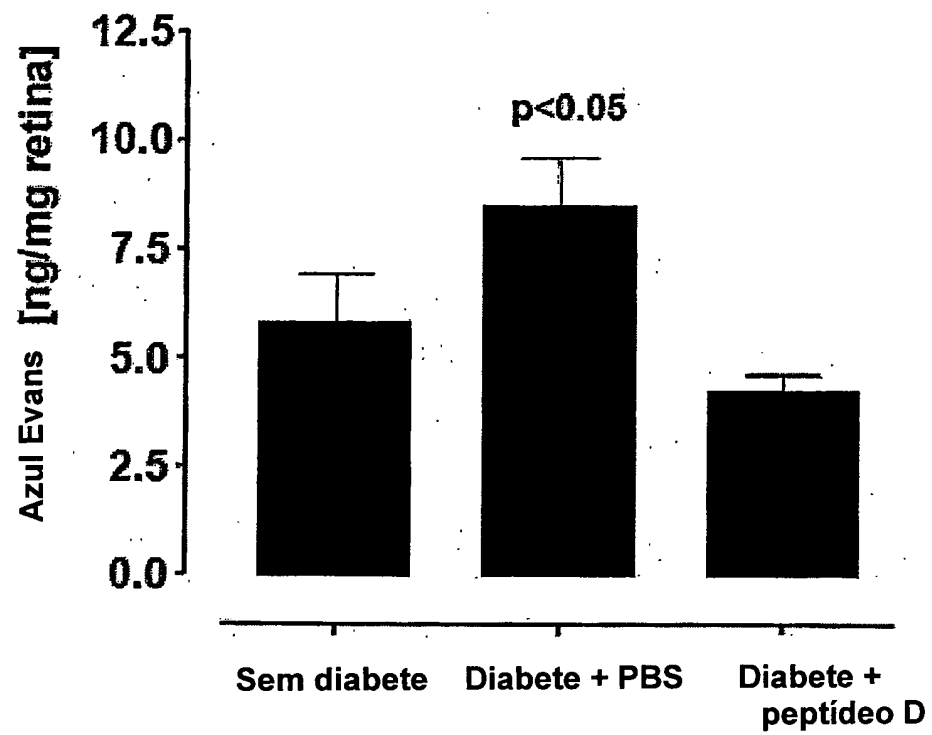


FIG. 10

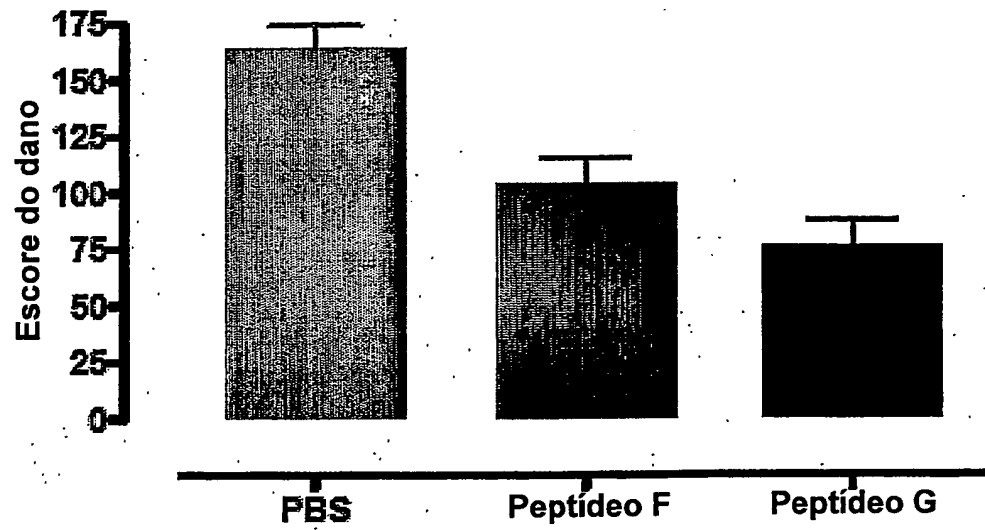


FIG. 11

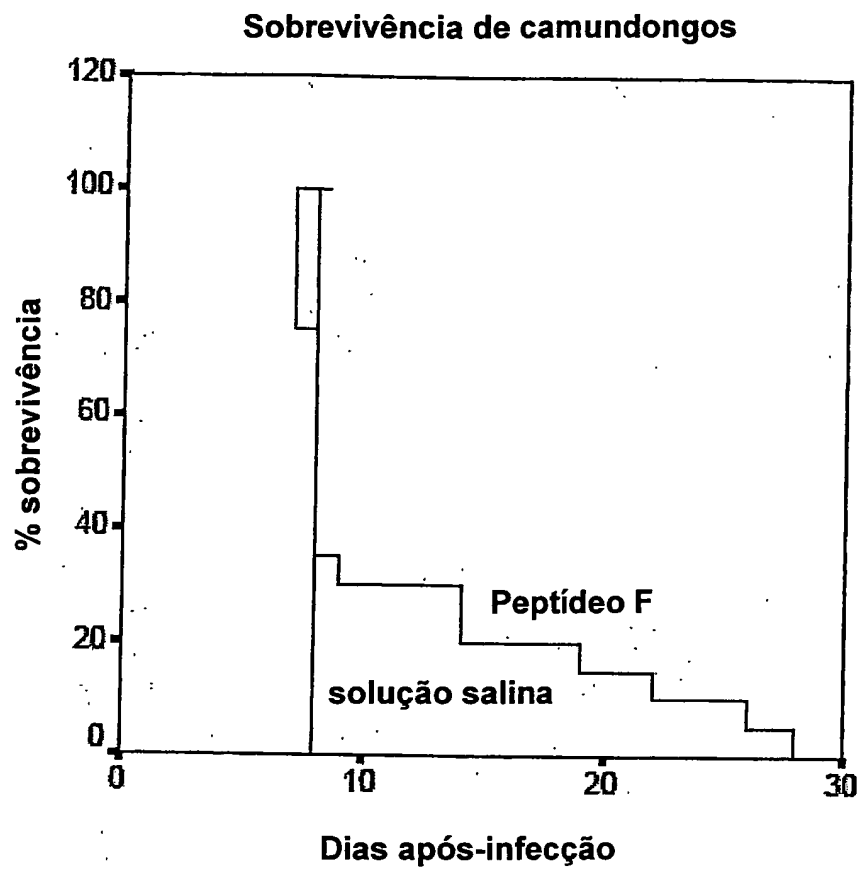


FIG. 12.

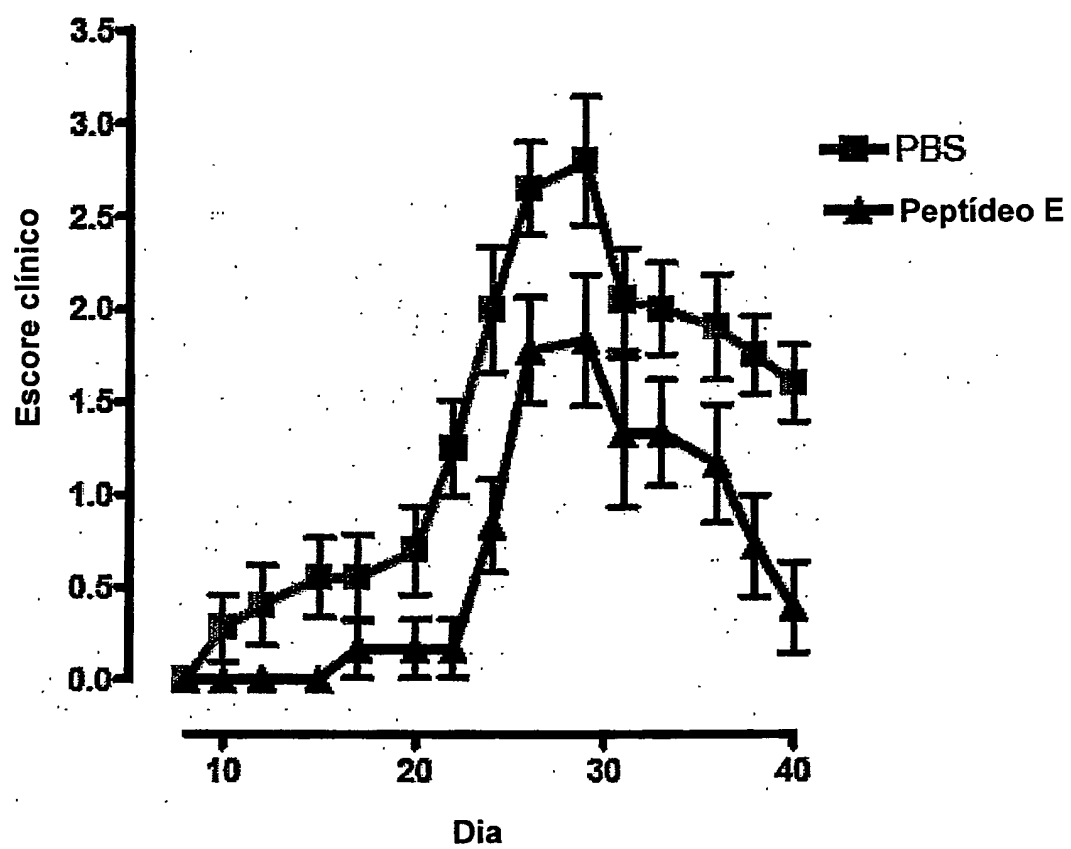


FIG. 13

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA PROTEGER, MANTER OU MELHORAR A VIABILIDADE DE UMA CÉLULA, TECIDO OU ÓRGÃO RESPONSIVOS ISOLADOS DO CORPO DO MAMÍFERO, USO DE UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA FACILITAR A TRANSCITOSE DE UMA MOLÉCULA, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODO PARA PRODUZIR RECOMBINANTEMENTE O POLIPEPTÍDEO ISOLADO”

A presente invenção é dirigida a novos peptídeos protetores de tecido. Os peptídeos protetores de tecido da invenção podem ligar a um complexo de receptor protetor de tecido. Particularmente, a presente invenção é dirigida a peptídeos protetores de tecido derivados de ou compartilhando seqüências de consenso com porções de ligandos de receptor de citocinas, incluindo eritropoietina (EPO), que não estão envolvidas na ligação do ligando ao complexo do receptor, por exemplo, ao homodímero do receptor de EPO. Conseqüentemente, os peptídeos protetores de tecido da invenção são derivados das seqüências de aminoácidos das regiões de ligandos de receptor de citocinas que estão geralmente localizadas em ou dentro da região da proteína de ligando que é oposta ao complexo do receptor, isto é, são geralmente derivadas de seqüências de aminoácidos de regiões da proteína de ligando que estão voltadas distantes do complexo do receptor enquanto o ligando é ligado ao receptor. A invenção é ainda dirigida às seqüências de consenso para uso em engenharia de um peptídeo protetor de tecido sintético. Estes peptídeos protetores de tecido também incluem fragmentos, quimeras, assim como peptídeos projetados para imitar a localização espacial de resíduos de aminoácidos chave dentro dos ligandos de receptor protetor de tecido, por exemplo EPO. A invenção ainda engloba métodos para o tratamento ou prevenção de doença ou distúrbio usando peptídeos protetores

de tecido da presente invenção. A invenção também engloba métodos para melhorar a função de tecido excitável usando peptídeos protetores de tecido da presente invenção.