



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0027868
(43) 공개일자 2017년03월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01) C07K 14/575 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/435 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7005579(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년08월07일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2013-7016015
원출원일자(국제) 2006년08월07일
심사청구일자 2013년07월19일
- (85) 번역문제출일자 2017년02월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/031061
- (87) 국제공개번호 WO 2007/019545
국제공개일자 2007년02월15일
- (30) 우선권주장
60/705,741 2005년08월05일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
아라임 파마슈티칼즈, 인크.
미국 10591 뉴욕주 테리타운 스위트 210 화이트
플레인스 로드 580
- (72) 발명자
세라미, 안토니
미국 10589 뉴욕주 소머즈 헤리티지 힐즈 58에이
브린스, 마이클
미국 06525 코네티컷주 우드브릿지 웨파와우그
로드 1
쿨만, 토마스
미국 10549 뉴욕주 마운트 키스코 에머리 스트리트 20
- (74) 대리인
양영준, 양영환, 심미성

전체 청구항 수 : 총 1 항

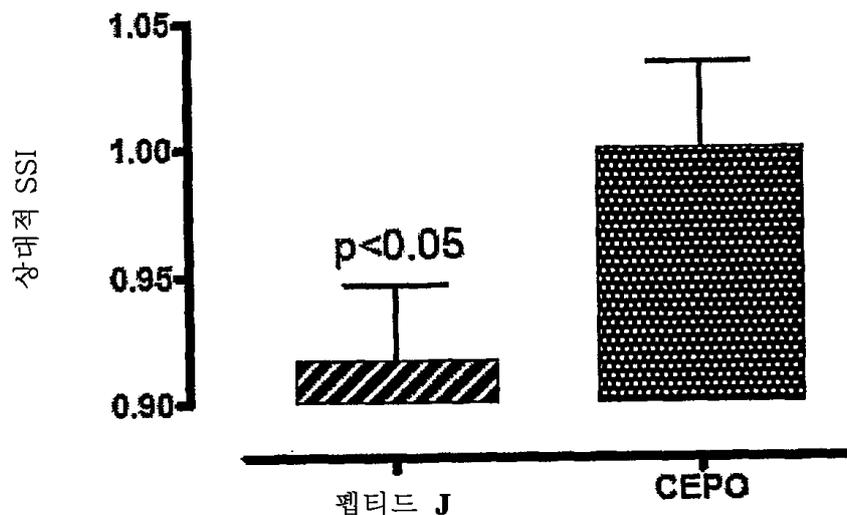
(54) 발명의 명칭 조직 보호 펩티드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 조직 보호 펩티드는 조직 보호 수용체 복합체에 결합될 수 있다. 특히, 본 발명은 수용체 복합체, 예를 들어, EPO 수용체 동종이합체에 대한 리간드의 결합에 수반되지 않는, 에리스로포이에틴 (EPO)을 비롯한 사이토카인 수용체 리간드의 부분으로부터 유도되거나 이와 공

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



통 서열을 공유하는 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 수용체 복합체의 반대편의 리간드 단백질의 부위 상부 또는 내부에 일반적으로 존재하는 사이토카인 수용체 리간드 부위의 아미노산 서열 유래이고, 즉 이는, 일반적으로 리간드가 수용체에 결합되어 있는 동안 수용체 복합체로부터 반대로 향하는 리간드 단백질 부위의 아미노산 서열 유래이다. 또한, 본 발명은 합성 조직 보호 펩티드의 조장에 사용하기 위한 공통 서열에 관한 것이다. 상기 조직 보호 펩티드는 또한 조직 보호 수용체 리간드, 예를 들어, EPO 내부의 핵심 아미노산 잔기의 공간 정위를 모방하도록 고안된 단편, 키메라, 뿐만 아니라 펩티드를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 조직 보호 펩티드를 이용하여 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 조직 보호 펩티드를 이용하여 흥분성 조직의 기능을 강화시키는 방법을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/505 (2013.01)
C07K 14/575 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

60/706,276 2005년08월08일 미국(US)
 60/831,737 2006년07월18일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

조직 손상에 대한 보호 및/또는 이의 예방, 조직 및/또는 조직 기능의 회복, 또는 이의 재생을 필요로 하는 대상체에 대한 약학 조성물의 제조를 위한, 반응성 세포, 조직 또는 기관 중 세포 보호 활성을 갖는, 30 개 이하의 아미노산 서열로 이루어지고 하기 아미노산 모티프를 포함하는 단리된 폴리펩티드의 용도.

(a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ (여기서, n 은 0 ~ 5임);

(b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ (여기서, n 은 0 ~ 5임); 또는

(c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ (여기서, n 은 0 ~ 5임)

(여기서, H_1 및 H_2 는 소수성 아미노산이고, N_1 및 N_2 는 음전하의 아미노산이고, X 는 임의의 아미노산이며, L_1 은 극성 아미노산임)

발명의 설명

기술 분야

1. 서론

[0001]

본 발명은 신규한 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 본 발명의 조직 보호 펩티드는 조직 보호 수용체 복합체에 결합될 수 있다. 특히, 본 발명은 수용체 복합체, 예를 들어, EPO 수용체 동종이합체에 대한 리간드의 결합에 수반되지 않는, 에리스로포이에틴 (EPO)을 비롯한 사이토카인 수용체 리간드의 부분으로부터 유도되거나 이와 공통 서열을 공유하는 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 수용체 복합체의 반대편의 리간드 단백질의 부위 상부 또는 내부에 일반적으로 존재하는 사이토카인 수용체 리간드 부위의 아미노산 서열 유래이고, 즉 이는, 일반적으로 리간드가 수용체에 결합되어 있는 동안 수용체 복합체로부터 반대로 향하는 리간드 단백질 부위의 아미노산 서열 유래이다. 또한, 본 발명은 합성 조직 보호 펩티드의 조작에 사용하기 위한 공통 서열에 관한 것이다. 상기 조직 보호 펩티드는 또한 조직 보호 수용체 리간드, 예를 들어, EPO 내부의 핵심 아미노산 잔기의 공간 정위를 모방하도록 고안된 단편, 키메라, 뿐만 아니라 펩티드를 포함한다.

[0002]

[0003]

본 발명은 또한 본 발명의 조직 보호 펩티드를 이용하여 질환 또는 장애를 치료, 예방 또는 개선하고/하거나 조직 손상을 치료, 회복 또는 개선하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 조직 보호 펩티드를 이용하여 흥분성 조직의 기능을 강화시키는 방법을 포함한다.

배경 기술

2. 본 발명의 배경

[0004]

[0005]

에리스로포이에틴 ("EPO")은 적혈구 용적률의 유지, 및, 더 최근에는 조직 보호와 일반적으로 관련된 당단백질 호르몬이다. 성숙한 인간 EPO 단백질은 165 개의 아미노산을 포함하고 34 kDa의 분자량을 가지며, 여기서 글리코실 잔기가 분자 중량의 약 40%에 기여한다. EPO 분자는 이의 소수성 도메인을 통해 상호작용하여 수성 환경 내에서 주로 구형 구조를 형성하는 4 개의 나선을 포함한다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Cheetham 등, 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866]). 본 발명은 수성 환경에 직면한 (즉, 소수성, 구형 중심핵으로부터 떨어진) 특정 아미노산이 조직 보호를 매개한다는 발견으로부터 유도된다. 펩티드는 본 출원인에 의해 식별된 조직 보호 부위의 이해로부터 유도되거나 고안될 수 있다.

[0006]

상기 기재한 바와 같이, EPO는 다능성이다. 이의 호르몬 역할에 있어서, EPO는 적혈구 전구 세포의 적혈구로의 성숙에 있어서의 이의 역할을 통해 적혈구 용적률을 조절한다. EPO는 적혈구 전구 세포의 성숙 과정 동안 항-아포토시스제로서 기능하여, 전구 세포가 적혈구로 성숙되는 것을 가능하게 한다. 조직 산소의 감소된 수준

(저산소증)은 신장에 의한 에리스로포이에틴의 증가된 생성을 유발하여, 이는 증가된 적혈구 조혈을 야기한다. 신장이 일반적으로 대부분의 혈청 에리스로포이에틴을 생성한다는 점에서, 신장 기능의 상실, 예컨대 만성 신부전은 감소된 EPO의 생성 및 종종 빈혈을 초래한다. 유사하게, 빈혈은 기타 만성 상태, 예컨대 암, 또는 상기 병과 관련된 치료, 예컨대 EPO의 생성을 직접적으로 억제하는 화학 요법으로부터 초래될 수 있다. 시판되는 재조합 에리스로포이에틴은 뉴저지주, 라티탄 소재의 오르소 바이오테크 인코포레이티드 (Ortho Biotech Inc.)로부터 이용가능한 PROCRT, 및 캘리포니아주, 사우전드 오크스 소재의 암젠, 인코포레이티드 (Amgen, Inc.)로부터 이용가능한 EPOGEN의 상표명으로 이용가능하였으며, 말기 신장 질환, HIV-감염 환자에 있어서 AZT (지도부딘)를 이용한 치료, 종양 환자, 및 화학 요법으로부터 초래되는 빈혈의 치료에 사용되어 왔다. 현재 과글리코실화된 에리스로포이에틴, ARANESP™ (캘리포니아주, 사우전드 오크스 소재의 암젠)이 빈혈의 치료에 이용가능하다. 추가로, 상기 화합물은 수술을 겪은 환자의 적혈구 용적률을 증가시켜 동종 혈액 수혈의 필요성을 감소시키기 위해 사용되어 왔다.

[0007] 최근, 몇몇 증거는 EPO가 또한 측분비-자가분비 방식으로 국소적으로 기능하여 조직 손상을 최소화함을 시사하였다. 예를 들어, EPO는 저산소 세포 미세환경을 개선하고 대사 스트레스에 의해 야기된 세포 예정사를 감소시킨다. 상기 활성 모두는, 에리스로포이에틴 수용체 ("EPOR") 단백질에 의해 부분적으로 포함된, 특정 세포 표면 수용체와 EPO의 상호작용을 통해 부분적으로 완화된다. EPOR은 대략 66 kDa의 단백질이고 1형 사이토카인 수용체 패밀리의 구성원이다. 상기 패밀리는 이의 세포의 도메인의 공유된 상동성에 기초하여 함께 분류된 수용체를 포함하고, 인터루킨 IL-2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL9, IL11, 과립구 대식구-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 섬모 향신경성 인자 (CNTF), 트롬보포이에틴, 성장 호르몬 및 프로락틴에 대한 수용체를 포함한다. 상기 수용체의 보존된 세포의 도메인은 대략 200 개 아미노산의 길이를 가지며, 수용체의 유지 및 구조 보전에 필수적인 것으로 보이는, 아미노산 말단 부위의 4 개의 위치 보존된 시스테인 잔기 (Cys 294, Cys 283, Cys 248, 및 Cys 238) (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Murray, 1996, Harpers Biochemistry 24th ed. pp. 524-526, Appilion & Lange, Ltd.]; [Caravella 등, 1996, Protein: Struct. Funct. Gen. 24:394-401]), 및 막횡단 도메인에 근접하여 위치한 Trp-Ser-X-Trp-Ser (서열 58) 모티프를 포함한다.

[0008] 적혈구 조혈과 관련하여, EPOR은 1형 사이토카인 수용체 패밀리에 속하는 기타 수용체와 유사한 방식으로 기능한다. 먼저, 수용체 리간드, 예를 들어, EPO는 미리 형성된 EPOR의 이합체, (EPOR)₂에 결합된다. EPO는 리간드 표면 상의 2 개의 별개의 부위: 고 친화성 수용체 결합 부위 (부위 1) 및 저 친화성 수용체 결합 부위 (부위 2)를 통해 전형적 (EPOR)₂ 동종이합체 수용체의 세포의 도메인과 상호작용하는 것으로 측정되었다. 부위 1과 결합되는 EPO의 아미노산 서열은 서열 1의 아미노산 44-49에 해당하는 TKVNFY, 서열 2, 및 서열 1의 아미노산 146-151에 해당하는 SNFLRG, 서열 3이고; 부위 2와 결합되는 서열은 서열 1의 아미노산 11-15에 해당하는 VLERY, 서열 4, 및 서열 1의 아미노산 100-104에 해당하는 SGLRS, 서열 5이다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Cheetham 등, 1998, Nature Structural Biology 5:861-866]). EPOR 동종이합체 활성화는 EPOR과 결합된 신호 전달 단백질, 예를 들어, Jak2 티로신 키나아제의 티로신 인산화를 야기하고, 이는 이어서 몇몇 상이한 경로, 예를 들어, 포스포티딜이노시톨 (PI) 3-키나아제 경로, Ras/MAP 키나아제 경로, 및/또는 STAT 경로를 활성화할 수 있다. 상기 경로는 에리스로포이에틴에 의해 매개되는 적혈구 조혈에 필요한 항-아포토시스 기능을 유발한다 (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Kirito 등, 2002, Blood 99:102-110]; [Livnah 등, 1999, Science 283:987-990]; [Naranda 등, 2002, Endocrinology 143:2293-2302]; [Remy 등, 1999, Science 283:990-993]; 및 [Yoshimura 등, 1996, The Oncologist 1:337-339]).

[0009] 최근, 출원인은 EPO의 조직 보호 특성이 EPOR 뿐만 아니라 또다른 수용체 단백질, 베타 공동 수용체 ("β_c")를 포함하는 수용체에 의해 매개된다는 점을 발견하였다. 동종이합체 (EPOR)₂와는 달리, EPOR/β_c 수용체는 이종복합체이고 (하기 참고), 흥분성 조직을 보호하는 역할을 하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, 각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 WO 2004/096148 및 2001년 12월 28일에 출원된, PCT 제 PCT/US01/49479호, 2000년 12월 29일에 출원된 미국 특허 출원 제 09/753,132호, 및 2002년 7월 3일에 출원된 10/188,905를 참고하라. 비록 출원인은 β_c 수용체가 상기 흥분성 조직의 조직 보호 경로에 중요함을 입증하였지만, 상기 수용체에 대한 활성화 리간드의 구조는 아직 공지되어 있지 않다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

3. 요약

[0010]

[0011] 본 발명은 반응성 세포, 조직, 또는 기관 중 하나 이상의 세포 보호 활성을 갖는 단리된 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 폴리펩티드는 공통 서열 (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (d) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임); 또는 (e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임)를 포함하는 아미노산 모티프를 포함하며, 여기서 H_1 및 H_2 는 소수성 아미노산이고, N_1 및 N_2 는 음전하의 아미노산이고, X 는 임의의 아미노산이고, L_1 은 극성 아미노산이며, P_1 은 양전하의 아미노산이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 펩티드는 또한 적혈구 조혈 활성이 결핍되며, 예를 들어, 수용자에 있어서 헤모글로빈 또는 적혈구 용적률을 증가시키지 않는다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 단리된 폴리펩티드는 10 개 이하, 15 개 이하, 20 개 이하, 또는 30 개 이하의 아미노산으로 이루어진다. 기타 실시양태에서, 단리된 펩티드는 서열 1 에 기재된 성숙한 인간 에리스로포이에틴 ("EPO")의 아미노산 서열의 임의의 부분과 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 또는 20% 미만의 서열 동일성을 갖고, 여기서 EPO의 상기 부분은 상기 펩티드와 동일한 개수의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0012]

단리된 폴리펩티드가 구조 모티프 (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임) (하기 기재된, 서열 식별자 6-11 각각에 의해 구현됨); (b) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임) (하기 기재된, 서열 식별자 24-25 각각에 의해 구현됨); 또는 (e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임) (하기 기재된, 서열 식별자 26-27 각각에 의해 구현됨)를 포함하는 상기 기재한 본 발명의 특정 실시양태에서, H_1 및 H_2 는 동일한 소수성 아미노산일 수 있다. 단리된 폴리펩티드가 구조 모티프 (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (d) $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임); 또는 (e) $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임)를 포함하는 상기 기재한 본 발명의 기타 실시양태에서, H_1 및 H_2 는 상이한 소수성 아미노산일 수 있다. 기타 실시양태에서, 본 발명은 아미노산 모티프 (a) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (b) $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임); (c) $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ (여기서, n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5임)을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 N_1 및 N_2 는 동일하거나 상이한 음전하의 아미노산일 수 있다.

[0013]

본 발명은 상기 기재한 아미노산 모티프를 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 모티프는 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열 내부의 연속적 아미노산에 의해 형성된다. 상기 실시양태에 따른 구체예에서, 본 발명은 아미노산 모티프 $H_1-N_1-N_2-H_2$ (서열 6), $H_1-N_1-X-N_2-H_2$ (서열 7), $H_1-N_1-X-X-N_2-H_2$ (서열 8), $H_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 9), $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 10), $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 11), $H_1-N_1-N_2-L_1$ (서열 12), $H_1-N_1-X-N_2-L_1$ (서열 13), $H_1-N_1-X-X-N_2-L_1$ (서열 14), $H_1-N_1-X-X-X-N_2-L_1$ (서열 15), $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-L_1$ (서열 16), $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-L_1$ (서열 17), $L_1-N_1-N_2-H_2$ (서열 18), $L_1-N_1-X-N_2-H_2$ (서열 19), $L_1-N_1-X-X-N_2-H_2$ (서열 20), $L_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 21), $L_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 22), $L_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$ (서열 23), $H_1-N_1-P_1-H_2$ (서열 24), $H_1-N_1-L_1-P_1-H_2$ (서열 25), $H_1-P_1-N_1-H_2$ (서열 26), 또는 $H_1-P_1-L_1-N_1-H_2$ (서열 27)를 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 H_1 및 H_2 는 소수성 아미노산이고, N_1 및 N_2 는 음전하의 아미노산이고, X 는 임의의 아미노산이고, L_1 은 극성 아미노산이며, P_1 은 양전하의 아미노산이다. 단리된 폴리펩티드가 아미노산 잔기 H_1 및 H_2 를 갖는 모티프를 포함하는, 상기 실시양태와 일치하는 특정 측면에서, H_1 및 H_2 는 동일하거나 상이한 소수성 아미노산일 수 있다. 단리된 폴리펩티드가 아미노산 잔기 N_1 및 N_2 를 갖는 모티프를 포함하는, 상기 실시양태와 일치하는 기타 측면에서, N_1 및 N_2 는 동일하거나 상이한 음전하의 아미노산일 수 있다.

[0014]

기타 실시양태에서, 본 발명은 아미노산 모티프가 폴리펩티드의 3차 구조 내부의 아미노산의 공간 조직으로 인하여 형성되는, 즉 모티프를 형성하는 아미노산이 폴리펩티드의 3차원 구조, 즉 3차 구조에서 서로에 대하여 공

간적으로 인접하나 폴리펩티드 사슬의 1차 아미노산 서열 내부의 1 개 이상의 아미노산에 의해 분리될 수 있는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 상기 실시양태에 따른 구체예에서, 상기 기재한, 서열 6과 유사성인 아미노산 잔기 H_1 , N_1 , N_2 및 H_2 를 포함하는 아미노산 모티프는, 즉, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 서열 10 또는 서열 11을 포함하는 펩티드의 단백질 접힘에 의해 채택된 3차 구조의 결과로서 형성될 수 있으며, 여기서 N_1 및 N_2 사이의 아미노산 잔기, 예를 들어, $(X)_n$ 은 N_1 및 N_2 가 직선으로 인접하도록 접힌다. 따라서, 본 발명은 아미노산 모티프 $H_1N_1N_2H_2$; $H_1N_1N_2L_1$; $L_1N_1N_2H_1$; $H_1N_1(L)_nP_1H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1임); 또는 $H_1P_1(L)_nN_1H_2$ (여기서, n 은 0 또는 1 임)를 포함하는 단리된 펩티드를 포함하며, 상기 모티프는 상기 폴리펩티드의 3차 구조의 결과로서 형성된다. 아미노산 모티프가 N_1 및 N_2 를 포함하는 관련 실시양태에서, 3차 구조는 N_1 및 N_2 의 카르보닐 탄소 간의 거리가 약 3 Å 내지 약 5 Å, 바람직하게는 약 4 Å 내지 약 5 Å, 더 바람직하게는 약 4.4 Å 내지 약 4.8 Å이 되도록 형성된다. 아미노산 모티프가 N_1 및 N_2 를 포함하는 기타 실시양태에서, 3차 구조는 N_1 및 N_2 간의 거리가 공간적으로 한정되어, 둘의 전하 분리, 예를 들어, 하전 측쇄가 약 6.5 Å 내지 약 9 Å이 되도록 형성된다. 관련 실시양태에서, N_1 및 N_2 는 따라서 알파 나선의 전부 또는 부분을 형성하는 아미노산 서열 내에 존재하는 결과로서 공간적으로 한정되고, 상기 나선을 형성하는 상기 아미노산의 서열 내에서 1, 2, 또는 2 개 초과 아미노산에 의해 분리될 수 있다. 아미노산 모티프가 N_1 및 P_1 을 포함하는 기타 관련 실시양태에서, 3차 구조는 N_1 및 P_1 의 카르보닐 탄소 간의 거리가 약 3 Å 내지 약 5 Å, 바람직하게는 약 4 Å 내지 약 5 Å, 더 바람직하게는 약 4.4 Å 내지 약 4.8 Å이 되도록 형성된다. 아미노산 모티프가 N_1 및 P_1 을 포함하는 기타 실시양태에서, 3차 구조는 N_1 및 P_1 간의 거리가 공간적으로 한정되어, 둘의 전하 분리, 예를 들어, 하전 측쇄가 약 6.5 Å 내지 약 9 Å이 되도록 형성된다. 관련 실시양태에서, N_1 및 P_1 은 알파 나선의 전부 또는 부분을 형성하는 아미노산 서열 내에 존재하는 결과로서 공간적으로 한정되고, 상기 나선을 형성하는 상기 아미노산의 서열 내에서 1, 2 또는 2 개 초과 아미노산에 의해 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 폴리펩티드의 3차 구조 내부의 모티프를 형성하는 아미노산은 상기 폴리펩티드의 선형 아미노산 서열 내의 동일 개수의 개재하는 아미노산 잔기에 의해 서로 분리된다. 더욱 다른 실시양태에서, 상기 폴리펩티드의 3차 구조 내부의 모티프를 형성하는 아미노산은 상기 폴리펩티드의 선형 아미노산 서열 내의 상이한 개수의 개재하는 아미노산 잔기에 의해 서로 분리된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 단리된 폴리펩티드는, 상기 구조의 표면이 아미노산을 포함하는 상기 모티프, 및 이에 따라 모티프 자체를 단백질 구조 및 수성 환경의 계면에 제공하고, 즉, 모티프를 접힌 폴리펩티드의 표면 상에 제공하도록, 규칙적 3차 구조, 예를 들어, α -나선 또는 β -병풍 구조를 형성한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드의 3차 구조는 생리적 조건의 수성 환경, 예를 들어 37°C의 PBS (13 mM의 NaH_2PO_4 , 137 mM의 NaCl, pH 7.4) 중 형성된다.

[0015] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 상기 기재한 아미노산 모티프를 포함하는 단리된 폴리펩티드, 예를 들어, 펩티드 A (APPRLICDSRVLYRYLLEAKEAE, 서열 32), 펩티드 C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, 서열 29), 펩티드 D (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, 서열 30), 펩티드 E (GCAEHCSSLNENITVPDTKVN, 서열 31), 펩티드 F (RYLLUNITGCG, 서열 33), 펩티드 G (QEQLERALNSS, 서열 40), 펩티드 I (CSLNENIQEQLERALNSS, 서열 43), 펩티드 J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, 서열 41), 펩티드 K (WEHVNAIQEARRLL, 서열 35), 또는 펩티드 L (KIRSDLTALTESYVKH, 서열 37)을 제공한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 1 개 이상, 2 개 이상, 3 개 이상, 4 개 이상, 5 개 이상, 6 개 이상, 또는 6 개 초과 아미노산 모티프를 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 단리된 폴리펩티드가 본원에서 상기 기재한 아미노산 모티프 중 2 개 이상을 포함하는 상기 실시양태에 따른 본 발명의 특정 측면에서, 상기 2 개 이상의 모티프는 동일한 모티프일 수 있거나 이들은 상이한 모티프일 수 있다.

[0017] 특정 측면에서, 본 발명은 적혈구 조혈 활성, 예를 들어, 수용자에 있어서 헤모글로빈의 증가가 결핍된 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드는 기타 활성, 예컨대 비제한적인 예로서, 혈관 활성 작용 (예를 들어, 혈관 수축), 혈소판 과다활성화, 전구-응고 활성 및 혈소판 및/또는 적혈구 조혈 의존 세포의 증식 및/또는 생성 자극이 결핍된다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Coleman 등, 2006, PNAS 103:5965-5970] 참고). 기타 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 세포 보호 활성을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 상기 세포 보호 활성의 비제한적인 예로서 반응성 포유동물 세포, 조직, 또는 기관의 기능 또는 생존력의 보호, 유지, 강화 또는 회복을 들 수 있다. 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 반응성 포유동물 세포 및 이의 결합 세포, 조직, 및 기관의 기능 또는 생존력의 보호, 유지, 강화, 또는 회복을 위한 약학 조성물의 제조를

위한 본원에 기재된 단리된 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다. 관련 실시양태에서, 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에 대한 투여용이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 대상체는 포유동물, 및 바람직하게는 인간이다.

[0018] 기타 측면에서, 본 발명은 반응성 조직 손상에 대한 보호 및/또는 이의 예방, 반응성 조직 및/또는 반응성 조직 기능의 회복, 또는 이의 재생을 위한 약학 조성물의 제조를 위한 본원에 기재된 단리된 폴리펩티드의 이를 필요로 하는 대상체에 있어서의 용도에 관한 것이다. 하나의 특정 측면에서, 반응성 포유동물 세포 및 이의 결합 세포, 조직 또는 기관은 치밀 내피 세포 장벽에 의해 혈관계에 대하여 떨어져 있다. 또다른 특정 측면에서, 세포, 조직, 기관 또는 기타 신체 부분은 포유동물의 신체, 예컨대 이식을 의도하는 곳으로부터 분리된다. 비제한적인 예로서, 반응성 세포 또는 조직은 신경, 눈 (예를 들어, 망막), 지방, 결합, 모발, 치아, 점막, 췌장, 내분비, 귀, 상피, 피부, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 장, 부신 (예를 들어, 부신 피질, 부신 수질), 모세관, 내피, 정소, 난소, 골, 피부, 또는 자궁내막 세포 또는 조직일 수 있다. 또한, 반응성 세포의 비제한적인 예로서 광수용체 (간상 및 원추), 신경절, 양극성, 수평, 무축삭, 뿔러, 푸르키니에, 심근, 박동 조율, 동방 결절, 동결절, 이음 조직, 방실 결절, 히스 속, 간세포, 별, 쿠퍼, 혈관사이, 신장 상피, 세뇨관 간질성, 배상, 창자선 (창자샘), 장 내분비, 사구, 군생, 망상, 크롬친화, 혈관주위세포, 라이디히, 세트플리, 정자, 성숙 난포, 원시 난포, 랑게르한스섬, α -세포, β -세포, γ -세포, F-세포, 골전구, 파골 세포, 골아 세포, 자궁내막 기질, 자궁 내막, 줄기 및 내피 세포를 들 수 있다. 반응성 세포의 상기 예는 단순히 예시적이다. 하나의 측면에서, 반응성 세포 또는 이의 결합 세포, 조직, 또는 기관은 흥분성 세포, 조직, 또는 기관이거나, 또는 흥분성 세포 또는 조직을 주성분으로 한다. 본 발명의 특정 측면에서, 흥분성 조직은 중추 신경계 조직, 말초 신경계 조직, 심장 조직 또는 망막 조직이다. 또다른 측면에서, 반응성 세포 또는 이의 결합 세포, 조직, 또는 기관은 흥분성 세포, 조직, 또는 기관이 아니며, 흥분성 세포 또는 조직을 주성분으로 하지 않는다.

[0019] 본 발명의 단리된 폴리펩티드의 반응성 세포에서의 적혈구 조혈 및/또는 세포 보호 활성은 본원에 기재되거나 종래 기술에 공지된 임의의 방법에 의해 평가 및/또는 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 적혈구 조혈 및/또는 세포 보호 활성은 시험관내 어세이로 측정된다. 기타 실시양태에서, 적혈구 조혈 및/또는 세포 보호 활성은 생체내 어세이로 측정된다. 세포 보호 활성이 신경 보호인 관련 실시양태에서, 본 발명은 (a) 1차 해마 신경세포의 시험 배양액을 N-메틸-D-아스파테이트 및 상기 펩티드와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 접촉 후 48 시간에 세포 생존력을 측정하는 단계 (단계 (b)에서 측정된 세포 생존력이 상기 펩티드가 부재하는 대조군 배양액의 것보다 큰 경우, 펩티드가 세포 보호 활성을 가짐)에 의해 상기 활성을 시험관내에서 평가하는 방법을 제공한다.

[0020] 특정 실시양태에서, 전술한 단리된 펩티드가 사용되는 포유동물 세포, 조직, 또는 기관은 세포, 조직, 또는 기관의 생존력에 반대하는 하나 이상의 상태 하에 시험 기간을 연장하였거나 연장할 세포, 조직, 또는 기관이다. 상기 실시양태에 따르면, 본 발명의 단리된 펩티드는 상기 상태가 발생하기 이전, 동안, 또는 이후에 상기 상태로부터 초래되는 조직 손상에 대한 보호 및/또는 이의 예방, 조직 및/또는 조직 기능의 회복, 또는 이의 재생을 이를 필요로 하는 대상체에 있어서 제공한다. 상기 상태는 외상성 제자리 저산소증 또는 대사 기능장애, 수술에 의해 유도된 제자리 저산소증 또는 대사 기능장애, 또는 제자리 독소 노출을 포함하며, 후자는 화학 요법 또는 방사선 요법과 관련된 것일 수 있다. 기타 실시양태에서, 본 발명의 단리된 펩티드는 상기 상태가 발생하기 이전, 동안, 또는 이후에 질환 또는 장애로부터 초래되는 조직 손상에 대한 보호 및/또는 이의 예방, 조직 및/또는 조직 기능의 회복, 또는 이의 재생을 이를 필요로 하는 대상체에 있어서 제공한다. 관련 실시양태에서, 상기 손상은 발작 장애, 다발성 경화증, 중풍, 저혈압, 심장 마비, 허혈, 심근 경색증, 염증, 노년기 인지 기능 상실, 방사선 손상, 소아마비, 신경변성 질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 미토콘드리아 질환, AIDS 치매, 기억 상실, 근위축성 측삭 경화증, 알콜 중독, 기분 장애, 불안 장애, 주의력 결핍 장애, 자폐증, 크로이츠펠트-야콥병, 뇌 또는 척수 외상 또는 허혈, 심폐 바이패스, 만성 심부전, 황반 변성, 당뇨병성 신경병증, 당뇨병성 망막 병증, 간염, 췌장염, 녹내장, 망막 허혈, 망막 외상, 심혈관 질환, 심폐 질환, 호흡기 질환, 신장 질환, 비뇨기계 질환, 생식기계 질환, 골 질환, 피부 질환, 결합 조직 질환, 위장 질환, 내분비 이상, 대사 이상, 또는 중추 또는 말초 신경계의 질환 또는 장애에 의해 야기된다. 더욱 다른 실시양태에서, 해로운 상태는 특정 수술 절차에 이용되는 심폐 바이패스 (심폐기)의 결과이다. 더욱 다른 실시양태에서, 상기 손상은 인지 기능장애이다. 특정 실시양태에서, 전술한 단리된 펩티드가 사용되는 포유동물 세포, 조직, 또는 기관은 β . 수용체를 발현한다.

[0021] 특정 실시양태에서, 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위한 전술한 단리된 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 실시양태에 따른 특정 측면에서, 본 발명의 약학 조성물은 약학적 허용 담체를 더 포함한다. 상기 약학 조성물은 경구, 비내, 눈, 흡입, 경피, 직장, 설하, 질, 또는 비경구 투여용으로, 또는 세포, 조직, 또는 기관의 생체의 생존력을 유지시키기 위한 관류 용액의 형태로 제형화될 수 있

다. 본 발명의 관련 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0022] 기타 측면에서, 본 발명은 상기 기재한 본 발명의 단리된 펩티드와 결합된, 내피 세포 장벽을 가로지르는 분자를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 분자의 트랜스사이토시스 (transcytosis)를 이를 필요로 하는 대상체에 있어서 촉진하는 방법을 제공한다. 관련 실시양태에서, 결합은 상기 분자에 대한 결합 부위와의 불안정한 공유 결합, 안정한 공유 결합, 또는 비-공유 결합이다.

[0023] 본 발명의 또다른 측면에 따르면, 상기 기재한 바와 같은 본 발명의 단리된 펩티드는 내피 세포 장벽을 가로지를 수 있다. 관련 실시양태에서, 내피 세포 장벽은 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-정소 장벽, 혈액-난소 장벽, 혈액-태반, 혈액-심장, 혈액-신장, 혈액-신경, 또는 혈액-척수 장벽을 포함한다.

[0024] 본 발명의 하나의 측면에 따르면, 본원에서 상기 기재한 바와 같은 단리된 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0025] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 본원에서 상기 기재한 바와 같은 본 발명의 단리된 폴리펩티드를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (즉, cDNA, 인트론에 의해 개재되거나, 또는 인트론에 의해 개재되지 않은 뉴클레오티드 서열)을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단리된 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 특정 숙주 세포 중 최적의 발현을 용이하게 하는 바람직한 코돈의 이용으로 합성된다. 상기 바람직한 코돈은 식물, 박테리아, 효모, 포유동물, 진균, 또는 곤충 종의 세포 중의 발현에 최적일 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 핵산 분자 및 핵산 분자에 작동적으로 결합된 하나 이상의 조절 부위를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 더욱 또다른 실시양태에서, 핵산 분자를 포함하는 유전자 조작 세포가 제공된다.

[0027] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 펩티드의 발현에 적절한 조건 하에, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 배지 중 배양하는 단계, 및 상기 배지로부터 발현된 폴리펩티드를 회수 및/또는 단리하는 단계를 포함하는, 본원에서 상기 기재한 바와 같은 본 발명의 단리된 펩티드를 재조합으로 제조하는 방법을 제공한다.

[0028] **3.1 용어**

[0029] 본원에서 사용시, 숫자와 관련되어 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 언급된 숫자의 1, 5, 또는 10% 이내의 임의의 숫자를 말한다.

[0030] 본 발명의 방법의 문맥에서 용어 "~와 관련된 투여"는 질환, 장애, 또는 상태의 발병 이전, 동시, 및/또는 이후에 화합물을 투여하는 것을 의미한다.

[0031] 용어 "아미노산" 또는 특정 아미노산에 대한 임의의 언급은 자연 발생 단백질 생성 (proteogenic) 아미노산 뿐만 아니라 비-자연 발생 아미노산, 예컨대 아미노산 유사체를 포함하기 위한 것이다. 당업자는 달리 명시적으로 언급하지 않는 한 상기 정의가 자연 발생 단백질 생성 (L)-아미노산, 이의 광학 (D)-이성질체, 아미노산 유사체를 비롯한 화학적으로 변형된 아미노산, 예컨대 페닐알라닌 (3-머캅토-D-발린), 자연 발생 비-단백질 생성 아미노산, 예컨대 노르류신 및 아미노산의 특징을 나타내는 종래 기술에 공지된 특성을 갖는 화학적으로 합성된 단백질을 포함한다는 점을 알 것이다. 본원에서 사용시, 아미노산은 하기와 같이 이의 3 글자의 두문자 또는 1 글자의 기호에 의해 나타내어질 것이다: 알라닌 = Ala 또는 A, 아르기닌 = Arg 또는 R, 아스파라긴 = Asn 또는 N, 아스파르트산 = Asp 또는 D, 시스테인 = Cys 또는 C, 글루타민산 = Glu 또는 E, 글루타민 = Gln 또는 Q, 글리신 = Gly 또는 G, 히스티딘 = His 또는 H, 이소류신 = Ile 또는 I, 류신 = Leu 또는 L, 리신 = Lys 또는 K, 메티오닌 = Met 또는 M, 페닐알라닌 = Phe 또는 F, 프롤린 = Pro 또는 P, 세린 = Ser 또는 S, 트레오닌 = Thr 또는 T, 트립토판 = Trp 또는 W, 티로신 = Tyr 또는 Y, 및 발린 = Val 또는 V. 추가로, 용어 "아미노산 등가물"은 자연 발생 아미노산의 구조로부터 벗어나 있으나, 실질적으로 아미노산의 구조를 가져서, 이는 펩티드 내부에서 치환될 수 있으며, 치환에도 불구하고 생물학적 활성을 보유하는 화합물을 말한다. 따라서, 예를 들어, 아미노산 등가물은 측쇄 변형 또는 치환을 갖는 아미노산을 포함할 수 있고, 또한 관련 유기산, 아미드 등도 포함할 수 있다. 용어 "아미노산"은 아미노산 등가물을 포함하기 위한 것이다. 용어 "잔기"는 아미노산 및 아미노산 등가물 모두를 말한다. 아미노산은 또한 종래 기술에 일반적으로 공지된 바와 같이 하기 군으로 분류될 수 있다: (1) 소수성 아미노산: His, Trp, Tyr, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala; (2) 중성 친수성 아미노산: Cys, Ser, Thr; (3) 극성 아미노산: Ser, Thr, Asn, Gln; (4) 산성/음전하의 아미노산: Asp, Glu; (5)

하전 아미노산: Asp, Glu, Arg, Lys, His; (6) 양전하의 아미노산: Arg, Lys, His; 및 (7) 염기성 아미노산: His, Lys, Arg.

- [0032] 본원에서 사용시, "흥분성 조직"은 흥분성 세포를 포함하는 조직을 말한다. 흥분성 세포는 전기 자극에 대하여 활발히 반응하고, 이의 세포막을 가로질러 전기 전하차를 갖는 세포이다. 흥분성 세포는 일반적으로 활동 전위를 가질 수 있다. 상기 세포는 전형적으로 막을 가로지르는 이온 (칼륨, 나트륨, 칼슘, 칼로라이드 등)의 흐름을 가능하게 하는 통로, 예컨대 전압 관문, 리간드 관문, 및 스트레치 (stretch) 통로를 발현한다. 흥분성 조직으로서 신경세포 조직, 근육 조직, 및 샘 조직을 들 수 있다. 흥분성 조직의 비제한적인 예로서 신경세포 조직, 예컨대 말초 신경계 (귀 및 망막) 및 중추 신경계 (뇌 및 척수)의 조직; 심혈관 조직, 예컨대 심장 세포 및 결합 신경; 및 샘 조직, 예컨대 세포-대-세포 간극 결합을 따른 T형 칼슘 통로가 인슐린의 분비에 참여하는 췌장을 들 수 있다. 흥분성 조직의 대표적 목록은 신경, 골격근, 평활근, 심근, 자궁, 중추 신경계, 척수, 뇌, 망막, 후각계, 청각계 등을 포함하는 기관 및 조직을 포함한다.
- [0033] 본원에서 사용시, 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 트랜스펙션된 특정 대상 세포 및 상기 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 말한다. 상기 세포의 자손은, 다음 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 숙주 세포 계통으로의 핵산 분자의 통합으로 인하여, 핵산 분자로 트랜스펙션된 모 세포와 동일하지 않을 수 있다.
- [0034] "단리된" 또는 "정제된" 폴리펩티드에는 단백질 또는 폴리펩티드가 유래하는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 기타 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적 합성되는 경우 화학적 전구체 또는 기타 화학 물질이 실질적으로 없다. 문구 "세포 물질이 실질적으로 없음"은 폴리펩티드가 그로부터 단리되거나 제조함으로써 제조되는 세포의 세포 성분으로부터 폴리펩티드가 분리된 폴리펩티드 체제를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 폴리펩티드는 이중 단백질 (본원에서 또한 "오염 단백질"로서도 일컬어짐)을 약 30%, 20%, 10%, 또는 5% (건조 중량 기준) 미만으로 갖는 폴리펩티드 체제를 포함한다. 폴리펩티드가 제조함으로써 제조되는 경우, 이에 대한 바람직하게는 배양 배지가 실질적으로 없고, 즉 배양 배지는 단백질 체제의 부피의 약 20%, 10%, 또는 5% 미만에 상당한다. 폴리펩티드가 화학적 합성에 의해 제조되는 경우, 이에 대한 바람직하게는 화학적 전구체 또는 기타 화학 물질이 실질적으로 없고, 즉 이는 단백질의 합성에 수반된 화학적 전구체 또는 기타 화학 물질로부터 분리된다. 따라서, 상기 폴리펩티드 체제는 관심을 갖는 항체 이외의 화학적 전구체 또는 화합물을 약 30%, 20%, 10%, 5% (건조 중량 기준) 미만으로 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 단리되거나 정제된다.
- [0035] "단리된" 핵산 분자는 핵산 분자의 자연 공급원 중 존재하는 기타 핵산 분자로부터 분리된 것이다. 더욱이, "단리된" 핵산 분자, 예컨대 cDNA 분자에는 제조합 기술에 의해 제조되는 경우 기타 세포 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없을 수 있거나, 또는 화학적으로 합성되는 경우 화학적 전구체 또는 기타 화학 물질이 실질적으로 없을 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자(들)는 단리되거나 정제된다.
- [0036] 폴리펩티드 내부의 구조에 대하여 본원에서 사용시, 용어 "모티프"는 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열 내부의 연속적 아미노산의 집합 및/또는 상기 폴리펩티드의 3차 구조 내부의 선형으로 인접한 아미노산의 집합을 말한다. 모티프는 단백질 접힘의 결과로서 전부 또는 부분적으로 형성될 수 있으므로, 기재된 모티프 내의 인접한 아미노산은 폴리펩티드의 선형 아미노산 서열 내부의 0 개, 1 개 이상, 5 개 이상, 10 개 이상, 15 개 이상 또는 20 개 이상의 아미노산에 의해 분리될 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용시, 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 혼용해서 사용하며 이는 그 광의에서 속박된 (즉, 예를 들어, 아미노산의 존재로서, β 회전 또는 β -병풍 구조를 시작하거나, 또는, 예를 들어, 이황화 결합된 Cys 잔기의 존재에 의해 고리화된 구조의 일부 성분을 가짐) 또는 속박되지 않은 (예를 들어, 선형) 아미노산 서열을 말한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 펩티드는 30 개 미만의 아미노산으로 이루어진다. 그러나, 본 개시내용을 읽으면, 당업자는 본 발명의 펩티드를 구별짓는 것은 특정 펩티드의 길이가 아니라 이것이 조직 보호 수용체 복합체와 결합하고/하거나 본원에 기재된 펩티드의 결합과 경쟁하는 능력임을 이해할 것이다. 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 또한 아미노산 등가물 또는 기타 비-아미노산기를 포함하나, 펩티드의 소정의 기능적 활성을 보유하는 화합물을 말한다. 펩티드 등가물은 하나 이상의 아미노산의 관련 유기산 (예컨대, PABA), 아미노산 등에 의한 대체 또는 측쇄 또는 관능기의 치환 또는 변형에 의해 통상의 펩티드로부터 상이할 수 있다.
- [0038] 용어 "질환, 장애, 또는 상태의 예방"은 상기 질환, 장애, 또는 상태의 발병을 지연시키고, 진행을 저지시키고,

발생을 저지시키고, 출현을 보호, 억제, 또는 제거시키거나, 또는 빈도를 감소시키는 것을 의미한다. 용어 "예방"의 사용은 예방 치료제가 투여된 환자군에 속하는 모든 환자가 예방의 표적이 되는 질환, 장애, 또는 상태를 결코 나타내지 않을 것임을 의미하기보다는, 환자군이 질환, 장애, 또는 상태의 빈도의 감소를 나타낼 것임을 의미하기 위한 것이다. 예를 들어, 다수의 인플루엔자 백신은 백신이 투여된 대상에서 인플루엔자를 예방하는데 있어서 100% 효과적이지 않다. 당업자는 예방 치료가 유용할 환자 및 상황, 예컨대 비제한적인 예로서, 외상 및 손상을 초래할 수 있는 활동에 참여하려고 하는 개인 (예를 들어, 군사 작전에 참여하는 군인, 경주용 자동차 운전자 등), 수술이 계획된 환자, 유전 질환, 장애, 또는 상태의 위험이 있는 환자, 환경적 인자에 의해 촉진된 질환, 장애, 또는 상태의 위험이 있는 환자, 또는 특정 질환, 장애, 또는 상태의 위험이 있는 일부 집단, 예컨대 노인, 유아, 또는 약화된 면역계를 갖는 대상, 또는 질환, 장애, 또는 상태에 대한 유전적 또는 기타 위험 인자를 갖는 환자를 쉽게 식별할 수 있다.

[0039] 본원에서 사용시, 용어 "대상체" 및 "환자"는 혼용해서 사용한다. 본원에서 사용시, 용어 "대상체" 및 "환자"는 동물, 바람직하게는 포유동물, 예컨대 비-영장류 (예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트, 및 마우스) 및 비-영장류 (예를 들어, 원숭이 또는 인간), 및 더 바람직하게는 인간을 말한다.

[0040] 본원에서 사용시, 용어 "조직 보호 활성" 또는 "조직 보호"는 세포, 조직, 또는 기관의 손상 또는 죽음을 억제하거나 지연하는 효과를 말한다. 달리 명시하지 않는 한, 세포, 조직 또는 기관의 손상 또는 죽음의 "지연"은 본 발명의 펩티드의 부재 하의 대조군 상태에 대하여 평가된다. 조직 보호 활성은 각종 상태, 질환, 및 세포, 기관, 및/또는 조직의 손상, 예를 들어, 항목 5.3에 기재된 것에 유용하다. 조직 보호 활성은 조직 보호 수용체 복합체를 발현하는 조직, 세포, 및/또는 기관 (즉, 반응성 조직, 세포, 및/또는 기관 각각), 예컨대 비제한적인 예로서, 중추 신경계의 조직에 특이적이다. 특정 실시양태에서, 반응성 세포는 적혈구 전구 세포가 아니다.

[0041] 본원에서 사용시, 용어 "조직 보호 수용체 복합체"는 하나 이상의 에리스로포이에틴 수용체 소단위 및 하나 이상의 베타 공동 수용체 소단위를 포함하는 복합체를 의미한다. 조직 보호 수용체 복합체는 복수개의 에리스로포이에틴 수용체 소단위 및/또는 베타 공동 수용체 소단위, 뿐만 아니라 기타 유형의 수용체 또는 단백질을 포함할 수 있다. 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 WO 2004/096148을 참고하라.

[0042] 2 개의 아미노산 서열의 백분율 동일성을 측정하기 위하여, 서열은 최적의 비교 목적을 위하여 배열된다. 그 후, 해당 아미노산 위치에서의 아미노산 잔기가 비교된다. 제 1 서열 내의 위치가 제 2 서열 내의 해당 위치에 서와 동일한 아미노산 잔기에 의해 차지되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 간의 백분율 동일성은 서열에 의해 공유된 동일 위치의 개수의 함수이다 (즉, % 동일성 = 동일한 중복 위치의 개수/위치의 총 개수 x 100%). 하나의 실시양태에서, 2 개의 서열은 동일한 길이이다. 대안적 실시양태에서, 서열은 상이한 길이이며, 따라서, 백분율 동일성은 더 짧은 서열의 더 긴 서열의 부분에 대한 비교를 말하며, 여기서 상기 부분은 상기 더 짧은 서열과 동일한 길이이다.

[0043] 에리스로포이에틴 ("EPO")의 적혈구 조혈 활성은 종래 기술에서 잘 특징지어져 있다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Cheetham 등, 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866] 참고). EPO는 개별 EPOR 소단위 상의 특정 위치 사이를 연결하는 방식으로 미리 형성된 에리스로포이에틴 수용체 (EPOR) 동중이합체 (즉, (EPOR)₂)의 세포외 부분에 결합함에 의해 적혈구 조혈을 개시한다. EPO가 (EPOR)₂에 결합될 때, 대부분의 구형 리간드는 결합 부위로부터 떨어져 있고, EPO 및 (EPOR)₂의 복합체로부터 떨어져서, 수성 매질로 외부로 향한다.

[0044] 본 출원인은 적혈구 조혈과는 대조적으로, 조직 보호가 또다른 수용체, CD 131 (β -공동 수용체 소단위 (β_c)로도 공지되어 있음)과 함께 EPOR 단량체로 이루어진, (EPOR)₂ 이외의 수용체를 통해 매개된다는 점을 측정하였다. EPOR 및 β_c 는 상호작용하여 수용체 이종이합체, EPOR- β_c 를 형성한다. 기타 단백질이 상기 상호작용에 수반되는지의 여부는 현재 공지되어 있지 않다. 본 발명은 EPO의 3차원 구조 유래, 및 특히, EPOR 결합 부위로부터 반대로 향하는, 즉 전형적, 적혈구 조혈 EPOR (EPOR)₂ 동중이합체와 상호작용하지 않는 EPO의 부분 유래의 조직 보호 펩티드를 개시한다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 전술한 조직 보호 펩티드는, 주로 신경 또는 정신 증상을 갖는 중추 신경계 또는 말초 신경계의 인간 질환 또는 장애, 안 질환, 심혈관 질환, 심폐 질환, 호흡기 질환, 신장, 비뇨기 및 생식기 질환, 골 질환, 피부

질환, 결합 조직 질환, 위장 질환 및 내분비 및 대사 이상의 예방, 치료 처치, 또는 예방 처치에 일반적으로 유용할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0046]

4. 도면의 간단한 설명

도 1은 펩티드 J (서열 41)의 효능을 조직 보호 분자 카르바밀화 EPO (CEPO)에 대하여 비교하기 위한 생체내 좌골 신경 손상 모델의 결과를 도시하며, 여기서 펩티드 J, 서열 41은 채장 폴리펩티드로부터의 양친매성 나선 (LRRYINMLTRP, 서열 28)과 결합된 EPO의 나선 B의 외향 아미노산 (즉, 펩티드 G, 서열 40)으로 이루어진 키메라 펩티드이다.

도 2는 생체내 좌골 신경 손상 모델로 시험시 본 발명의 펩티드의 조직 보호 효과를 도시한다. 어세이에서, 래트 (군당 n = 6)의 우 좌골 신경을 손상시키고, 동물에게 즉시 PBS, 또는 PBS를 함유하는 동일 몰 농도의 카르바밀화 EPO, EPO 펩티드 A (서열 32, 서열 1의 아미노산 1-23에 해당함), 펩티드 D (서열 30, 서열 1의 아미노산 58-82에 해당함), 또는 펩티드 G (서열 40)를 투여한다. 펩티드 G (서열 40)는 EPO 분자의 구 중심으로부터 친수성 환경으로 바깥쪽으로 향하는, 즉 폴리펩티드의 표면 상에 존재하는, EPO의 나선 B 내부의 아미노산 기재이다. 추가로, 또다른 수용체를 통하여 조직 보호성인 것으로 공지된 색소 상피성 인자의 부위로부터 구축된 20-mer를 음성 대조군으로서 포함하였다. 다음 4 일에 걸친 손상으로부터의 회복은 펩티드 G, 서열 40, 및 펩티드 D, 서열 30이 상기 생체내 모델 어세이에 있어서 카르바밀화 EPO (CEPO)와 동일하거나 이보다 더 양호한 조직 보호 효과를 나타낸다는 점을 증명한다.

도 3은 적혈구 조혈 활성에 대한 UT-7 어세이로 시험시, 적혈구 조혈 활성이 결핍된 것으로 공지된, 펩티드 D, 서열 30, 및 CEPO의 적혈구 조혈 효과를 도시한다. 시험관내 어세이의 결과는 펩티드 D, 서열 30이나 CEPO가 10,000 pM 이하의 투여량에서 적혈구 조혈 활성을 나타내지 않는다는 점을 증명한다.

도 4는 펩티드 F (서열 33, 서열 1의 아미노산 14-29에 해당함) 및 펩티드 G (서열 40)가 적혈구 조혈성인지 또는 EPO에 대한 중화 항체를 유도하는지의 여부를 측정하기 위한 생체내 어세이의 결과를 도시한다. 상기 결과는 130 일의 과정에 걸쳐 0.8 µg/kg, 3 일/주 로 피하 (s.c.) 투여시 어떠한 단백질도 래트 중 헤모글로빈의 수준을 증가시키지 않았다는 점을 증명한다. 또한, EPO의 투여와는 달리 어떠한 펩티드도 항체 반응을 유도하지 않는다.

도 5는 펩티드 D, 서열 30이 운동 신경세포를 카이네이트 유도의 죽음에 대하여 보호한다는 점을 증명하는 시험관내 연구 결과를 도시한다.

도 6은 0.1 ng/ml 및 1 ng/ml의 투여량에서, 펩티드 D, 서열 30이 P-19 세포를 혈청 부족과 관련된 아포토시스에 대하여 보호한다는 점을 도시한다.

도 7 a-b는 래트에 있어서 중간 대뇌 동맥 폐쇄 어세이의 결과를 도시한다. 도 7a는 4.4 µg/kg의 단회 투여량에서 펩티드 D (서열 30, 서열 1의 아미노산 58-82에 해당함)가 2 시간 간격으로 투여된 4.4 µg/kg의 4 회의 투여량만큼 강력하게 뇌 내의 경색 부피를 감소시킬 수 있음을 증명하는 그래프를 도시한다. 도 7b는 중간 대뇌 동맥 폐쇄에 의해 야기된 행동 결핍을 측정하는 풋 폴트 (foot fault) 어세이의 결과를 도시한다. 도 7b는 펩티드 D, 서열 30의 투여시, 단회 투여 일정 (1 x 4.4 µg/kg) 및 복수회 투여 일정 (4 x 4.4 µg/kg) 모두에서 래트가 행동 개선을 증명하였다는 점을 도시한다.

도 8 a-b는 당뇨병성 신경병증 어세이의 생체내 어세이의 결과를 도시한다. 스트렙토조토신을 사용하여 래트에 당뇨병을 유도한다. 유도된 당뇨병의 입증 후에, 래트에 펩티드 D, 서열 30, 또는 PBS를 2 주의 기간 동안 주당 5 회 4 µg/kg-bw의 투여량을 복막내 처치하였다. 래트의 신경 전도 속도 및 고온판 잠재기 모두를 관측하였다. 도 8a는 펩티드 D, 서열 30이 처치된 래트가 미처치된 래트와 비교시 개선된 전도 속도를 나타내었다는 점을 증명한다. 도 8b는 처치된 래트에 대한 고온판 잠재기는 미처치된 래트와 비교시 감소되었다는 점을 증명하며, 이는 전도 속도의 개선을 추가로 증명한다.

도 9 a-b는 EPO 나선 B 키메라를 사용한 시스플라틴 유도의 신경병증 및 신장병증의 치료 결과를 도시한다. 도 9a는 펩티드 G (서열 40, 나선 B 키메라)로 처치된 동물이 고온판 잠재기 어세이로 시험시 개선된 결과를 나타낸다는 점을 증명한다. 도 9b는 신장 기능의 척도인 소변 생성량이 펩티드 G (서열 40)로 처치된 동물에서 정상으로 유지되었다는 점을 증명한다.

도 10은 당뇨병성 망막병증과 관련된 망막 누출에 대한 펩티드 D (서열 30)의 효과를 도시한다. 도면은 펩티드 D (서열 30)가 처치된 동물에 있어서 망막 누출을 실질적으로 감소시킬 수 있었음을 증명한다.

도 11은 신장 허혈 재관류 모델에 대한 펩티드 F (서열 33) 또는 펩티드 G (서열 40)의 결과를 도시한다. 도면은 72 시간 이후 평가시 양쪽 펩티드가 60 분의 허혈 재관류 손상으로부터 발생하는 손상 점수를 감소시켰다는 점을 증명한다.

도 12는 펩티드 F (서열 33)의 투여가 마우스를 실험적 뇌 말라리아로부터 보호한다는 점을 예시한다.

도 13은 펩티드 E, 서열 31로 처치된 뮤린 EAE 모델에 있어서 임상 점수를 도시한다. 도 13은 실험적 자가면역 뇌척수염을 앓는 마우스에 있어서 신경 기능의 임상 과정을 도시한다. 4.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 펩티드 E를 매일 복막내 투여하였다. 펩티드 E의 투여는 대조군과 비교시 신경 기능을 유의하게 개선하였다. 임상 단계; 1, 이완된 꼬리; 2, 운동 실조 및/또는 뒷다리 부전 마비, 또는 느린 직립 반사; 3, 뒷다리 마비 및/또는 앞다리 부전 마비; 4, 앞다리 부전 마비; 5, 빈사 상태 또는 사망.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] **5. 발명의 상세한 설명**

[0048] **5.1 조직 보호 펩티드**

[0049] 에리스로포이에틴 ("EPO")의 적혈구 조혈 활성화는 종래 기술에서 잘 특징지어져 있다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Cheetham 등, 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866] 참고). EPO는 개별 EPOR 소단위 상의 특정 위치 사이를 연결하는 방식으로 미리 형성된 에리스로포이에틴 수용체 (EPOR) 동종이합체 (즉, (EPOR)₂)의 세포외 부분에 결합함에 의해 적혈구 조혈을 개시한다. EPO가 (EPOR)₂에 결합될 때, 대부분의 구형 리간드는 결합 부위로부터 떨어져 있고, EPO 및 (EPOR)₂의 복합체로부터 떨어져서, 수성 매질로 외부로 향한다. 본 출원인은 적혈구 조혈과는 대조적으로, 조직 보호가 또다른 수용체, CD 131 (β -공동 수용체 소단위 (β_c)로도 공지되어 있음)과 함께 EPOR 단량체로 이루어진, (EPOR)₂ 이외의 수용체를 통해 매개된다는 점을 측정하였다. EPOR 및 β_c 는 상호작용하여 수용체 이종이합체, EPOR- β_c 를 형성한다. 기타 단백질이 상기 상호작용에 수반되는지의 여부는 현재 공지되어 있지 않다. 본 발명은 EPO의 3차원 구조 유래, 및 특히, EPOR 결합 부위로부터 반대로 향하는, 즉 전형적, 적혈구 조혈 EPOR (EPOR)₂ 동종이합체와 상호작용하지 않는 EPO의 부분 유래의 조직 보호 펩티드를 개시한다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본 출원인은 EPO 분자의 상기 부분이 조직 보호 수용체와 상호작용하여 이에 따라 조직 보호를 매개한다고 여긴다.

[0050] EPO의 3차원 구조는 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Cheetham 등, 1998, Nat. Struct. Biol. 5: 861-866]에 기재된 바와 같이, 그리고 서열 1 (또한 국립 생명공학 정보 센터의 단백질 데이터뱅크에 표제 "IBUY"로서 기탁된 데이터로서도 이용가능함)에 제시된 바와 같이 받아들여진다. 상기 수용체에 결합시 EPOR 동종이합체의 막 근접 부위로부터 반대로 (즉, (EPOR)₂ 동종이합체가 세포 표면 상에서 발현시 세포막으로부터 반대로) 향하는 EPO 분자의 부분은 하기 2차 구조로 이루어진다: 루프 AB (서열 1의 아미노산 29-55에 해당함), 나선 B (서열 1의 아미노산 56-82에 해당함), 루프 BC (서열 1의 아미노산 83-92에 해당함) 및 루프 CD (서열 1의 아미노산 112-138에 해당함). 본 발명의 하나의 실시양태에서, 조직 보호 펩티드는 EPO 분자의 상기 별개의 구조에 해당하는 아미노산 서열로 이루어진다.

[0051] 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본 출원인은 조직 보호 수용체가 미리 형성되고, 즉 EPOR 및 β_c 단백질 소단위는 이것이 EPO와 상호작용 하기 이전에 기능적으로 결합된다고 여긴다. EPO는 1형 사이토카인 슈퍼패밀리의 구성원이다. 1형 사이토카인 슈퍼패밀리 분과의 구성원은, 소수적으로 상호작용하여 그 외부 표면이 수성 매질과 접하고 "외향"으로 일컬어지는 구형 단백질을 형성하는 4 개의 나선으로 특징지어진다. 예기치 못하게도, 본 출원인은 EPO 분자의 외향 부분 유래의 하나 초과 펩티드가 조직 보호성임을 측정하였다. 더 놀라운 발견은 EPO:(EPOR)₂ 복합체 내부에 묻힌 EPO 분자 부분 유래의 펩티드 및 적혈구 조혈 결합 부위 1 또는 2의 부분도 포함할 수 있는 펩티드도 조직 보호에 있어서 매우 강력하다는 점이다. 상기 발견을 설명하기 위하여, 출원인은 조직 보호 수용체의 성공적 활성화가 펩티드 리간드 내부의 적절한, 공간적 치밀 전하 배열구조로 인한 것임을 제시한다. 또한, 상기 치밀 전하 배열구조는 2 개의 별개의 구조 모티프에 의해 구현된다: (1) 서로에 대하여 인접하고, 소수성 아미노산의 측면에 위치하는 2 개의 음전하의 아미노산; 또

는 (2) 서로에 대하여 바로 인접하고, 단일 소수성 또는 극성 아미노산 잔기의 측면에 위치하는 양성 및 음성 (즉, 염기성 및 산성) 아미노산. 상기 전하의 접근은 펩티드 결합에 의해 부과된 선형 구조를 통해 일어날 수 있으며, 즉 상기 구조는 폴리펩티드 사슬 내의 연속적 아미노산에 의해 형성될 수 있거나, 또는 대안으로, 접근은 또한 단백질의 3차 구조, 즉 3차원 구조에 의해 부여된 EPO 분자 (또는 기타 관련된 1형 사이토카인 분자)의 상이한 부분 간의 공간적 관계를 통하여 일어날 수 있다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 출원인은, 일반적으로, 상기 요건은 조직 보호 펩티드가 하전 아미노산의 쌍 (즉, 2 개의 음전하의 아미노산 및 /또는 양성 및 음성 아미노산)의 요구되는 공간적 위치를 제공하는 별개의 3차 구조 (예를 들어, 나선 또는 병풍 구조)를 가질 것임을 나타내는 것으로 여긴다. 하나의 예외는 아미노산 쌍이 서로에 대하여 바로 인접하여 존재하고, 이때 요구되는 강도가 펩티드 주쇄에 의해 부여되는 선형 펩티드이다. 따라서, 구조 모티프 (1)은 아미노산 잔기의 선형 서열, 예를 들어, $H_1-N_1-N_1-H_2$ (서열 6), 또는 N_1 및 N_2 가 1, 2, 3, 4, 5, 6 개 이상의 개재되는 잔기에 의해 분리되는 아미노산 잔기의 선형 서열, 예를 들어, $H_1-N_1-X-X-X-X-N_1-H_2$ (서열 11)에 포함된다.

[0052] 조직 보호를 위하여, 하전 아미노산의 쌍은 카르보닐 탄소가 약 3 앙스트롬 (Å) 내지 약 5 Å 떨어져 있고, 바람직하게는 약 4 Å 내지 약 5 Å 떨어져 있으며, 더 바람직하게는 약 4.4 Å 내지 약 4.8 Å 떨어져 있도록 공간 배향되어야 한다. 이는 다수의 방법, 예를 들어, 단일 선형 펩티드에 있어서 인접한 하전 아미노산에 의해 달성될 수 있거나 (예를 들어, 실시예 2 및 표 1, 펩티드 G, 서열 40 참고), 또는 알파 나선을 형성할 수 있는 펩티드에 있어서, 개재되는 아미노산 잔기에 의해 분리된 하전 아미노산에 의해 달성될 수 있다 (예를 들어, 실시예 2 및 표 1, 펩티드 F, 서열 33 참고). 3차 구조 (예를 들어, 양친매성 펩티드에서의 알파 나선)는 또한 펩티드가 세포외-세포 표면 막 계면에서와 같이, 특정 미세환경 내부에 존재하는 경우 부여될 수 있음이 주목된다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Segrest, 1990, Proteins 8:103-117] 참고).

[0053] 또한, 조직 보호 활성은 하전 측쇄 (양성 및 음성 또는 2 개의 음성)가 공간적으로 서로 약 6.5 Å 내지 약 9 Å 이내로 한정된 하전 아미노산의 쌍을 포함하는 펩티드에 대하여 예측된다. 이는 알파 나선의 경우 1 또는 2 개의 아미노산에 의해 분리된 하전 쌍에 의해 제공될 수 있고, 이는 나선의 동일 측면 상의 얼마간의 전하에 요구되는 약 6.5 Å 내지 약 9 Å의 분리를 제공할 것이다. 상기 펩티드의 비제한적인 예는 펩티드 F (실시예 2, 표 1, 서열 33 참고)에서 발견된다. 당업자는 하전 아미노산의 적절한 3차원 위치를 얻도록 일반적으로 요구되는 펩티드에 대한 3차 구조, 뿐만 아니라 펩티드 내부의 전하 분리를 모방하는 소 분자의 디자인을 고안할 수 있다.

[0054] 임의의 아미노산의 카르바밀 탄소 간 또는 임의의 2 개의 아미노산의 측쇄 간의 공간 거리는 종래 기술에 공지되어 있거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 추론될 수 있다. 예를 들어, 단백질의 3차원 구조가 공지되어 있는 경우, 상기 단백질의 관심을 갖는 부분 내부의 2 개의 측쇄의 전하 분리 또는 2 개의 카르바밀 탄소 간의 공간 거리는 상기 관심을 갖는 부분 내의 아미노산 잔기의 공개되거나, 또는 종래 기술에서 받아들여진, 3차원 좌표에 기초하여 계산될 수 있다. 단백질, 및 따라서 관심을 갖는 부분의 3차원 구조가 공지되어 있지 않거나, 또는 그 3차원 구조가 공지되어 있지 않은 완전 합성 펩티드가 본원의 교시에 기초하여 구축되는 경우, 상기 펩티드 내부의 2 개의 측쇄의 전하 분리 또는 2 개의 카르바밀 탄소 간의 공간 거리는 종래 기술에 공지된 바와 같은 단백질 모델링 소프트웨어에 의해 예측된 3차원 구조의 이용으로 측정될 수 있다. 상기 소프트웨어의 비제한적인 예는 케미컬 컴퓨팅 그룹 (Chemical Computing Group) (캐나다, 퀘벡)에 의한 MOE™ 및 액셀리스 (Accelrys) (캘리포니아, 샌디에이고)에 의한 Modeler이다. 유사하게 상기 기재한 회사로부터 마찬가지로 이용 가능한 상기 예측 소프트웨어는 또한 소 분자의 디자인에 대하여 종래 기술에서 공지되어 있고, 따라서, 당업자는, 본원의 교시에 기초하여, 개시된 구조 모티프와 경쟁하는 소 분자를 제조할 수 있다.

[0055] 아미노산의 선형 서열을 통해 본원에서 상기 기재한 필수적 공간 접근을 모방하는 비-자연 발생 또는 키메라 펩티드가 고안될 수 있다. 본 발명은, 따라서, 조직 보호를 유발하는 상기 구조 펩티드를 나타내는 것을 비롯한, 신규한 조직 보호 펩티드에 관한 것이다.

[0056] 본 발명은 또한 기타 1형 사이토카인의 조직 보호 단편, 예컨대 비제한적인 예로서, EPO의 상기 기재한 외부에 존재하는 아미노산 서열과 구조적으로 상동성이고/이거나 상기 기재한 구조 모티프를 포함하는, 과립구 대식구-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터루킨-3 (IL-3), 트롬보포이에틴 (TPO), 섬모 향신경성 인자 (CNTF) 및 백혈병 억제 인자 (LIF)의 용도에 관한 것이다.

[0057] 또한, 조직 보호 펩티드는 비-인접 구조 성분 및 오로지 아미노산을 제공하는 표면을 결합하는 상기 기재한 구조 모티프 기재의 키메라 화합물일 수 있다. 특히, 본 출원인은 상기 기재한 서열에 대한 양친매성 펩티드 나

선의 첨가가 펩티드의 효능을 증가시킴을 측정하였다.

[0058] 추가로, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 상기 기재한 펩티드 중 2 개 이상, 또는 특정 운반을 위한 관련 또는 비 관련 거대분자, 예컨대 자연 EPO, 인슐린 또는 렙틴의 조합으로부터 발생하는 융합 펩티드를 포함한다.

[0059] **5.1.1 단편**

[0060] **A. EPO 유래의 펩티드 단편**

[0061] 본 발명은 하나의 실시양태에서 EPO 단백질의 3차원 구조 유래이고, 특히, EPOR 동중이합체의 리간드 결합 부위 및/또는 내부 부분으로부터 반대로 향하는 EPO의 부위 유래의, EPO의 아미노산 서열의 단편으로 이루어진 신규한 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 상기 단편은 하기 EPO 구조 유래이다: (1) 나선 B의 루프 AB 및 N-말단 부분 (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, 서열 29, 서열 1의 아미노산 38-57에 해당함); (2) 나선 B의 C-말단 부분 (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, 서열 30, 서열 1의 아미노산 58-82에 해당함), 및 (3) 작은 시스테인 루프 및 β-병풍 구조로 이루어진 A-B 루프의 부분 (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, 서열 31, 서열 1의 아미노산 28-47에 해당함). 상기 펩티드 단편은 모두 실시예 2 (도 1 및 표 1 참고)에서 조직 보호 특성을 나타내는 것으로 증명된다.

[0062] 예기치 못하게도, 묻혀진 EPO 분자의 기타 부위 유래의 일부 펩티드 및 (EPOR)₂에 대한 결합 부위의 부분을 포함하는 기타 펩티드도 조직 보호성이다. 예를 들어, EPOR 결합 부위 2의 부분 (밑줄처짐)을 포함하는 나선 A의 N-말단 부분 으로 이루어진 펩티드 (APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE, 서열 32, 서열 1의 아미노산 1-23에 해당함)는 조직 보호성이다 (실시예 2 및 표 1 참고). 그러나, 부위 2 아미노산의 존재는 조직 보호 활성을 설명하지 못하는데, 왜냐하면 서열 1의 아미노산 14-19 (RYLLEAKEAENITGTC, 서열 33)로 이루어지고 서열 1의 아미노산 11-13 (즉, VLE; EPO의 EPOR 이합체, (EPOR)₂에 대한 결합에 요구되는 부위 2 아미노산)이 결핍된 펩티드도 조직 보호성이기 때문이다 (실시예 2 및 표 1, 또한 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Elliott 등, 1997, Blood 89:493] 참고). 출원인은 적혈구 조혈을 파괴하는 적혈구 조혈 결합 부위 내부의 돌연변이가 EPO의 조직 보호 특성을 변형시키지 않는다는 점을 앞서 보여주었다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Leist 등 Science (2004) 305:239]).

[0063] 당업자는 다양한 길이의 단편이 조직 보호 펩티드를 형성할 수 있으나, 단편은 바람직하게는 그 길이가 30 개의 아미노산 미만임을 이해할 것이다. 또한, 포함시키기 위해 현명하게 선택된 기타 분자, 예를 들어, D-아미노산 또는 폴리에틸렌 글리콜도 조직 보호 펩티드를 구성할 것이나, 생물학적 반감기를 증진시킬 것이다.

[0064] **A. 구조 모티프**

[0065] 구체적으로, 하기 구조 모티프가 조직 보호 수용체 복합체를 유발하는 것으로 식별되었다:

[0066] (a) 음전하의 배열구조 ("구조 모티프 A")

[0067] 본 구조 모티프에 있어서, 펩티드는 5 개 이하의 아미노산에 의해 분리될 수 있고, 소수성 아미노산의 측면에 위치하는, 2 개의 음전하의 아미노산을 갖는다. 구조적으로 이는 하기와 같이 표시될 수 있다:

[0068] (a1) HNNH;

[0069] (a2) HNXNH;

[0070] (a3) HNXXNH;

[0071] (a4) HNXXXNH;

[0072] (a5) HNXXXXNH; 또는

[0073] (a6) HNXXXXXNH,

[0074] 여기서, H는 소수성 아미노산 (예를 들어, 중간 소수성인 아미노산: 글리신, 프롤린, 시스테인, 티로신, 및 트립토판, 및 바람직하게는 고도로 소수성인 아미노산: 알라닌, 발린, 이소류신, 메티오닌, 류신, 페닐알라닌)을 나타내고, N은 음전하의 아미노산, 예컨대 글루타메이트 또는 아스파테이트를 나타내며, X는 임의의 아미노산을 나타내나, 바람직하게는 소수성의 것을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 인접 소수성 아미노산은 동일하다. 기타 실시양태에서, 인접 아미노산은 상이하다.

[0075] 상기 구조 모티프의 별형은 인접 소수성 아미노산 중 하나가 극성 아미노산, 예컨대 세린, 트레오닌, 아스파라

긴, 또는 글루타민으로 대체된 펩티드를 포함한다.

[0076] 선형 서열 내의 2 개의 음전하의 상호 접근을 확립하는 펩티드 결합에 대한 대안으로서, 필요한 전하 접근은 또한 본원에서 상기 (항목 5.1)에 기재한 바와 같이 3차원 구조에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 음전하의 아미노산은 나선의 외부 표면 상에서 공간적으로 바로 인접할 수 있으나, 선형 펩티드 서열 내의 추가의 아미노산에 의해 분리될 것이다. 예를 들어, EPO의 나선 A (서열 1의 아미노산 10-28에 해당함)에 있어서, E18 및 E21은 3차원 구조 상에서 인접하나, 선형 펩티드 서열 내에서 이들 간에 개재하는 2 개의 아미노산을 갖는다. 추가의 예로서, 나선 B (펩티드 D, 서열 30; 서열 1의 아미노산 58-82에 해당함)에 있어서, E62 및 E72는 나선의 표면 상의 2 개의 아미노산 (Q65 및 L69)에 의해 분리되나, 선형 펩티드 내부에서 이들 간에 9 개의 아미노산을 갖는다. 나선 A 또는 나선 B로부터 구축된 펩티드는 조직 보호성이다 (하기 실시예 2 및 표 1 참고). 이와 달리, 적절한 거리에 2 개의 음전하 (밀줄처짐)를 지나 인접 소수성 아미노산이 결합된 펩티드인 펩티드 B (NITTGCAEHC~~SLNE~~, 서열 34)는 조직 보호성이 아니다 (하기 실시예 2 및 표 1 참고).

[0077] (b) 음성/양성 아미노산의 배열구조 ("구조 모티프 B")

[0078] 본 구조 모티프에서, 펩티드는 음성 아미노산 옆에 양성 아미노산을 가지며, 양쪽 하전 아미노산은 단일 소수성 아미노산의 측면에 위치한다. 구조적으로 이는 하기와 같이 표시될 수 있다:

[0079] (b1) HNP~~H~~; 또는

[0080] (b2) HPN~~H~~.

[0081] 여기서, P는 양전하의 아미노산, 예컨대 아르기닌, 리신 또는 히스티딘을 나타내고 N은 음전하의 아미노산, 글루탐이트 또는 아스파테이트를 나타낸다. 제 1 모티프에 있어서, 2 개의 반대 전하의 상호 접근은 3차원 구조에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 양전하 및 음전하의 아미노산은 나선의 표면 상에서 공간적으로 인접할 수 있으나, 선형 펩티드 서열 내에서 하나 이상의 아미노산에 의해 분리될 것이다. 예를 들어, 나선 B (서열 1의 아미노산 58-82에 해당함)에 있어서, E72 및 R76은 나선의 외부 표면 상에서 서로 바로 인접하며, 상기 나선으로부터 구축된 펩티드는 조직 보호성이다 (실시예 2 및 표 1 참고).

[0082] 상기 특정 모티프의 변형에서, 음성 및 양성 아미노산은 극성 아미노산에 의해 분리될 수 있으며, 예를 들어, 하기와 같다:

[0083] (b3) HNLPH;

[0084] (b4) HPLNH,

[0085] 여기서, L은 극성 아미노산, 예컨대 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 또는 글루타민을 나타낸다. 상기 모티프의 예는 조직 보호성인 펩티드 E (GCAEHC~~SLNENITV~~PD~~TKVN~~, 서열 34) (실시예 2 및 표 1 참고)이다.

[0086] 상기 구조 모티프의 핵이 4 개의 아미노산 길이라는 점에서, 상기 핵 구조 모티프의 펩티드는 조직 보호 수용체를 유발할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 1 개의 구조 모티프를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 1 개 초과, 2 개 초과, 3 개 초과 또는 4 개 초과 구조 모티프를 포함한다. 폴리펩티드가 2 개 이상의 구조 모티프를 포함하는 특정 실시양태에서, 모티프는 동일하다. 폴리펩티드가 2 개 이상의 구조 모티프를 포함하는 대안적 실시양태에서, 모티프는 상이하다. 바람직하게는, 당업자가 생성할 수 있는 본 발명의 복수개의 모티프는 30 개 미만의 아미노산 길이이다.

[0087] 당업자는 본 발명에 중요한 것은 EPO의 실제 아미노산 서열과 대조되는, 상기 기재한 구조 모티프라는 점을 이해할 것이다. 따라서, 당업자는 단리된 펩티드가 서열 1에 기재된 성숙한 인간 에리스로포이에틴 ("EPO")의 아미노산 서열의 임의의 부분과 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 또는 20% 미만의 서열 동일성을 가질 것이고, 여기서 상기 EPO의 부분은 상기 펩티드와 동일 개수의 아미노산 잔기를 포함함을 이해할 것이다.

[0088] 추가로, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 O'Brien 등의 미국 특허 제5,700,909호는 NS20Y, SK-N-MC, 및 PC12 세포에 있어서 발아, 분화, 신경 보호, 및 신경세포사의 예방을 비롯한 생물학적 기능을 유도하는 EPO의 17 개 아미노산의 펩티드 서열 (O'Brien의 서열 11)을 개시한다. 비록 적혈구 조혈 활성을 갖는 것으로 예측된다고 개시되었지만, O'Brien의 서열 11 (epo 펩티드 AB로 지칭됨)은 실제로 상기 적혈구 조혈 활성이 결핍되며, 이어서 생체내 활성이 결핍되는 것으로 발견되었다. epo 펩티드 AB가 마우스의 근육 내에 주사되는 경우, 인접 근육에서 발생하는 운동 중환의 빈도는 섬모 향신경성 인자에 의해 유도되는 것과 유사한 방식으로 증가하였다.

상기 데이터는 신경 (혈액작용성이 아닌) 세포가 EPO 내부의 펩티드 서열에 반응하고 EPO가 향신경성 및 항혈액 활성화에 대한 별개의 도메인을 가질 수 있다는 개념 내에 있는 것으로 해석된다 ([Campana 등, Int. J. Mol. Med. (1998) 1(1):235-241]; 1997년 12월 23일에 발행된 J.S. O'Brien의 미국 특허 제 5,700,909호; 1996년 11월 5일에 발행된 J.S. O'Brien의 미국 특허 제 5,571,787호; 1998년 2월 3일에 발행된 J.S. O'Brien의 미국 특허 제 5,714,459호; 및 1997년 12월 9일에 발행된 J.S. O'Brien 및 Y. Kashimoto의 미국 특허 제 5,696,080호). 그러나, O'Brien은 펩티드의 3차 구조 내의 하전 아미노산의 접근에 기초한 본 구조 모티프를 식별하지 않았다.

[0089] **C. 1형 사이토카인 단편**

[0090] 공간적 치밀 전하 배열구조가 조직 보호 수용체를 활성화할 수 있다는 점에서, 출원인은 1형 사이토카인의 특정 단편이 조직 보호 수용체와 교차 반응할 것으로 예측된다는 점을 발견하였다. 상기 사이토카인 패밀리의 비제한적인 예로서 인터루킨 (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, 과립구 대식구-콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 렙틴, 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 섬모 향신경성 인자 (CNTF), 트롬보포이에틴 (TPO), 성장 호르몬, 대식구 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 에리스로포이에틴 (EPO) 및 프로락틴을 들 수 있다.

[0091] EPO의 2차 구조에 대한 고려는 기타 1형 사이토카인 수용체 리간드 내부의 상동성 2차 구조 내부에 위치한 상동성 아미노산 유래의 아미노산의 공간 배열을 통한 후보 조직 보호 펩티드의 제조에 대한 지침을 제공한다: 예를 들어, GM-CSF 및 IL-3 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Kannan, 2000, Neuroimmunomod. 8:132-141]) 등은, 주로, 출원인이 믿기에는, 조직 보호 수용체를 자극함에 의해 강력한 향신경성 및 신경 보호 활성을 갖는 것으로 보여졌다. 예를 들어, 상기 1형 사이토카인의 나선 B를 고려하면: 트롬보포이에틴 (TPO; 단백질 데이터뱅크 (PDB) 등록 1V7M) 중 상동성 아미노산은 D62, G65, T68, L69, E72, A76 및 Q80을 포함하고, 여기서 상기 아미노산은 선형 배열로 서로 공간적으로 인접하고; 백혈병 억제 인자 (LIF; PDB 등록 1EMR) 중 상동성 아미노산은 E61, R64, Y68, S72, N75, 및 D79를 포함하고; 섬모 향신경성 인자 (CNTF; PDB 등록 1CNT) 중 상동성 아미노산은 E71, E75를 포함한다. 상기 모두는 상기 (항목 5.1.1)에 기재한 모티프 A의 예이고, 여기서 밑줄 친 아미노산은 음전하이다.

[0092] 본원에서 상기 (항목 5.1.1)에 기재한 구조 모티프 B를 대표하는 1형 사이토카인 유래의 펩티드의 비제한적인 예로서 GM-CSF 나선 A 단편, WEHVNAIQEARRLL (서열 35); TPO 나선 A 단편, LSKLLRDSHVLH (서열 36); TPO 나선 B 단편: E56, K59; CNTF 나선 A 단편, KIRSDLTALTESYVKH (서열 37); CNTF 나선 B 단편: R89, E92; LIF 나선 B 단편, GTEKAKLVELYRIVVYL (서열 38); 및 인터루킨 3 (IL-3) 나선 A 단편 SIMIDEIHHLKRPNPL (서열 39)을 들 수 있다.

[0093] 상기 전술한 아미노산은 1형 사이토카인 수용체를 통해 신호 전달하는 사이토카인 슈퍼패밀리의 일부 구성원으로부터 단지 대표되는 것이고, 사이토카인 슈퍼패밀리의 기타 구성원에 대한 상동성 부위가 당업자에 의해 쉽게 식별될 것이다.

[0094] **5.1.2 키메라**

[0095] "키메라" 조직 보호 펩티드 -- EPO 분자의 외향 아미노산의 비선형 구조 성분을 도입하는 선형 아미노산 서열은 상기 기재한 구조 모티프를 나타냄 -- 가 또한 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명의 키메라 조직 보호 펩티드는 분리된 아미노산 서열의 구조 성분을 단일 펩티드에 결합시키는 것으로 이루어질 수 있다. 다시 말해, 키메라 조직 보호 펩티드는 비선형이지만 인접한 구조 성분 유래의 아미노산 서열, 예컨대 서열 1의 아미노산 서열 110-115, 133-136, 및 160-165 유래의 단편으로 이루어질 수 있고, 이는 나선 C의 C 말단 부분 및 루프 C-D의 N-말단 부분, 루프 C-D의 β-병풍 구조, 및 EPO의 C-말단 부분의 구조 성분이 단일 펩티드에 포함되는 것을 가능하게 한다. 추가로, 키메라 조직 보호 펩티드는 특정 구조의 중요한 특징, 예를 들어, 특정 3차 구조의 외향 아미노산을 선별하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 키메라 조직 보호 펩티드는 나선 B의 아미노산 58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84, 및 85 (예를 들어, 펩티드 G, QEQLERALNSS, 서열 40), 또는, 다시 말해 EPO의 나선 B의 외부에 존재하는 아미노산 전부로 이루어진 단편으로 이루어질 수 있다. 상기 펩티드는 하기 실시예 2 (표 1 참고)에서 조직 보호성인 것으로 보여진다.

[0096] 더욱이, 본 조직 보호 펩티드의 효능은 양친매성 펩티드 나선을 부착시킴에 의해 증가될 수 있다. 양친매성 펩티드 나선은, 예를 들어, 펩티드 리간드를 세포막에 국소화시키는 기능을 하는, 클래스 B G-단백질 커플링된 수용체를 통해 신호 전달하는 펩티드로부터 종래 기술에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고

로 인용하는 [Segrest 등, 1990, Proteins 8:103]). 상기 나선의 비제한적인 예로서 칼시토닌 (ALSILVLLQAGS, 서열 48); 부신피질 자극 호르몬 방출 호르몬 (VALLPCPPCRA, 서열 49); 베타 엔도르핀 (NAIKNAYKKG, 서열 50); 글루카곤 (GSWQRSLQDTE, 서열 51); 세크레틴 (GGSARPAPP, 서열 52); 혈관장 (vasointestinal) 폴리펩티드 (NALAENDTPYY, 서열 53); 신경펩티드 Y (GALAEAYPSKP, 서열 54); 성선 자극 호르몬 방출 호르몬 (GCSSQHSYGL, 서열 55); 부갑상선 호르몬 (VMIVMLAICFL, 서열 56); 췌장 폴리펩티드 (LRRYINMLTRP, 서열 28); 및 칼시토닌 유전자 관련 펩티드 (LALSILVLYQA, 서열 57)로부터의 고도로 소수성인 부위를 들 수 있다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Grace 등, 2004, PNAS 101:12836]에 개시되어 있음). 예를 들어, 키메라 펩티드는 키메라 펩티드에 대한 췌장 폴리펩티드 (LRRYINMLTRP, 서열 28)의 양친매성 나선에 대한 카르복시 말단에 결합된 EPO의 나선 B의 표면 전하 모티프를 갖는 펩티드 (QEQLERALNSS, 서열 40)로부터 제조된다. 양친매성 나선의 조직 보호 특성에 영향을 미치지 않고 이의 카르복시 말단에 추가의 변형을 가할 수 있다. 따라서, 상기 키메라 펩티드의 말단 프롤린을 서열 TR (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, 서열 41)로 대체하는 추가의 예는 좌골 신경 어세이에서 증명되는 바와 같이 강력한 조직 보호 활성을 갖는 분자를 생성한다 (도 1 참고).

[0097] 추가로, 상기 기재한 나선 대신, 기타 3차 구조가 조직 보호 펩티드에 부착될 수 있다. 예를 들어, 나선 B의 외부에 존재하는 아미노산은 EPO의 AB 루프 내부에서 발견되는 베타 병풍 구조 (CSLNENI, 서열 42)와 결합되어 조직 보호성인 서열 CSLNENIQEQLERALNSS (서열 43)을 갖는 키메라 펩티드를 형성할 수 있다 (실시예 2 및 표 1 참고). 추가로, 나선 C의 말단 부분에 존재하는 아미노산 (ALGKA, 서열 44, 서열 1의 아미노산 111, 112, 113, 116, 및 118에 해당함)은 루프 CD-부분 (LGAQKEAISPPDAASAAPLRTI, 서열 45, 서열 1의 아미노산 112-133에 해당함)의 전부 또는 일부와 결합될 수 있다. 바람직하게는, 유연성을 제공하도록 융합 펩티드 간에 결합 암 (arm)이 존재하여, 결합된 펩티드가 적절한 구조 배향을 취하여 조직 보호 수용체 복합체와 결합될 수 있도록 할 것이다. 상기 융합 펩티드는 상승 효과를 가질 수 있어서, 가능하게는 조직 보호 수용체 복합체와의 강화된 결합 또는 증가된 생물학적 반감기를 통하여, 개별적인 것과는 대조적으로, 공동으로 더 큰 조직 보호 효과를 얻을 수 있다.

[0098] 당업자는 상기 화합물의 조직 보호 효과를 최대화하기 위하여 각종 소정의 구조 성분을 단일 펩티드에 결합시키는 이점을 이해할 것이다. 상기 키메라는 아미노산 펩티드, 및 비-아미노산 성분, 예컨대 링커 또는 가교 원자 또는 부분을 포함할 수 있다.

[0099] **5.1.3 융합 펩티드**

[0100] 본 발명은 또한 상기 기재한 조직 보호 펩티드, 유도된 단편 또는 키메라 중 2 종 이상이 관련 또는 비관련 단백질, 예컨대 에리스로포이에틴, 알부민 등에 결합될 수 있음을 고려한다.

[0101] **5.1.4 조직 보호 펩티드의 제조**

[0102] 본 발명의 조직 보호 펩티드는 종래 기술에 잘 공지된 재조합 또는 합성 기술의 이용으로 제조될 수 있다. 특히, 고체상 단백질 합성은 상대적으로 짧은 길이의 조직 보호 펩티드에 적절하고, 더 일관적인 결과로 더 큰 수율을 제공할 수 있다. 추가로, 고체상 단백질 합성은 조직 보호 펩티드의 제조에 대하여 추가의 융통성을 제공할 수 있다. 예를 들어, 소정의 화학적 변형이 합성 단계에서 조직 보호 펩티드에 도입될 수 있고; 호모시트룰린이 리신과 대조적으로 펩티드의 합성에 사용되어, 이에 따라 합성 이후 펩티드를 카르바미화할 필요성을 없앤다.

[0103] **합성**

[0104] 펩티드의 고체상 합성에 있어서, α-아미노기 및 측쇄 보호 모두를 갖는 아미노산이 수지 상에 고정된다. 예를 들어, [Nilsson, B., Soellner, M., 및 Raines, R. Chemical Synthesis of Proteins, *Annu. Rev. Biomol Struct.* 2005. 34:91-118]; [Meldal M. 1997. Properties of solid supports. *Methods Enzymol.* 289:83-104] 및 [Songster MF, Barany G. 1997. Handles for solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289:126-74]을 참고하라. 전형적으로, 2 가지 유형의 α-아미노 보호기가 사용된다: 산 민감성 tert-부톡시카르보닐 (Boc) 기 또는 염기 민감성 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐 (Fmoc) 기 [Wellings DA, Atherton E. 1997. Standard Fmoc protocols. *Methods Enzymol.* 289:44-67]. 상기 α-아미노 보호기의 빠르고 완전한 제거 이후, 활성화된 카르복실기를 갖는 또다른 보호된 아미노산이 그 후 보호되지 않은 수지 결합 아민에 커플링된다. 과량의 활성화된 가용성 아미노산을 사용함에 의해, 커플링 반응이 완결되게 한다. 탈보호 및 커플링의 주기를 반복하여 서열을 완성한다. 측쇄 탈보호 및 절단에 의해, 수지는 소정의 펩티드를 제공한다 [Guy CA, Fields GB. 1997. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis

by Fmoc chemistry. *Methods Enzymol.* 289:67-83], 및 [Stewart JM. 1997. Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289:29-44]. 고체상 단백질 합성을 수행하는 추가의 방법은 [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. 등 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science.* 266:776-779]; [Kochendoerfer 등 2003. Design and Chemical Synthesis of a Homogenous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein. *Science.* 299:884-887]에 개시되어 있다 (본 단락에서 인용된 각각의 참고 문헌은 본원에서 그 전문을 참고로 인용함).

[0105] 필요에 따라, 고체상 펩티드 합성으로부터 유도된 더 작은 펩티드를 펩티드 결합, 예컨대 자연 화학적 결합을 통해 결합시킬 수 있다. 상기 과정에서, 하나의 펩티드의 N-말단 시스테인 잔기의 티올레이트가 두번째 펩티드의 C-말단 티오에스테르를 공격하여 트랜스티오에스테르화에 영향을 미친다. 신속한 S → N 아실 전달 이후 아미드 결합이 형성된다. 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Dawson, P. 등 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science.* 266:776-779]을 참고하라.

[0106] 또한, 당업자는 본 발명의 조직 보호 펩티드가 펩티드 유사체, 자연 발생 및 비-자연 발생 아미노산 모두를 포함하는 펩티드, 예컨대 펩토이드 (peptoid)를 포함할 수 있다는 점을 이해할 것이다. 펩토이드는 N-치환된 글리신, 글리코콜산, 티오프로닌, 사르코신, 및 티오판의 올리고머이다. 상기 구조는 화학식 $-(C=O)-CH_2-NR-$ 을 갖는 경향이 있고, 여기서 R 기는 측쇄로서 작용한다. 상기 펩토이드는, 각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Simon 등, Peptoids: A molecular approach to drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:9367-9371 (1992)] 및 [Li 등, Photolithographic Synthesis of Peptoids, *J. AM. CHEM. SOC.* 2004, 126, 4088-4089]의 프로토콜에 따라 고체상 합성의 이용으로 합성될 수 있다. 추가로, 본 발명은 주형 펩티드와 유사한 특성을 갖는 비-펩티드 약물인 펩티드 유사체의 용도를 고려한다 (본원에서 참고로 인용하는 [Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29]; [Veber 및 Friedinger (1985) *TINS* p.32]; 및 [Evans 등 (1987) *J. Med. Chem* 30:1229]). 각종 유형의 펩티드 유사체의 합성은, 예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics - Workbench Edition Volume E22c (Editor-in-Chief Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, New York)]에 개관되어 있다.

[0107] 제조합 기술

[0108] 각종 숙주 발현 벡터 시스템을 이용하여 본 발명의 조직 보호 펩티드를 제조할 수 있다. 상기 숙주 발현 시스템은 관심을 갖는 조직 보호 펩티드가 그에 의해 제조되고 이어서 정제될 수 있는 비히클을 대표하나, 이는 또한, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 트랜스펙션되는 경우, 변형된 에리스로포이에틴 유전자 생성물을 제자리에서 나타낼 수 있는 세포도 대표한다. 이의 비제한적인 예로서 박테리아, 곤충, 식물, 포유동물, 예컨대 인간 숙주 시스템, 예컨대 비제한적인 예로서, 조직 보호 펩티드 코딩 서열을 포함하는 제조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 배칼로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 제조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 에리스로포이에틴 관련 분자 코딩 서열을 포함하는 제조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈 유래의 프로모터, 예를 들어, 금속티오네인 프로모터, 또는 포유동물 바이러스 유래의 프로모터, 예를 들어, 아데노바이러스 후기 (late) 프로모터를 포함하는 포유동물 세포 시스템, 예컨대 인간 세포 시스템, 예를 들어, HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 함유 제조합 발현 구조체; 우두 바이러스 7.5K 프로모터를 들 수 있다.

[0109] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 유전자 생성물을 소정의 특정 양식으로 변형하거나 조작하는 숙주 세포 균주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 상기 변형 및 조작은 단백질의 기능에 중요할 것이다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 조작 및 변형에 대하여 특이적 메커니즘을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택하여 발현된 외래 단백질의 올바른 변형 및 조작을 보장할 수 있다. 이를 위하여, 1차 전사체의 적절한 조작, 유전자 생성물의 글리코실화, 및 인산화를 위한 세포 기계를 갖는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 상기 포유동물 숙주 세포, 예컨대 인간 숙주 세포의 비제한적인 예로서 HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, 및 WI38을 들 수 있다.

[0110] 제조합 펩티드의 장기간, 고수율의 제조를 위하여, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 제조합 조직 보호 사이토카인 관련 분자의 유전자 생성물을 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 바이러스 유래의 복제

를 포함하는 발현 벡터를 사용하기보다는, 적절한 발현 제어 요소, 예를 들어, 프로모터, 증진 인자, 서열, 전사 종결 인자, 폴리아데닐화 부위 등, 및 선택적 마커에 의해 제어된 DNA에 의해 숙주 세포를 형질전환할 수 있다. 외래 DNA의 도입 이후, 조작된 세포를 보강 배지 중 1 ~ 2 일 동안 성장하도록 할 수 있고, 그 후 선택 배지로 교환된다. 재조합 플라스미드 중 선택적 마커는 선택에 대한 저항성을 부여하고, 세포로 하여금 플라스미드를 이의 염색체에 안정적으로 통합하게 하고 성장하여 포커스 (foci)를 형성하게 하며 이는 이어서 세포주로 클로닝되고 확장될 수 있다. 상기 방법을 유리하게 이용하여 조직 보호 생성물을 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 상기 조작된 세포주는 EPO 관련 분자 유전자 생성물의 내인성 활성화에 영향을 미치는 화합물의 선별 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0111] 추가의 변형

[0112] 추가의 변형이 조직 보호 펩티드에 가해질 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 하나 이상의 (D)-아미노산으로 합성될 수 있다. 본 발명의 펩티드에 (L)- 또는 (D)-아미노산을 포함시키는 선택은, 부분적으로, 펩티드의 소정의 특징에 의존한다. 예를 들어, 1종 이상의 (D)-아미노산의 도입은 시험관내 또는 생체내에서 펩티드에 안정성 증가를 부여할 수 있다. 1종 이상의 (D)-아미노산의 도입은 또한, 예를 들어, 본원에 기재된 바이오어세이, 또는 종래 기술에 잘 공지된 기타 방법을 이용하여 측정시, 펩티드의 결합 활성을 증가시키거나 감소시킬 수 있다.

[0113] (L)-아미노산 서열의 전부 또는 일부를 거울상체 (D)-아미노산의 각 서열로 대체하는 것은 폴리펩티드 사슬의 각 부분에 광학 이성질체 구조를 제공한다. (L)-아미노산 서열의 모든 또는 일부 서열의 역위는 펩티드의 레트로-유사체 (retro-analogue)를 제공한다. 거울상체 (L에서 D로, 또는 D에서 L로) 대체 및 서열 역위의 조합은 펩티드의 레트로-인버소-유사체 (retro-inverso-analogue)를 제공한다. 이성질체 펩티드, 이의 레트로-유사체, 및 이의 레트로-인버소-유사체는 모 펩티드에 대하여 유의한 위상 관계를 유지하며, 특히 고도의 유사성이 종종 모 및 이의 레트로-인버소-유사체에 대하여 얻어진다는 점이 당업자에게 공지되어 있다. 상기 관계 및 유사성은 펩티드의 생화학적 특성, 특히 수용체 단백질에 대한 각 펩티드 및 유사체의 고도의 결합에 반영될 수 있다. 펩티드의 상기 특성의 레트로-인버소-유사체의 합성은, 예를 들어, [Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics - Workbench Edition Volume E22c (Editor-in-chief Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, New York)], 및 이에 인용된 참고 문헌에 기재되어 있으며, 상기 모두는 본원에서 그 전문을 참고로 인용한다.

[0114] 아미노산 "변형"은 자연 발생 아미노산을 변화시켜 비-자연 발생 아미노산을 생성하는 것을 말한다. 비-자연 발생 아미노산을 갖는 본 발명의 펩티드의 유도체는, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, 1989 Science, 244:182-188]에 기재된 바와 같이, 생합성 동안 비-자연 아미노산을 폴리펩티드로 부위 특이적으로 도입함에 의해 또는 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다.

[0115] 치료적으로 유용한 펩티드와 구조적으로 유사한 펩티드 유사체가 사용되어 동등한 치료 또는 예방 효과를 제공할 수 있다. 일반적으로, 펩티드 유사체는 페르다임 폴리펩티드 (즉, 생화학적 특성 또는 약리 활성을 갖는 폴리펩티드)와 구조적으로 유사하나, 종래 기술에 공지되어 있고, 각각을 본원에서 참고로 인용하는 하기 문헌: [Spatola, A.F. in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins," B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p 267 (1983)]; [Spatola, A.F., Vega Data (March 1983), Vol. 1. Issue 3, "Peptide Backbone Modifications"] (일반적 개관); [Morely, J.S., Trends Pharma Sci (1980) pp. 463-468] (일반적 개관); [Hudson, D. 등, (1979) Int J Pept Prot Re 14: 177-185 (--CH₂-NH--, --CH₂-CH₂--)]; [Spatola, A.F. 등, (1986) Life Sci 38:1243-1249 (--CH₂-S)]; [Hann, M. M., (1982) J Chem Soc Perkin Trans I 307-314 (--CH=CH--, 시스 및 트랜스)]; [Almquist, R.G. 등, (1980) J Med Chem 23: 1392 (--COCH₂--)]; [Jennings- White, C 등, (1982) Tetrahedron Lett 23:2533 (--COCH₂--)]; [Szelke, M 등, European Appln. EP 45665 (1982) CA:97:39405 (1982) (--CH(OH)CH₂--)]; [Holladay, M.W. 등, (1983) Tetrahedron Lett 24:4401-4404 (--C(OH)CH₂--)]; 및 [Hruby, V.J., (1982) Life Sci 31:189-199 (--CH₂-S--)]에 추가로 기재된 방법에 의해, --CH₂-NH--, --CH₂S--, -CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (시스 및 트랜스), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, 및 --CH₂SO--로 이루어진 군 중에서 선택되는 결합에 의해 임의로 대체된 하나 이상의 펩티드 결합을 가진다.

- [0116] 또다른 실시양태에서, 특히 바람직한 비-펩티드 결합은 $-CH_2NH-$ 이다. 상기 펩티드 유사체는 폴리펩티드 실시양태에 비하여 유의한 이점, 예를 들어: 더 경제적 제조, 더 큰 화학적 안정성, 강화된 약리적 특성 (반감기, 흡수성, 효과, 효능 등), 변화된 특이성 (예를 들어, 넓은 범위의 생물학적 활성), 감소된 항원성 등을 가질 수 있다.
- [0117] 펩티드 유사체에 대한 각종 고안이 가능하다. 예를 들어, 필요한 입체형태가 비-펩티드에 의해 안정화되는 환형 펩티드가 특히 고려되고, 본원에서 모두 참고로 인용하는 Lobl 등의 미국 특허 제 5,192,746호, Aversa 등의 미국 특허 제 5,576,423호, Shashoua의 미국 특허 제 5,051,448호, 및 Gaeta 등의 미국 특허 제 5,559,103호는 상기 화합물을 생성하는 여러 방법을 기재한다. 펩티드 서열을 모방하는 비-펩티드 화합물의 합성도 종래 기술에 공지되어 있다. 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Eldred 등, J. Med. Chem. 37:3882 (1994)]은 펩티드 서열을 모방하는 비-펩티드 안타고니스트를 기재한다. 마찬가지로, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Ku 등, J. Med. Chem 38:9 (1995)]은 일련의 상기 화합물의 합성을 더 설명한다.
- [0118] 합성 이후 추가의 변형이 수행될 수 있다. 예를 들어, 조직 보호 펩티드에는 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는, 2003년 4월 17일에 20030072737-A1로서 공개되고, 화학적으로 변형된 EPO를 개시하는 미국 특허 출원 제 10/188,905호에 따라, 그리고 2003년 7월 1일에 출원된 미국 특허 출원 제 10/612,665호, 및 2000년 12월 29일에 출원된 미국 특허 출원 제 09/753,132호에 따라 추가의 화학적 변형, 즉 카르바미화, 아세틸화, 석시닐화 등이 수행될 수 있다.
- [0119] 추가로, 조직 보호 펩티드는 재조합 조직 보호 펩티드 -- 뮤테인으로 이루어질 수 있다. 개시되어 있는 돌연변이로서 치환, 결손 (예컨대, 내부 결손), 첨가 (예컨대, 융합 펩티드를 제공하는 첨가), 또는 아미노산 서열 내부 및/또는 이에 인접한 아미노산 잔기의 보존성 치환을 들 수 있으나, 이는 반응성 세포, 조직, 및 기관의 보호, 회복, 및 강화를 위한 재조합 조직 보호 사이토카인 및 이를 코딩하는 핵산이라는 제목의 PCT/US03/20964 (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에서 앞서 개시된 바와 같이, "침묵적" 변화, 및 비-보존성 아미노산 변화 및 더 큰 삽입 및 결손을 야기한다.
- [0120] 보존성 또는 비-보존성 아미노산 치환이 1종 이상의 아미노산 잔기에 수행될 수 있다. 보존성 및 비-보존성 치환 모두가 수행될 수 있다. 보존성 대체는 이의 측쇄에 있어서 관련된 아미노산의 패밀리 내부에서 일어나는 것이다. 유전자 코딩된 아미노산은 하기 4 가지 패밀리로 분류될 수 있다: (1) 산성 = 아스파테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성 (소수성) = 시스테인, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판, 글리신, 티로신; 및 (4) 비하전 극성 = 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌. 비-극성은 하기로 세분될 수 있다: 강한 소수성 = 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌 및 중간 소수성 = 글리신, 프롤린, 시스테인, 티로신, 트립토판. 대안적 양식으로, 아미노산 레퍼토리는 하기로 분류될 수 있다: (1) 산성 = 아스파테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 = 리신, 아르기닌, 히스티딘, (3) 지방족 = 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 세린, 트레오닌 (여기서 세린 및 트레오닌은 임의로 지방족-히드록실로서 따로 분류됨); (4) 방향족 = 페닐알라닌, 티로신, 트립토판; (5) 아미드 = 아스파라긴, 글루타민; 및 (6) 황 함유 = 시스테인 및 메티오닌 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [L. Stryer, Biochemistry, 4th ed., WH Freeman and Co., 1995] 참고).
- [0121] 대안으로, 돌연변이는, 예컨대 포화 돌연변이 유발에 의해 조직 보호 펩티드의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 생성되는 돌연변이체를 생물학적 활성에 대하여 선별하여 활성을 보유하는 돌연변이체를 식별할 수 있다. 돌연변이 유발 이후, 코딩된 펩티드는 무작위로 발현될 수 있고 재조합 조직 보호 펩티드의 활성이 측정될 수 있다.
- [0122] 또다른 실시양태에서, 조직 보호 펩티드의 반감기를 연장하거나 또는 펩티드의 조직 보호 효과를 강화시키기 위한 노력으로, 중합체 (예컨대, 폴리에틸렌 글리콜), 당, 또는 추가의 단백질 (예컨대, 융합 구조체)의 첨가를 통해 조직 보호 펩티드를 더 변형할 수 있다. 상기 변형의 예는 본원에서 참고로 인용하는 WO/04022577 A3 및 WO/05025606 A1에 개시되어 있다.
- [0123] **5.2 조직 보호 펩티드의 시험을 위한 어세이**
- [0124] **5.2.1 생물학적 선별 또는 어세이**
- [0125] 본 발명에 따른 조직 보호 펩티드를 조직 보호 활성, 예를 들어, 세포, 조직 또는 기관의 보호에 대하여 시험할 수 있다. 시험관내 및 생체내 어세이를 이용하여 보호 활성을 더 시험할 수 있다. 조직 보호 활성을 지시하는 시험관내 시험으로서, 예를 들어, 세포 증식 어세이, 세포 분화 어세이, 또는 조직 보호 수용체 복합체, 예를

들어, 조직 보호 사이토카인 수용체 복합체의 활성화에 의해 상향조절된 단백질 또는 핵산, 예를 들어, 뉴클레올린 (nucleolin), 신경글로빈, 사이토글로빈, 또는 프라탁신 (frataxin)의 존재의 검출을 들 수 있다. 신경글로빈은, 예를 들어, 산소의 운반 또는 장기간 저장을 용이하게 하는 데 수반될 수 있다. 따라서, 산소 운반 또는 저장 어세이는 조직 보호 활성을 조절하는 화합물을 식별하거나 선별하기 위한 어세이로서 이용될 수 있다.

[0126] 신경글로빈은 저산소증 또는 허혈에 반응하여 중추 신경계의 세포 및 조직 중 발현되고, 손상으로부터의 보호를 제공할 수 있다 (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Sun 등 2001, PNAS 98:15306-15311]; [Schmid 등, 2003, J. Biol. Chem. 276:1932-1935]). 사이토글로빈은 보호에 있어서 유사한 역할을 수행할 수 있으나, 각종 조직 중 다양한 수준으로 발현된다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Pesce 등, 2002, EMBO 3:1146-1151]). 본 발명의 하나의 실시양태에서, 세포 중 상향조절된 단백질의 수준은 조직 보호 펩티드가 세포에 접촉되기 이전 및 이후에 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포 중 조직 보호 활성화와 연관되어 상향조절된 단백질의 존재를 이용하여 펩티드의 조직 보호 활성을 확인할 수 있다.

[0127] 뉴클레올린은 세포를 손상으로부터 보호할 수 있다. 이는 전사 과정, 서열 특이적 RNA 결합 단백질, 세포질 분열, 핵 생성, 신호 전달, T-세포에 의해 유도된 아포토시스, 크로마틴 리모델링, 또는 복제의 조절을 비롯하여 세포 중 수많은 역할을 한다. 이는 또한 세포 표면 수용체 DNA/RNA 헬리카제, DNA 의존적 ATPase, 단백질 셔틀, 전사 인자 성분, 또는 전사 억제 인자로서 기능할 수 있다 (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Srivastava 및 Pollard, 1999, FASEB J., 13:1911-1922]; 및 [Ginisty 등, 1999, J. Cell Sci., 112:761-772]).

[0128] 프라탁신은 미토콘드리아의 철 대사에 수반되는 단백질이고, 생체내 및 시험관내 모두에서 EPO에 의해 강하게 상향조절되는 것으로 앞서 밝혀졌다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Sturm 등 (2005) Eur J Clin Invest 35:711])

[0129] 상향조절된 단백질의 발현은 세포 중 단백질에 해당하는 mRNA 수준을 검출함에 의해 검출될 수 있다. mRNA는 상향조절된 단백질을 코딩하는 핵산에 특이적으로 결합되는 프로브에 하이브리드 형성될 수 있다. 하이브리드 형성은, 예를 들어, 노던 블롯, 서던 블롯, 어레이 하이브리드 형성, 친화성 크로마토그래피, 제자리 하이브리드 형성으로 이루어질 수 있다.

[0130] 본 발명의 폴리펩티드의 조직 보호 활성화는 또한 시험관내 신경 보호 어세이의 이용으로 검출될 수 있다. 예를 들어, 1차 신경세포 배양액을 트립신 처리에 의해 새로 태어난 래트 해마로부터 준비하고, 예를 들어, MEM-II 성장 배지 (인비트로젠, Invitrogen), 20 mM의 D-글루코오스, 2 mM의 L-글루타민, 10%의 Nu-혈청 (소; 뉴저지주, 프란클린 레이크스 소재의 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson)), 2%의 B27 보충제 (인비트로젠), 26.2 mM의 NaHCO₃, 100 U/ml의 페니실린, 및 1 mg/ml의 스트렙타미딘 중 종래 기술에 공지되어 있고/있거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 배양할 수 있다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Leist 등, 2004, Science 305:239-242] 참고). 부착 후 1 일째, 1 μM의 사이토신아라비노-푸라노사이드를 첨가한다. 그 후, 13 일된 배양액을 EPO 또는 CEPO의 투여량을 증가시키면서 (3 ~ 3000 pM) 24 시간 동안 예비 향온배양한다. 14 일째, 배지를 제거하고 배양액에 실온에서 PBS 중 300 μM의 NMDA를 투여한다. 5 분 후, 예비 상태조절된 배지를 배양액으로 반환한 후 이를 향온배양기에 24 시간 동안 도로 둔다. 세포를 파라포름알데히드 중 고정시키고, Hoechst 33342 (오리건주, 유진 소재의 몰리큘러 프로브 (Molecular Probes))에 의해 염색하여, 농축된 아포토시스 핵을 계수할 수 있다. NGF (50 ng/ml) 및 MK801 (1 μM)을 음성 대조군으로서 포함시킨다.

[0131] 동물 모델 시스템을 이용하여 화합물의 조직 보호 활성을 증명하거나 상기 기재한 본 발명의 선별 방법에 의해 식별된 화합물의 안정성 및 효능을 증명할 수 있다. 그 후, 동물 모델을 이용하여 어세이에서 식별된 화합물을 관심을 갖는 조직 손상, 질환, 상태, 또는 증후군의 유형에 대한 생물학적 활성화에 대하여 시험할 수 있다. 이는 기능 판독 시스템에 커플링된 조직 보호 수용체 복합체를 포함하도록 조작된 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스를 포함한다.

[0132] 식별된 화합물의 세포 또는 조직 보호 활성화의 효능을 시험하기 위하여 이용될 수 있는 동물 모델은, 예를 들어, 루이스 (Lewis) 래트 중 급성 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE; 실시예 12 참고)의 발병에 대한 보호, 뇌 외상, 뇌 경색 ("중풍"; 실시예 5) 또는 흥분독소에 의해 자극된 발작이 부여된 후 마우스에 있어서 감소된 인지 기능으로부터의 복구 또는 보호 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Brines 등, 2000, PNAS, 97:10295-10672]), 유도된 망막 허혈로부터의 보호 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Rosenbaum 등, 1997, Vis. Res. 37:3443-51]), 좌골 신경에 대한 손상으로부터의 보호 (실시예 2 참고), 및 심장에 대한 허혈-재관류 손상으로부터의 보호 (시험관내 심근 연구 및 생체내 허혈-재관류 손상, 예를 들어, 각각의 전문을 본원에서 참고로

인용하는 [Calvillo 등, 2003, PNAS 100:4802-4806] 및 [Fiordaliso 등, 2005, PNAS 102:2046-2051] 참고)를 포함한다. 상기 어세이는 각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Grasso 등 (2004) Med Sci Monit 10: BR1-3] 또는 PCT 공보 제 W002/053580호에 더 상세히 설명되어 있다. 이에 기재된 생체내 방법은 EPO의 투여에 대한 것이나, EPO 대신 투여된 조직 보호 단백질도 유사한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 식별되었다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Leist 등 (2004) Science 305:239-242]). 펩티드는 또한 시험을 위해 치환될 수 있다. 펩티드의 조직 보호 활성을 측정하기 위한 기타 어세이는 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0133] **5.2.2 세포 결합 어세이**

[0134] 대안으로, 본 발명의 폴리펩티드의 평가를 위하여 세포 결합 어세이가 수행될 수 있다. 예를 들어, 관심을 갖는 조직 보호 펩티드를 검출의 용이함을 위해 바이오마커, 예컨대 형광 또는 방사성 표지된 마커에 결합시키고, EPOR 및/또는 β_2 수용체를 발현하는 트랜스펙션된 BaF3 세포에 대한 결합을 시험할 수 있다. 96 웰 플레이트에, 성장 배지 (RPMI 1640, 10%의 소 태아 혈청, 1 mM의 나트륨 피루베이트, 2 mM의 L-글루타민) 중 관심을 갖는 조직 보호 펩티드의 8 개의 1:2의 일련의 희석액을, 각 웰 중 최종 부피가 약 100 μ l가 되도록 평판 배양한다. BaF3 모 세포주 및 EPOR 및/또는 β_2 수용체로 트랜스펙션된 BaF3 세포를 성장 배지 (상기 참고) 중 3 회 세척하고, 펠렛을 성장 배지에 재현탁시키며, 세포를 계수하고 성장 배지에 5,000 세포/100 μ l까지 희석시킬 수 있다. 그 후, 100 μ l의 희석된 세포를 각 펩티드 희석액에 첨가한다. 그 후, 어세이 평판을 37°C의 항온배양기 내에서 3 내지 4 일 동안 항온배양한다. 그 후, 평판/세포를 세척하고, 형광 평판 판독기 상에서 또는 기타 적절한 방법에 의해 평판을 판독하여 관심을 갖는 조직 보호 펩티드의 생물학적 활성과 관련된 바이오마커의 수준을 검출한다.

[0135] 유사하게, 결합 어세이를 이용하여 조직 보호 펩티드가 조직 보호성인 지를 측정할 수 있다. 결합 어세이에서, 조직 보호성인 것으로 공지된 화합물, 예컨대 비제한적인 예로서, 미국 특허 출원 제 10/188,905호 및 10/185,841호 (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용함)에 개시된 것과 같은 조직 보호 사이토카인을 적절한 바이오마커에 부착할 수 있다.

[0136] 96 웰 플레이트에, 적절한 성장 배지 중 공지된 조직 보호 화합물/바이오마커의 8 개의 1:2의 일련의 희석액, 및 공지된 조직 보호 화합물/바이오마커 및 과량의 관심을 갖는 조직 보호 펩티드의 동일한 일련의 희석액을 평판 배양한다. 각 희석액의 최종 부피는 약 100 μ l가 되어야 한다. 다시, BaF3 세포를 상기 개시한 바와 같이 평판에 부착하고 항온배양되게 한다. 적절한 시간 이후, 세포를 세척하고, 형광 평판 판독기 상에서 또는 종래 기술에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 평판을 판독하여 바이오마커를 검출한다. 공지된 조직 보호 화합물/바이오마커 및 관심을 갖는 조직 보호 펩티드를 포함하는 평판 및/또는 웰의 판독 결과가 오로지 공지된 조직 보호 화합물/바이오마커만을 포함하는 평판의 판독 결과 미만인 경우, 관심을 갖는 조직 보호 펩티드는 조직 보호성이다.

[0137] **5.2.3 사이토카인 및 세포 증식/분화 활성**

[0138] 현재까지 발견된 다수의 단백질 인자, 예컨대 모든 공지된 사이토카인은 하나 이상의 인자 의존적 세포 증식 어세이에서 활성을 보여주었고, 따라서 상기 어세이는 사이토카인 활성을 편리하게 확인하는 기능을 한다. 조직 보호 펩티드의 활성은 세포주, 예컨대 비제한적인 예로서, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e 및 CMK에 대한 수많은 일상적 인자 의존적 세포 증식 어세이 중 임의의 것에 의해 증명될 수 있다. 상기 세포를 조직 보호 펩티드의 존재 또는 부재 하에 배양하고, 예를 들어, 삼중수소 티미딘의 도입을 측정함에 의해 또는 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT)의 대사 파괴에 기초한 비색 어세이에 의해 세포 증식을 검출한다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Mosman, 1983, J. Immunol. Meth. 65:55-63]).

[0139] **5.2.4 기타 어세이**

[0140] 조직 보호 펩티드가 조직 보호 활성을 나타내는 경우, 당업자는 당업자에게 공지된 신경 보호 및 조직 보호 펩티드 어세이, 예컨대 비제한적인 예로서, P-19 및 PC-12 세포 어세이 중 하나를 이용한 결과를 증명하는 것이 유용할 것임을 이해할 것이다. 추가로, 각종 생체내 모델, 예컨대 척수 손상, 뇌졸중, 말초 신경 손상, 심장, 눈, 신장 등과 관련된 동물 모델이 조직 보호 펩티드를 더 특징짓는 데 도움이 될 것이다. 적절한 시험관내 및 생체내 어세이는 각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 미국 특허 출원 제 10/188,905호 및 10/185,841호에 개시되어 있다.

[0141] 5.3 치료 용도

[0142] 당업자는 본 발명의 조직 보호 펩티드가 각종 질환, 장애, 및 상태의 치료 또는 예방을 위한 치료제로서 유용하다는 점을 알 것이다. 당업자는 또한 상기 펩티드가 조직 보호 수용체 복합체, 예를 들어, 조직 보호 사이토카인 복합체의 조절을 달성하기 위해 사용될 수 있다는 점을 이해할 것이다. 예를 들어, 상기 개시한 본 발명의 어세이에 의해 식별된 화합물의 치료 적응을 평가하기 위해 이용될 수 있는 시험관내 및 생체내 기술 모두는 본원에서 참고로 인용하는 PCT 출원 제 PCT/US01/49479호, 미국 특허 출원 제 10/188,905호 및 10/185,841호에 개시되어 있다.

[0143] 본 발명의 전술한 조직 보호 펩티드는, 주로 신경 또는 정신 증상을 갖는 중추 신경계 또는 말초 신경계의 인간 질환 또는 장애, 안 질환, 심혈관 질환, 심폐 질환, 호흡기 질환, 신장, 비뇨기 및 생식기 질환, 골 질환, 피부 질환, 결합 조직 질환, 위장 질환 및 내분비 및 대사 이상의 예방, 치료 처치, 또는 예방 처치에 일반적으로 유용할 것이다. 용도의 비제한적인 예로서 외상으로부터 발생하는 손상 및 뇌 (뇌졸중, 둔기 외상, 지주막하 출혈), 척수 (허혈, 둔기 외상), 말초 신경 (좌골 신경 손상, 당뇨병성 신경병증, 수근관 증후군), 망막 (황반 부종, 당뇨병성 망막병증, 녹내장), 및 심장 (심근 경색증, 만성 심부전)에 대한 염증으로부터 발생하는 손상에 대한 보호 및 이의 복구를 들 수 있다. 특히, 상기 질환, 장애, 및 상태는 반응성 조직, 예컨대 중추 신경계 조직, 말초 신경계 조직, 또는 심장 조직 또는 망막 조직, 예를 들어, 뇌, 심장, 또는 망막/눈 중 흥분성 조직에 악영향을 미치는 저산소 상태를 포함한다. 따라서, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 각종 상태 및 상황에서의 저산소 상태로부터 발생하는 반응성 조직에 대한 손상을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 상기 상태 및 상황의 비제한적인 예는 본원에서 하기 표에 제공되어 있다.

[0144] 조직 보호 폴리펩티드는 또한 줄기 세포 활성의 조절에 있어서 관심을 갖는 것이다. 조직 보호 활성을 나타내는 사이토카인, 예를 들어, EPO는, 예를 들어, 재생적 역할에 있어서 줄기 세포를 동원하여 손상 부위로의 이주를 자극하고 복구 과정을 보조할 수 있는 것으로 입증되었다. 예를 들어, 실험적 중풍에 있어서, EPO는 회복 기간 동안 신경모세포의 허혈 손상 부위로의 이주를 매개하여 신경세포를 재생시킨다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Tsai 등, J. Neurosci (2006) 26:1269-74]). 또다른 예로서, EPO 및 CEPO는 골수로부터 내피 전구 세포를 동원하여 순환시킨다. 그 후, 상기 세포는 먼 부위로 나아가서 새로운 혈관의 형성에 수반된다 (EPO의 효과에 대하여, 예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Bahlmann 등, 2003, Kideny Int. 64:1648-1652] 참고). 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본원에 개시된 단리된 폴리펩티드는 줄기 세포의 이주에 대하여 유사한 효과를 갖는 것으로 여겨진다.

[0145] 본 발명의 조직 보호 펩티드를 이용하여 치료가능하고 예방가능한 신경세포 조직 병상의 보호의 예에 있어서, 상기 병상은 신경세포 조직의 감소된 산소 공급으로부터 발생한 것을 포함한다. 스트레스, 손상, 및 결국, 신경세포사를 초래하는, 신경세포 조직으로의 산소의 이용가능성을 감소시키는 임의의 상태가 본 발명의 조직 보호 펩티드의 이용으로 치료될 수 있다. 일반적으로 저산소증 및/또는 허혈로서 일컬어지는 상기 상태는 중풍, 혈관 폐쇄, 출생전 또는 출생후 산소 부족, 질식, 숨막힘, 익수, 일산화탄소 중독, 연기 흡입, 외상 (예컨대, 수술 및 방사선 요법), 질식, 간질, 저혈당, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 성인 호흡 곤란 증후군, 저혈압 쇼크, 패혈 쇼크, 파킨슨 쇼크, 인슐린 쇼크, 겸상 적혈구 빈혈, 심장 마비, 울동 부정, 질소 마취, 및 심폐 바이패스 절차에 의해 야기된 신경 결손으로부터 발생하거나 이를 포함하나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0146] 하나의 실시양태에서, 예를 들어, 본 발명의 어세이의 이용으로 식별된 본 발명의 조직 보호 펩티드는 수술 절차 또는 의료 절차 이전, 동안, 또는 이후에 손상 또는 조직 손상의 위험으로부터 발생하는 손상 또는 조직 손상을 예방하기 위하여 단독으로 또는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 수술 절차는 종양 절제 또는 동맥류 복구를 포함할 수 있고, 의료 절차는 산통 또는 분만을 포함할 수 있다. 본 발명의 조직 보호 펩티드를 사용하여 치료가능한, 저혈당에 의해 야기되거나 이로부터 발생하는 기타 병상으로서 의원성 고인슐린혈증으로서도 일컬어지는 인슐린 과량복용, 인슐린중, 성장 호르몬 결핍, 코르티솔 저하증, 약물 과량복용, 및 특정 종양을 들 수 있다.

[0147] 흥분성 신경세포 조직 손상으로부터 발생하는 기타 병상으로서 발작 장애, 예컨대 간질, 경련, 또는 만성 발작 장애를 들 수 있다. 기타 치료가능한 상태 및 질환의 비제한적인 예로서 중풍, 다발성 경화증, 저혈압, 심장 마비, 알츠하이머병, 파킨슨병, 소아마비, 뇌 또는 척수 외상, AIDS 치매, 노년기 인지 기능 상실, 기억 상실, 근위축성 측삭 경화증, 발작 장애, 알콜 중독, 망막 허혈, 녹내장으로부터 발생하는 눈 신경 손상, 및 신경세포 소실과 같은 질환을 들 수 있다.

[0148] 본 발명의 특정 조직 보호 펩티드가 사용되어 질환 상태 또는 각종 외상으로부터 발생하는 염증, 예컨대 물리적

또는 화학적으로 유도된 염증을 치료하거나 예방할 수 있다. 조직 보호 펩티드는 또한 하나 이상의 기관 또는 조직, 예컨대 비제한적인 예로서, 뇌, 척수, 결합 조직, 심장, 폐, 신장 및 요로, 췌장, 눈 및 전립선 중 염증 상태의 치료 및 예방을 위해 고려된다. 상기 외상의 비제한적인 예로서 건염, 혈관염, 만성 기관지염, 췌장염, 골수염, 류마티스 관절염, 사구체신염, 시신경염, 측두 동맥염, 뇌염, 수막염, 횡단성 척수염, 피부근염, 다발성 근염, 괴사성 근막염, 간염, 및 괴사성 전장염을 들 수 있다. 또한, 조직 보호 사이토카인이 사용되어 허혈성 및 비-허혈성 상태, 예컨대 비제한적인 예로서, 알레르기, 류마티스성 질환, 스포츠 관련 손상, 감염 (예컨대, 바이러스, 진균, 및 박테리아)으로부터 발생하는 염증을 치료하거나 예방할 수 있다. 염증은 급성 또는 만성일 수 있다. 염증 분야에서의 추가의 출원은 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는, 2004년 9월 29일에 출원되고 WO 2005/032467로서 공개된 PCT/US2004/031789에 기재되어 있다.

[0149] 본 발명의 특정 조직 보호 펩티드가 사용되어 탈수초 또는 수초 장애로부터 발생하는 중추 신경계 및 말초 신경계 질환을 치료할 수 있다. 상기 질환은 기원을 모르는 염증성 수초 병변을 주로 수반하는 것으로 정의되나, 단 수초형성 결핍 질환, 예컨대 백질 이영양증, 및 명백한 원인으로 인한 질환은 예외이다. 다발성 경화증 (MS)은 탈수초성 질환 중 전형적 질환이며, 병리학적으로, 이는 변화, 주로, 염증성 탈수초, 및 신경아교종으로 특징지어진다. 이의 병인이 공지되어 있지 않으므로, 이의 진단은 임상적 특징, 즉 중추 신경계 병변의 공간적 다중성 및 시간에 걸친 다중성에 기초하여 이루어진다. 더욱이, 급성 과중성 뇌척수염 (ADEM), 염증성 범발성 경화증, 급성 및 아급성 괴사 출혈성 뇌척수염, 및 횡단성 척수염이 탈수초성 질환에 포함된다. 또한, 말초 신경 조직은 수초를 유지하는 슈반 세포에 의존하고, 상기 세포가 손상되는 경우, 말초 탈수초성 질환이 야기된다.

[0150] 본 발명의 조직 보호 펩티드가 사용되어 심장의 상태, 및 이에 대한 손상, 예컨대 심장 및/또는 결합 조직 (예를 들어, 심장막, 대동맥 및 기타 결합 혈관)을 수반하는 만성 또는 급성 병리적 사건, 예컨대 허혈-재관류 손상; 울혈성 심부전; 심장 마비; 심근 경색증; 죽상동맥경화증, 승모판 누출, 삼방 조동, 약물 (예를 들어, 독소 루비신, 허셉틴 (herceptin), 티오리다진 및 시사프라이드 (cisapride))과 같은 화합물에 의해 야기된 심독성; 기생충 감염 (박테리아, 진균, 리카체, 및 바이러스, 예를 들어 매독, 만성 크루스 파동편모충 감염)으로 인한 심장 손상; 전격 심아미로이드증; 심장 수술; 심장 이식; 혈관성형술, 복강경 수술, 외상성 심장 손상 (예를 들어, 관통 또는 둔기 심장 손상, 및 대동맥 판막 파열), 흉부 대동맥류의 수술 복구; 부신 대동맥류; 심근 경색증 또는 심부전으로 인한 심장성 쇼크; 신경성 쇼크 및 과민증을 치료하거나 예방할 수 있다. 본 발명의 조직 보호 펩티드는 또한 심장 질환, 예컨대 심부전의 위험이 있는 개인 (즉, 심장이 대사 조직에 의해 요구되는 속도로 혈액을 펌프질할 수 없거나, 또는 심장이 상승된 총만압에 의해서만 그렇게 할 수 있는 경우)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 상기 위험이 있는 환자는 심근 경색증, 관상 동맥 질환, 심근염, 화학 요법, 심근병증, 고혈압, 판막성 심질환 (가장 빈번하게는 승모판 폐쇄부전 및 대동맥 협착증) 및 독소 유도의 심근병증 (예를 들어, 에탄올, 코카인 등) 등을 갖거나 이의 위험을 갖는 환자를 포함할 것이다.

[0151] 본 발명의 조직 보호 펩티드가 사용되어 눈, 예를 들어, 망막 조직의 상태, 및 이에 대한 손상을 치료하거나 예방할 수 있다. 상기 장애의 비제한적인 예로서 망막 허혈, 황반 변성, 망막 박리, 망막 색소변성, 동맥경화성 망막병증, 고혈압성 망막병증, 망막 동맥 폐쇄, 망막 정맥 폐쇄, 저혈압, 및 당뇨병성 망막병증을 들 수 있다.

[0152] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 조직 보호 펩티드 및 본 발명의 원리를 이용하여 반응성 조직에 대한 방사선 손상으로부터 발생하는 손상을 예방하거나 치료할 수 있다. 본 발명의 조직 보호 펩티드의 추가의 용도는 화학 요법제의 방사선 노출의 결과로서의 중독, 예컨대 신경독 중독 (예를 들어, 도모이산 (domoic acid) 조개 중독), 독소 (에탄올, 코카인 등); 신경라티리즘 (neuroleptism); 팜 질환 (Guam disease); 근위축성 측삭 경화증; 및 파킨슨병의 치료에 있다.

[0153] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 또한 상기 기재한 바와 같은 조직 보호 사이토카인의 말초 투여에 의하여 포유동물에서의 반응성 세포, 조직 및 기관의 조직에서의 기능을 강화시키는 데 사용하기 위한 본 발명의 조직 보호 펩티드에 관한 것이다. 상기 방법을 이용하여 각종 질환 및 상태를 치료할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 심지어 임의의 상태 또는 질환의 부재 하에서도 흥분성 조직에서의 기능을 강화시켜 인지 기능의 상승을 야기하는 데 유용하다. 또한, 조직 보호 사이토카인은 상처 치유의 질을 개선하고, 치유에 요구되는 시간을 감소시키고, 치유된 조직의 질을 개선하며 상처로부터 발생하는 유착의 빈도를 감소시키는 데 유용하다. 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는, 2004년 9월 29일에 출원되고 WO 2005/032467로서 공개된 PCT/US2004/031789를 참고하라. 본 발명의 상기 용도는 하기에 더 상세히 기술되어 있고, 인간 및 비-인간 포유동물 모두에서의 습득 및 훈련의 강화를 포함한다.

- [0154] 본 발명의 조직 보호 펩티드를 중추 신경계에 사용하여 치료가능하거나 예방가능한 상태 및 질환의 비제한적인 예로서 기분 장애, 불안 장애, 우울증, 자폐증, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 및 인지 기능장애를 들 수 있다. 상기 상태는 신경세포 기능의 강화로부터 이익을 얻는다. 본 발명의 교시에 따라 치료가능한 기타 장애로서 수면 장애, 예를 들어, 수면 무호흡증 및 여행 관련 장애; 지주막하 및 동맥류 출혈, 저혈압 쇼크, 진단성 손상, 패혈 쇼크, 과민성 쇼크, 및 각종 뇌염 및 수막염, 예를 들어, 결합 조직 질환 관련 뇌염, 예컨대 루푸스의 후유증을 들 수 있다. 기타 용도로서 신경독에 의한 중독, 예컨대 도모이산 조개 중독, 신경라티리즘, 및 광 질환, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병; 색전성 또는 허혈성 손상에 대한 수술 후 치료; 전뇌 조사; 검상 적혈구 빈혈; 및 자간증의 예방 또는 이로부터의 보호를 들 수 있다.
- [0155] 본 발명의 조직 보호 펩티드를 사용하여 치료가능하거나 예방가능한 상태의 추가의 군은 신경세포 손상 및 죽음으로 대표되는 각종 신경 질환의 원인인, 유전성 또는 후천성의 미토콘드리아 기능장애를 포함한다. 예를 들어, 라이병 (아급성 괴사성 뇌병증)은 신경세포 탈락으로 인한 진행성 시각 상실 및 뇌병증, 및 근질환으로 특징지어진다. 상기 경우, 불완전한 미토콘드리아 대사는 흥분성 세포의 대사에 연료를 공급하기에 충분한 고에너지 기질을 공급하지 못한다. 조직 보호 펩티드는 각종 미토콘드리아 질환에 있어서 약화되는 기능을 최적화한다. 상기 언급한 바와 같이, 저산소 상태는 흥분성 조직에 악영향을 미친다. 흥분성 조직의 비제한적인 예로서 중추 신경계 조직, 말초 신경계 조직, 및 심장 조직을 들 수 있다. 상기 기재한 상태에 추가하여, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 흡입 중독, 예컨대 일산화탄소 및 연기 흡입, 심각한 천식, 성인 호흡 곤란 증후군, 및 숨막힘 및 의수의 치료에 유용하다. 저산소 상태를 발생시키거나 또는 다른 방법에 의해 반응성 조직, 예컨대 흥분성 조직의 손상을 유도하는 추가의 상태로서 인슐린의 부적절한 투여에서, 또는 인슐린을 생성하는 신생물 (인슐린종)에 의해 발생할 수 있는 저혈당을 들 수 있다.
- [0156] 흥분성 조직 손상으로부터 유래하는 것으로 기술되는 각종 신경심리학적 장애는 본 발명의 조직 보호 펩티드의 이용으로 치료가능하다. 신경세포 손상이 수반되고, 본 발명에 의해 그에 치료 또는 예방이 제공되는 만성 장애로서 중추 신경계 및/또는 말초 신경계와 관련된 장애, 예컨대 노년기 인지 기능 상실 및 노인 치매, 만성 발작 장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매, 기억 상실, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 결절성 경화증, 윌슨병, 대뇌 및 진행성 핵상 마비, 광 질환, 루이체 치매, 프리온 질환, 예컨대 해면상 뇌병증, 예를 들어, 크로이츠펠트-야콥병, 헌팅톤병, 근긴장성 이영양증, 프리드리히 운동 실조 및 기타 운동 실조, 뿐만 질 드 라 투렛 증후군 (Gilles de la Tourette's syndrome), 발작 장애, 예컨대 간질 및 만성 발작 장애, 중풍, 뇌 또는 척수 외상, AIDS 치매, 알콜 중독, 자폐증, 망막 허혈, 녹내장, 자가면역 기능 장애, 예컨대 고혈압 및 수면 장애, 및 신경정신 장애, 예컨대 비제한적인 예로서, 정신분열증, 정신분열정동 장애, 주의력 결핍 장애, 기분저하 장애, 주요 우울 장애, 조증, 강박 장애, 정신활성 약물 사용 장애, 불안, 공황 장애, 뿐만 아니라 단극성 및 양극성 정동 장애를 들 수 있다. 추가의 신경정신 및 신경변성 장애로서, 예를 들어, 가장 최근 판의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)]에 제시된 것을 들 수 있다.
- [0157] 본 발명의 조직 보호 펩티드를 사용하여 치료가능하거나 예방가능한 상태의 추가의 군은 신장 질환, 예컨대 급성 및 만성 신부전을 포함한다. 신장으로의 혈액 공급은 혈류로 침입하는 감염으로부터의 쇼크 (패혈증), 내부 또는 외부 출혈, 심각한 설사 또는 화상의 결과로서 신체로부터 체액 손실, 수혈에 대한 반응, 심장 마비 또는 부정맥, 수술 외상 및 신장 이식을 비롯한 여러 원인으로 인하여 차단될 수 있다. 상기 상태로부터 발생하는, 신장으로의 혈액의 감소된 흐름은 급성 신부전의 발생을 야기할 만큼 충분히 긴 기간 동안 혈류를 위험하게 낮은 수준까지 감소시킬 수 있다. 부진한 혈류는 또한 신장에 있어서 괴사, 또는 조직사를 야기하여 신장 관상 세포를 손상시킨다. 신부전은 또한 질환 (간질성 및 당뇨병성 신증후군), 감염, 손상 (CPB 유도), 독소 (조영제 유도, 화학 요법 유도, 시클로스포린), 자가면역성 염증 (예를 들어, 루푸스, 적혈구 증가증 등)으로부터 발생할 수 있다. 본 발명의 조직 보호 펩티드는 상기 손상의 복구 또는 예방을 보조하여 급성 신부전을 개선하는데 도움을 준다.
- [0158] 하기 표는 전술한 조직 보호 펩티드에 의해 치료가능한 각종 상태 및 질환으로서의 추가의 대표적, 비제한적 징후를 기재한다.

세포, 조직 또는 기관	기능장애 또는 병상	상태 또는 질환	유형
심장	허혈	관상동맥 질환	급성, 만성 안정, 불안정
		심근 경색증	드레슬러 증후군
		협심증	
		선천성 심질환	판막 심근병증
		프린즈메탈 협심증	
		심장 파열	동맥류 중격 천공
	부정맥	부정빈맥, 부정서맥 심실위, 심실 전도 장애	안정, 불안정 과민성 경동맥동 결절
		울혈성 심부전	좌, 우, 양심실, 수축기, 확장기
		심근염	자가면역성, 감염성, 특발성
		폐심장증	
		방사선 손상	
		둔기 및 관류 이상	
	독소	코카인 독성, 아드리아마이신	
혈관	고혈압	1차, 2차	
	갑압병		
	섬유근성 증식증		
폐	동맥류	분리, 파열, 확대	
	폐쇄성	천식 만성 기관지염, 폐기종 및 기도 폐쇄	
	허혈성 폐질환	폐 색전증, 폐 혈전증, 지방 색전증	
	환경성 폐질환		
	허혈성 폐질환	폐 색전증 폐 혈전증	
	간질성 폐질환	특발성 폐 섬유증	
	선천성	낭성 섬유증	
	폐심장증		
	외상		
	폐렴 및 폐간질염	감염성, 기생충성, 독성, 외상성, 화상 성, 흡인	
췌장	내분비	I형 및 II형 당뇨병	베타 세포 기능상실, 기능장애 당뇨병성 신경병증
		췌장의 기타 내분비 세포 기능상실	
	외분비	외분비 췌장 기능상실	췌장염

[0159]

골	골감소증	1차 2차	성선기능저하증 활동장애 폐경후 노년기 부갑상선항진증 갑상선항진증 칼슘, 마그네슘, 인 및/또는 비타민 D 결핍
	골수염		
	무혈성 괴사		
	외상 파제트병		
피부	탈모	원형 전두	1차 2차 남성형 대머리
	백반증	국소 전신	1차 2차
	궤양형성	당뇨병 욕창	욕창, 압력 궤양 와창
	말초 혈관병 수술 상처, 열상 화상		
자가면역 장애	홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 류마티스 관절염, 사구체신염 혈관염 랑게르한스 조직구증		
눈	시신경염		
	둔기 및 관통 손상, 감염, 사르코이드, 겸상 적혈구병, 망막 박리, 측두 동맥염 망막 허혈 황반 변성 망막 색소변성 동맥경화성 망막병증, 고혈압성 망막병증, 망막 동맥 폐쇄, 망막 정맥 폐쇄 저혈압, 당뇨병성 망막병증, 녹내장 및 황반부종		
배아 및 태아 장애	질식 허혈		

[0160]

CNS	만성 피로 증후군, 급성 및 만성 저삼투압 및 고삼투압 증후군, AIDS 치매, 전기사		
	뇌 말라리아		
	뇌염	광견병, 헤르페스	
	수막염		
	경막 하혈종		
	니코틴 중독		
	약물 남용 및 금단	코카인, 헤로인, 크랙, 마리화나, LSD, PCP, 복합약물 남용, 엑스터시, 아편유사제, 진정 수면제, 암페타민, 카페인	
	감각 장애		
	척추 협착, 횡단성 척수염, 길랑 바레, 외상, 신경근 압박, 중앙 압박, 열사병		
ENT	이명		
	메니에르 증후군 (Meuniere's syndrome)		
	난청		
	외상		
	압력 손상		
신장	신부전	급성, 만성	혈관/허혈성, 간질성 질환, 당뇨병성 신질환, 신중후군, 감염, 손상, 조영제 유도, 화학요법 유도, 시클로스포린, CPB 유도, 또는 예방
	방사선 손상		
	헤노흐		
	천라인 자반증		
황분근	자가면역 장애	중증 근무력증 피부근염 다발성 근염	
	근육병증	유전 대사성, 내분비 및 독성	
	열사병		
	압력 손상		
	황분근 유행		
	미토콘드리아 질환		
	감염	과사성 근막염	

[0161]

성 기능장애	중추 및 말초 (예를 들어, 발기부전)	투약에 대한 2차적 발기부전. (당뇨병)	
간	간염	바이러스, 박테리아, 기생충	
	허혈성 질환		
	지방 간 경화증		
	침윤성/대사성 질환		
위장	허혈성 장질환		
	염증성 장질환		
	과사성 진장염		
장기 이식	기증자 및 수혜자의 치료		
생식관	불임증	혈관 자가면역성 자궁 이상 이식 장애	
내분비	생 기능항진 및 기능저하		
일반	쇼크	감염성, 혈액동력성	
	기생충혈증	말라리아, 파동편모충증, 리슈만편모충증	

[0162]

[0163] 상기 언급한 바와 같이, 상기 질환, 장애 또는 상태는 본 발명의 조직 보호 펩티드에 의해 제공되는 이점의 범

위를 단지 예시하는 것이다. 따라서, 본 발명은 일반적으로 물리적 외상 또는 인간 질환의 결과의 예방, 치료, 또는 예방 처치를 제공한다. CNS 및/또는 말초 신경계의 질환, 장애 또는 상태에 대한 예방 또는 치료 또는 예방 처치가 고려된다. 정신과적 요소를 갖는 질환, 장애 또는 상태의 예방 또는 치료 또는 예방 처치가 제공된다. 눈, 심혈관, 심폐, 호흡기, 신장, 비뇨기, 생식기, 위장, 내분비, 또는 대사 요소를 갖는 것을 포함하나 이에 국한되지 않는 질환, 장애 또는 상태의 예방 또는 치료 또는 예방 처치가 제공된다.

[0164] 하나의 실시양태에서, 조직 보호 펩티드를 포함하는 상기 약학 조성물은 전신 투여되어 표적 세포, 조직 또는 기관을 보호하거나 강화할 수 있다. 상기 투여는 흡입을 통한 비경구, 또는 점막 투과, 예를 들어, 경구, 코, 직장, 질내, 설하, 눈, 점막하 또는 경피적일 수 있다. 바람직하게는, 투여는, 예를 들어, 정맥내 또는 복막내 주사를 통한 경구적인 것이고, 또한 동맥내, 근육내, 진피내 및 피하 투여를 포함하나 이에 국한되지는 않는다.

[0165] 예컨대 관류액의 사용, 장기로의 주사, 또는 기타 국소 투여에 의한 기타 투여 경로에 있어서, 상기 기재한 것과 동일 수준의 조직 보호 펩티드를 야기하는 약학 조성물이 제공될 것이다. 약 15 pM ~ 30 nM의 수준이 바람직하다.

[0166] 본 발명의 약학 조성물은 치료 유효량의 화합물, 및 약학적 허용 담체를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 용어 "약학적 허용"은 동물, 및 더 특히는 인간에게 사용하기 위하여 연방 또는 주 정부의 관리 당국에 의해 승인되거나 또는 미국 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 외국 약전에 기재된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제가 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클을 말한다. 상기 약학적 담체는 무균 액체, 예컨대 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 것을 비롯한 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등 및 물 중 식염수일 수 있다. 약학 조성물이 정맥내로 투여되는 경우 식염수가 바람직한 담체이다. 식염수 및 텍스트로오스 및 글리세롤 수용액도, 특히 주사액에 대한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적절한 약학적 부형제로서 전분, 글루코오스, 락토오스, 슈크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 호분, 실리카겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있다. 조성물은, 필요에 따라, 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제도 함유할 수 있다. 상기 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 서방형 제형물 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전형적 결합제 및 담체, 예컨대 트리글리세라이드와 함께 좌제로서 제형화될 수 있다. 본 발명의 화합물은 중성 또는 염 형태로서 제형화될 수 있다. 약학적 허용염은 유리 아미노기로 형성된 것, 예컨대 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것, 및 유리 카르복실기로 형성된 것, 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것을 포함한다. 적절한 약학적 담체의 예는 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는, E.W. Martin에 의한 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 기재되어 있다. 상기 조성물은 적절한 양의 담체와 함께, 바람직하게는 정제된 형태인 화합물의 치료 유효량을 함유하여 환자에게 투여하기에 적절한 형태를 제공할 것이다. 제형물은 투여 방식에 적합해야 한다.

[0167] 펩티드, 예컨대 지속성 조직 보호 펩티드의 점막 투과 흡수성을 증가시키기 위한 제형물이 또한 본 발명에 의해 고려된다. 경구 투여에 적절한 약학 조성물은 캡슐 또는 정제로서; 분말 또는 과립으로서; 용액, 시럽 또는 현탁액 (수성 또는 비-수성 액체)으로서; 식용 폼 (foam) 또는 휘프 (whip)으로서; 또는 에멀전으로서 제공될 수 있다. 정제 또는 경질 젤라틴 캡슐은 락토오스, 전분 또는 이의 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로오스, 탄산마그네슘, 스테아르산 또는 이의 염을 포함할 수 있다. 연질 젤라틴 캡슐은 식물성유, 밀랍, 지방, 반-고체, 또는 액체 폴리올 등을 포함할 수 있다. 용액 및 시럽은 물, 폴리올 및 당을 포함할 수 있다.

[0168] 경구 투여용 활성제는 위장관 내의 활성제의 분해 및/또는 흡수를 지연시키는 물질로 코팅되거나 이와 혼합될 수 있다 (예를 들어, 글리세롤 모노스테아레이트 또는 글리세롤 디스테아레이트가 사용될 수 있다). 따라서, 활성제의 서방성이 장기간에 걸쳐 달성될 수 있으며, 필요에 따라, 활성제는 위 내부에서 분해되는 것으로부터 보호될 수 있다. 경구 투여용 약학 조성물은 특정 pH 또는 효소 조건으로 인하여 특정 위장 위치에서 활성제가 방출되는 것을 용이하게 하기 위하여 제형화될 수 있다.

[0169] 경피 투여에 적절한 약학 조성물은 연장된 기간 동안 수용자의 표피와 밀접하게 접촉된 상태로 유지되게 하는 개별 패치로서 제공될 수 있다. 국소 투여에 적절한 약학 조성물은 연고, 크림, 현탁액, 로션, 분말, 용액, 페이스트, 젤, 분무제, 에어로졸 또는 오일로서 제공될 수 있다. 피부, 입, 눈 또는 기타 외부 조직에 대한 국소 투여용으로, 국소 연고 또는 크림이 바람직하게 사용된다. 연고로 제형화되는 경우, 활성 성분은 파라핀계 또

는 수용성 연고 기재와 함께 사용될 수 있다. 대안으로, 활성 성분은 수중유 기재 또는 유중수 기재와 함께 크림으로 제형화될 수 있다. 눈에 국소 투여하기에 적절한 약학 조성물로서 점안제를 들 수 있다. 상기 조성물에서, 활성 성분은 적절한 담체, 예를 들어, 수성 용매에 용해되거나 현탁될 수 있다. 입에 국소 투여하기에 적절한 약학 조성물로서 로젠지, 파스틸지 및 양치질약을 들 수 있다.

[0170] 코 및 폐 투여에 적절한 약학 조성물은 고체 담체, 예컨대 분말 (바람직하게는 20 내지 500 μm 범위의 입자 크기를 가짐)을 포함할 수 있다. 분말은 향기가 취해지는, 즉, 코에 가까이 위치된 분말 용기로부터 코를 통하여 빠르게 흡입되는 방식으로 투여될 수 있다. 대안으로, 코 투여용으로 채택된 조성물은 액체 담체, 예를 들어, 코 분무제 또는 점비제를 포함한다. 대안으로, 화합물의 폐로의 직접 흡입은 깊은 흡입 또는 마우스피스를 통한 인두 중앙부로의 장비에 의해 달성될 수 있다. 상기 조성물은 활성 성분의 수용액 또는 오일 용액을 포함할 수 있다. 흡입에 의한 투여용 조성물은, 활성 성분의 예정된 투여량을 제공하도록 구성될 수 있는, 특별히 개조된 장치, 예컨대 비제한적인 예로서, 가압 에어로졸, 흡입기 또는 취입기로 공급될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 비강에 직접 투여되거나 비강 또는 인두 중앙부를 통해 폐에 투여된다.

[0171] 직장 투여에 적절한 약학 조성물은 좌제 또는 관장제로서 제공될 수 있다. 질 투여에 적절한 약학 조성물은 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 포말 또는 분무 제형물로서 제공될 수 있다.

[0172] 비경구 투여에 적절한 약학 조성물은 산화방지제, 완충제, 정균제 및 조성물에 목적 수용자의 혈액과의 실질적 등장성을 부여하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 무균 주사액 또는 현탁액을 포함한다. 상기 조성물 중 존재할 수 있는 기타 성분으로서, 예를 들어, 물, 알콜, 폴리올, 글리세린 및 식물성유를 들 수 있다. 비경구 투여에 적절한 조성물은 단위 투여 또는 다회 투여 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알 중 존재할 수 있고, 사용 직전에 오로지 무균 액체 담체, 예를 들어, 주사용 무균 식염수를 첨가할 것을 필요로 하는 동결 건조 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사액 및 현탁액이 무균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 조직 보호 펩티드의 주사액을 포함하는 자가주사기가 구급차, 응급실, 및 전장 상황에 의한 긴급 사용을 위해, 및 심지어 가정 환경, 특히 예컨대 잔디 깎는 기계의 경솔한 사용에 의해 외상성 절단이 발생할 수 있는 가능성이 존재하는 경우에서의 자가 투여를 위해 제공될 수 있다. 잘린 발 또는 발가락의 세포 및 조직이 재부착 후 생존할 가능성은, 실행가능한 즉시, 심지어 의료 인력이 현장에 도착하거나, 또는 견인차에 탄 잘린 발가락을 갖는 고통받는 사람이 응급실에 도착하기 이전에, 조직 보호 펩티드를 잘린 부분의 여러 부위에 투여함에 의해 증가될 수 있다.

[0173] 바람직한 실시양태에서, 조성물은 일상적 절차에 따라 인간에게 정맥내 투여하기에 적절한 약학 조성물로서 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 무균 등장성 수성 완충제 중 용액이다. 필요에 따라, 조성물은 또한 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위하여 가용화제 및 국소 마취제, 예컨대 리도카인을 포함할 수 있다. 일반적으로, 성분은 단위 제형으로, 예를 들어, 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사체 (sachette)와 같은 밀봉 용기 중 건조 동결 건조된 분말 또는 무수 농축물로서 별개로 또는 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 이는 무균 약학 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입용 병에 의해 투여될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 무균 염수의 앰플이 제공되어 성분이 투여 전에 혼합될 수 있도록 할 수 있다.

[0174] 좌제는 일반적으로 활성 성분을 0.5 중량% 내지 10 중량% 범위로 함유하고; 경구 제형물은 바람직하게는 10% 내지 95%의 활성 성분을 함유한다.

[0175] 관류 조성물이 제공되어 이식된 장기 바스 (organ bath)에 사용되거나, 제자리 관류에 사용되거나, 또는 장기 적출 이전에 장기 기증자의 혈관계에 투여될 수 있다. 상기 약학 조성물은 개체에게 급성 또는 만성, 국소 또는 전신 투여하기에 적절하지 않은 조직 보호 펩티드의 수준, 또는 조직 보호 펩티드의 형태를 포함할 수 있으나, 시체, 장기 바스, 장기 관류액, 또는 제자리 관류액 중 본원에서 의도된 기능을 수행한 후, 이에 함유된 조직 보호 펩티드의 수준을 감소시키거나 제거한 후, 처리된 장기 또는 조직을 정상적 순환에 노출하거나 반환한다.

[0176] 본 발명은 또한 본 발명의 약학 조성물의 1종 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 상기 용기(들)에는 임의로, 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 처방된 형식의 공지문이 부착될 수 있고, 상기 공지문은 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매 당국에 의한 승인을 반영한다.

[0177] 또다른 실시양태에서, 예를 들어, 조직 보호 펩티드는 제어 방출형 시스템으로 전달될 수 있다. 예를 들어, 펩

티드는 정맥내 주입, 매물식 삼투성 펌프, 경피 패치, 리포솜, 또는 기타 투여 방식의 이용으로 투여될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 펌프가 사용될 수 있다 (각각의 전문을 본원에서 참고로 인용하는 [Langer, 상동]; [Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201]; [Buchwald 등, 1980, Surgery 88:507]; [Saudek 등, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574] 참고). 또다른 실시양태에서, 화합물은 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다 ([Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990)]; [Treat 등, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)]; WO 91/04014; 미국 특허 제 4,704,355호; [Lopez-Berestein, 동서, pp. 317-327] 참고; 일반적으로 동서 참고). 또다른 실시양태에서, 중합 물질이 사용될 수 있다 ([*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974]; [*Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984)]; [Ranger 및 Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1953] 참고; 또한 [Levy 등, 1985, *Science* 228:190]; [During 등, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351]; [Howard 등, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105] 참고 (상기 각각의 전문은 본원에서 참고로 인용함)).

[0178] 더욱 또다른 실시양태에서, 제어 방출형 시스템은 치료 표적, 즉, 표적 세포, 조직 또는 기관에 근접하게 위치되어, 이에 따라 전신 투여량의 오로지 일부만을 필요로 할 수 있다 (예를 들어, 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Goodson, pp. 115-138 in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, 상동, 1984] 참고). 기타 제어 방출형 시스템은 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Langer (1990), *Science* 249:1527-1533]에 의한 개관에 기재되어 있다.

[0179] 또다른 실시양태에서, 적절하게 제형화된 조직 보호 펩티드는 코, 경구, 직장, 질, 눈, 경피, 비경구 또는 설하 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0180] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조직 보호 펩티드를 치료를 필요로 하는 부위에 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 것이고; 이는, 예를 들어, 비제한적인 예로서, 수술 동안 국소 주입, 수술 후 예를 들어 상처 드레싱과 함께 국소 적용에 의해, 주사에 의해, 카테터에 의해, 좌제에 의해, 또는 이식물에 의해 달성될 수 있고, 상기 이식물은 다공성, 비-다공성, 또는 젤라틴 물질, 예컨대 실라스틱 (silastic) 막과 같은 막, 또는 섬유이다. 상기 실시양태의 비제한적인 예는 본 발명의 조직 보호 펩티드로 코팅된 관상동맥 스텐트일 것이다.

[0181] 바람직한 유효 투여량의 선택은 당업자에게 공지되어 있을 여러 인자의 고려에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 상기 인자로서 조직 보호 펩티드의 특정 형태, 및 이의 약동학적 파라미터, 예컨대 생체이용률, 대사, 반감기 등을 들 수 있고, 이는 약학적 화합물에 대한 규제 승인을 얻는 데 전형적으로 이용된 통상의 개발 절차 동안 확립되었을 것이다. 투여량에 고려되는 추가의 인자는 치료될 상태 또는 질환, 또는 정상 개체에서 달성될 이점, 환자의 체질량, 투여 경로, 투여가 급성인지 또는 만성인지의 여부, 부수 약물, 및 투여된 약제의 효능에 영향을 미치는 것으로 잘 공지되어 있는 기타 인자를 포함한다. 따라서 정확한 투여량은, 예를 들어, 개별 환자의 상태 및 면역 상태에 따른 실험자의 판단 및 각 환자의 상황에 따라, 그리고 표준 임상 기술에 따라 결정되어야 한다.

[0182] 본 발명의 또다른 측면에서, 본 발명에 따른 약학 조성물은 조직 보호 기능을 나타내는 1종 이상의 소 분자를 갖는 제형물 중 조직 보호 펩티드를 포함할 수 있다. 적절한 소 분자의 비제한적인 예로서 스테로이드 (예를 들어, 라자로이드 (lazaroid) 및 글루코코르티코이드), 산화방지제 (예를 들어, 조효소 Q₁₀, 알파 리포산, 및 NADH), 이화작용 방지 효소 (예를 들어, 글루타티온 퍼옥시다제, 초과산화물 디뮤타제, 카탈라제, 합성 촉매 제거제, 뿐만 아니라 유사체), 인돌 유도체 (예를 들어, 인돌아민, 카르바졸, 및 카르볼린), 질산 중화제, 아데노신/아데노신 아고니스트, 파이토케미칼 (플라보노이드), 약초 추출물 (진코 빌로바 (ginko biloba) 및 심황), 비타민 (비타민 A, E, 및 C), 옥시다제 전자 수용자 억제제 (예를 들어, 크산틴 옥시다제 전자 억제제), 무기물 (예를 들어, 구리, 아연, 및 마그네슘), 비스테로이드성 항염증 약물 (예를 들어, 아스피린, 나프록센, 및 이부프로펜), 및 이의 조합물을 들 수 있다. 추가의 작용제, 예컨대 비제한적인 예로서, 항염증제 (예를 들어, 코르티코스테로이드, 프레드니손 및 히드로코르티손), 글루코코르티코이드, 스테로이드, 비스테로이드성 항염증 약물 (예를 들어, 아스피린, 이부프로펜, 디클로페낙, 및 COX-2 억제제), 베타-아고니스트, 항콜린제 및 메틸 크산틴, 면역조절제 (예를 들어, 소 유기 분자, T-세포 수용체 조절제, 사이토카인 수용체 조절제, T-세포 제거제, 사이토카인 안타고니스트, 모노카인 안타고니스트, 림프구 억제제, 또는 항암제), 금 주사액, 설파살라진, 페니실라민, 항혈관신생제 (예를 들어, 안지오테라틴), TNF- α 안타고니스트 (예를 들어, 항-TNF α 항체, 및 엔도스타틴), 덤손, 소랄렌 (예를 들어, 메톡살렌 및 트리옥살렌), 항말라리아제 (예를 들어, 히드록시클로로퀸),

항바이러스제, 및 항생제 (예를 들어, 에리스로마이신 및 페니실린)가 본 발명의 약학 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0183] 본 발명의 또다른 측면에서, 관류액 또는 관류 용액이 이식용 기관의 관류 및 저장에 위해 제공되고, 상기 관류 용액은 반응성 세포 및 결합 세포, 조직 또는 기관을 보호하기에 효과적인 조직 보호 펩티드의 양을 포함한다. 이식의 비제한적인 예로서 타가이식 {여기서, 장기 (예컨대, 세포, 조직 또는 기타 신체 부분)는 한 기증자로부터 적출되어 상이한 수혜자에게 이식되며, 여기서 양쪽은 동일한 종임}; 자가이식 {여기서, 장기는 신체의 한 부분으로부터 취해져 또다른 부분에서 대체되며 (예컨대, 벤치 (bench) 수술 절차), 여기서 장기는 제거되고, 생체외에서, 예컨대 종양 제거를 위하여 절제되고, 복구되거나 조작된 후, 본래 위치로 반환될 수 있음} 또는 이종이식 (여기서, 조직 또는 기관은 종 간에 이식됨)을 들 수 있다. 하나의 실시양태에서, 관류 용액은 위스콘신 대학 (UW) 용액이고 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 미국 특허 제 4,798,824호), 이는 약 1 내지 약 25 U/ml (10 ng = 1 U)의 조직 보호 펩티드, 5%의 히드록시에틸 전분 (약 200,000 내지 약 300,000의 분자량을 가지고, 에틸렌 글리콜, 에틸렌 클로로히드린, 염화나트륨 및 아세톤이 실질적으로 없음); 25 mM의 KH_2PO_4 ; 3 mM의 글루타티온; 5 mM의 아데노신; 10 mM의 글루코오스; 10 mM의 HEPES 완충제; 5 mM의 마그네슘 글루코네이트; 1.5 mM의 CaCl_2 ; 105 mM의 나트륨 글루코네이트; 200,000 단위의 페니실린; 40 단위의 인슐린; 16 mg의 텍사메타손; 12 mg의 페놀 레드 (Phenol Red)를 함유하며; 7.4 ~ 7.5의 pH 및 약 320 mOsm/l의 삼투압을 갖는다. 상기 용액이 사용되어 이식 전에 시체의 신장 및 체장을 유지시킨다. 용액의 사용시, 보존은 시체의 신장 보존에 대하여 권고되는 30 시간 한계를 넘어서 연장될 수 있다. 상기 특정 관류액은 유효량의 조직 보호 펩티드를 포함함에 의해 본 발명에 사용하도록 조절될 수 있는 다수의 상기 용액을 단순히 예시한다. 추가의 실시양태에서, 관류 용액은 약 1 내지 약 500 ng/ml의 조직 보호 펩티드, 또는 약 40 내지 약 320 ng/ml의 조직 보호 펩티드를 함유한다. 상기 언급한 바와 같이, 임의의 형태의 조직 보호 펩티드가 본 발명의 상기 측면에 사용될 수 있다.

[0184] 본원을 통한 목적상 조직 보호 펩티드의 바람직한 수용자는 인간인 한편, 본원의 방법은 기타 포유동물, 특히 길들여진 동물, 가축, 짝, 및 동물원 동물에게 동일하게 적용된다. 그러나, 본 발명은 제한적인 것이 아니며 본 이점은 임의의 포유동물에게 적용될 수 있다.

[0185] 생체외 본 발명의 추가의 측면에서, 임의의 조직 보호 펩티드, 예컨대 비제한적인 예로서, 상기 기재된 것이 사용될 수 있다.

[0186] 본 발명의 또다른 측면에서, 내피 세포 장벽에 의해 혈관계로부터 분리되지 않은 세포, 조직 또는 기관의 생존력을 강화시키기 위한 방법 및 조성물은, 조직 보호 펩티드를 포함하는 약학 조성물에 세포, 조직 또는 기관을 직접 노출시킴에 의해, 또는 조직 또는 기관의 혈관계에 조직 보호 펩티드를 함유하는 약학 조성물을 투여하거나 접촉시킴에 의해 제공된다. 처리된 조직 또는 기관 중 반응성 세포의 강화된 활성은 발휘된 긍정적 효과의 원인이 된다.

[0187] 에리스로포이에틴 기체의 기타 조직 보호 화합물과 유사하게, 본 발명의 조직 보호 펩티드는 내피 세포 치밀 이음부를 갖는 장기, 예를 들어, 뇌, 망막, 및 정소의 모세관의 내피 세포의 관강 표면으로부터 기저막 표면으로 운반되는 것이 가능하다. 따라서, 장벽 너머의 반응성 세포는 조직 보호 펩티드의 유용한 효과에 영향을 받기 쉬운 표적일 수 있고, 그 내부에 반응성 세포를 포함하며 이에 전적으로 또는 부분적으로 의존하는 기타 세포 유형 또는 조직 또는 기관이 본 발명의 방법에 대한 표적일 수 있다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아닌 한편, 조직 보호 펩티드의 트랜스사이토시스 이후, 이는 반응성 세포, 예를 들어, 신경, 눈 (예를 들어, 망막), 지방, 결합, 모발, 치아, 점막, 체장, 내분비, 귀, 상피, 피부, 근육, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신 (예를 들어, 부신 피질, 부신 수질), 모세관, 내피, 정소, 난소, 또는 자궁내막 세포 상의 조직 보호 수용체와 상호작용할 수 있고, 수용체 결합은 반응성 세포 또는 조직 내부의 유전자 발현 프로그램의 활성화를 야기하는 신호 전달 연쇄 반응을 개시하여, 세포 또는 조직, 또는 기관을 예컨대 독소, 화학 요법제, 방사선 요법, 저산소증 등에 의한 손상으로부터 보호할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 조직 보호 펩티드는 본원에서 참고로 인용하는 PCT 공보 제 PCT/US01/49479호, 미국 특허 출원 제 10/188,905호 및 10/185,841호의 교시에 따라 장벽을 가로질러 수 있는 화합물, 예컨대 카르바미드 에리스로포이에틴에 가교되어, 장벽을 가로질러 운반될 수 있다. 따라서, 반응성 세포를 함유하는 조직을 손상 또는 저산소 스트레스로부터 보호하여, 상기 조직의 기능을 강화시키는 방법은 본원에서 하기에 상세히 기재되어 있다.

[0188] 본 발명의 하나의 실시양태의 실행에 있어서, 포유동물 환자는 암 치료를 위한 전신 화학 요법, 예컨대 신경, 폐, 심장, 난소 또는 정소 손상과 같은 악영향을 일반적으로 미치는 방사선 요법을 겪는다. 상기 기재한 조직

보호 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 투여는 화학 요법 및/또는 방사선 요법 이전 및 동안 수행되어, 각종 조직 및 기관을 화학 요법제에 의한 손상으로부터 보호하며, 예컨대 정소를 보호한다. 치료는 화학 요법제의 순환 수준이 포유동물 신체에 대한 잠재적 위험 수준 미만일 때까지 지속될 수 있다.

[0189] 본 발명의 또다른 실시양태의 실행에 있어서, 각종 장기는 자동차 사고의 희생자로부터 적출되어 수많은 수혜자에게 이식되도록 계획되며, 이 중 일부는 연장된 거리 및 기간 동안의 운송을 필요로 한다. 장기 적출 이전에, 기증자에게 본원에 기재된 조직 보호 펩티드를 포함하는 약학 조성물을 주입한다. 수송을 위해 적출된 장기는 본원에 기재된 조직 보호 펩티드를 함유하는 관류액에 의해 관류되고, 조직 보호 펩티드를 포함하는 바스 내에 저장된다. 특정 장기는, 본 발명에 따른 조직 보호 펩티드를 함유하는 관류액의 이용으로, 박동성 관류 장치에 의해 지속적으로 관류된다. 조직 기능의 최소한의 약화가 운송 동안 및 제자리 장기 이식 및 재관류시 발생한다.

[0190] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 위험한 활동에 대한 참가자는 반응성 세포, 조직, 또는 기관에 대한 손상으로부터 발생하는 손상을 예방 (즉, 발병의 지연, 억제, 또는 중단), 보호, 또는 완화하기에 충분한 조직 보호 펩티드를 함유하는 약학 조성물의 투여량을 취할 수 있다. 특히, 상기 치료 방법은 손상을 받기 쉬운 각종 직업, 예컨대 비제한적인 예로서, 직업적 운동 선수 (운전자, 경주용 자동차 운전자, 축구 선수 등), 군사 인력 (군인, 낙하산병), 응급 인력 (경찰, 소방관, EMS, 및 재난 구조 인력), 스티트맨, 및 건설 인부에 적용될 수 있다. 추가로, 조직 보호 펩티드의 예방 용도가 손상의 위험을 내포하는 오락적 시도, 예컨대 비제한적인 예로서, 암벽 등반, 현수 하강, 스카이 다이빙, 레이싱, 자전거 타기, 축구, 럭비, 야구, 및 다이빙에서 고려된다.

[0191] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 심판막을 복구하는 수술 절차는 일시적 심장 마비 및 동맥 폐쇄를 요구한다. 수술 전에, 환자에게 조직 보호 펩티드가 주입된다. 상기 치료는, 특히 재관류 이후 저산소성 허혈 세포 손상을 예방한다. 추가로, 본 발명의 약학 조성물은, 수술 절차와 관련된 외상을 제한하거나 또는 수술 절차로부터 개체의 회복을 돕기 위한 노력으로 예방적으로 사용되어 개체를 수술에 대해 준비시킬 수 있다. 조직 보호 펩티드를 함유하는 약학 조성물을 이용하는 본 치료 방법은 수술 절차에 대한 예방 용도를 제공하나, 이는 임시적 허혈 사건을 유도하는 절차, 예컨대 비제한적인 예로서, 바이패스 절차 (관상동맥 바이패스), 혈관형성 절차, 절단, 및 이식, 뿐만 아니라 반응성 세포, 조직 또는 기관에 직접 수행되는 절차, 예컨대 뇌 및 척수 수술, 및 개심 절차에 특히 유용할 것이다. 상기 절차는 심폐 바이패스의 이용을 수반할 수 있다.

[0192] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 임의의 수술 절차, 예컨대 심폐 바이패스 수술에 있어서, 본 발명의 조직 보호 펩티드가 사용될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 기재한 조직 보호 펩티드를 포함하는 약학 조성물의 투여가 바이패스 절차 이전, 동안, 및/또는 이후에 수행되어, 뇌, 심장, 및 기타 기관의 기능을 보호한다.

[0193] 본 발명의 조직 보호 펩티드가 생체의 적용, 또는 생체내 적용에 사용되어, 반응성 세포, 예컨대 신경세포 조직, 망막 조직, 심장, 폐, 간, 신장, 소장, 부신 피질, 부신 수질, 모세관 내피, 정소, 난소, 또는 자궁내막 세포 또는 조직을 치료하는 전술한 예에서, 본 발명은 약 .01 pg 내지 7.5 mg, .5 pg 내지 6.5 mg, 1 pg 내지 5 mg, 500 pg 내지 5 mg, 1 ng 내지 5 mg, 500 ng 내지 5 mg, 1 µg 내지 5 mg, 500 µg 내지 5 mg, 또는 1 mg 내지 5 mg 범위 이내의 조직 보호 펩티드의 양, 및 약학적 허용 담체를 포함하는, 혈관계 발달의 반응성 세포, 조직 또는 기관의 보호 또는 강화에 적절한 단위 제형의 약학 조성물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 조직 보호 펩티드의 양은 약 .5 pg 내지 1 mg의 범위 이내에 있다. 바람직한 실시양태에서, 제형물은 비-적혈구 조혈성인 조직 보호 펩티드를 함유한다.

[0194] 본 발명의 추가의 측면에서, 조직 보호 펩티드의 투여가 이용되어 뇌 외상을 겪은 포유동물의 인지 기능을 회복시킬 수 있다. 5 일 또는 30 일의 지연 이후, 조직 보호 펩티드의 투여는 플라시보 처리된 포유동물과 비교시 기능을 회복시킬 수 있어야 하며, 이는 뇌 활성을 재생시키거나 회복시키는 조직 보호 펩티드의 능력을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 또한 뇌 외상 및 기타 인지 기능장애의 치료, 예컨대 손상되고 나서 상당한 시간 이후 (예를 들어, 3 일, 5 일, 1 주, 1 개월 이상)의 치료를 위한 약학 조성물의 제조를 위한 조직 보호 펩티드의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유효량의 조직 보호 펩티드를 투여함에 의한 손상 이후 인지 기능장애의 치료 방법에 관한 것이다. 본원에 기재된 임의의 조직 보호 펩티드가 본 발명의 상기 측면에 사용될 수 있다.

[0195] 더욱이, 본 발명의 상기 회복 측면은 세포, 조직 또는 기관의 기능장애의 회복을 위한 약학 조성물의 제조를 위한 본원의 임의의 조직 보호 펩티드의 용도에 관한 것이고, 여기서 치료는 기능장애의 원인이 되는 초기 손상 이후, 및 상당히 이후에 개시된다. 더욱이, 본 발명의 조직 보호 펩티드를 사용하는 치료는 급성기 뿐만 아니라 만성기 동안의 질환 또는 상태의 과정에 걸친 것일 수 있다.

[0196] 본 발명의 조직 보호 펩티드는 투여당 약 1 ng 내지 약 100 μg /체중 kg, 바람직하게는 약 5 ~ 50 μg /체중 kg, 가장 바람직하게는 약 10 ~ 30 μg /체중 kg의 투여량으로 전신 투여될 수 있다. 상기 유효 투여량은 투여 이후 혈청 중 약 80, 120, 또는 160 ng/ml 초과와 조직 보호 펩티드의 혈청 수준을 달성하기에 충분해야 한다. 상기 혈청 수준은 투여 이후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 시간에 달성될 수 있다. 상기 투여는 필요에 따라 반복될 수 있다. 예를 들어, 투여는, 임상적으로 필요한 한, 매일, 또는 적절한 간격 이후, 예를 들어, 1 내지 12 주마다, 바람직하게는 1 내지 3 주마다 반복될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 유효량의 조직 보호 펩티드 및 약학적 허용 담체는 단회 투여 바이알 또는 기타 용기에 포장될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 본원에 기재된 활성을 나타낼 수 있으나 헤모글로빈 농도 또는 적혈구 용적률의 증가를 야기하지 않는 조직 보호 펩티드가 사용된다. 상기 조직 보호 펩티드는 본 발명의 방법이 장기간 제공될 목적인 경우 바람직하다.

[0197] **5.4 트랜스사이토시스**

[0198] 담체 분자 및 조직 보호 펩티드. 본 발명은 또한 내피 세포 장벽을 가로지를 수 있는 펩티드인 담체 펩티드와 결합된 조직 보호 펩티드, 예컨대 상기 기재한 에리트로포이에틴을 포함하는 조성물을 투여함에 의해, 포유동물 중 내피 세포 장벽을 가로지르는 조직 보호 펩티드의 운반을 용이하게 하는 방법에 관한 것이다. 신체 중 특정 기관 내의 내피 세포 간의 치밀 이음부는 특정 분자의 유입에 대한 장벽을 생성한다. 장벽을 지닌 기관 내부의 각종 상태의 치료를 위하여, 조직 보호 펩티드의 통과를 용이하게 하는 수단이 요구될 것이다.

[0199] 담체 분자로서의 조직 보호 펩티드. 본 발명의 조직 보호 펩티드는 혈액-뇌 및 이것이 가로질러 이동할 수 있는 기타 유사한 장벽을 가로질러 다른 분자를 전달하기 위한 담체로서 유용할 것이다. 조직 보호 펩티드와 함께 장벽을 가로지르려 하는 분자를 포함하는 조성물이 제조되고, 상기 조성물의 말초 투여는 조성물의 장벽을 가로지르는 트랜스사이토시스를 야기한다. 장벽을 가로질러 운반될 분자 및 조직 보호 펩티드 간의 결합은 불안정한 공유 결합일 수 있고, 여기서 분자는 장벽을 가로지른 이후에 조직 보호 펩티드와의 결합으로부터 해방된다. 분자의 소정의 약리 활성이 조직 보호 펩티드와의 결합에 의해 유지되거나 이에 영향을 받지 않는 경우, 상기 복합체가 투여될 수 있다.

[0200] 당업자는 공유, 비-공유, 및 기타 수단에 의해, 분자를 본 발명의 조직 보호 펩티드 및 상기 기재한 기타 작용제와 결합시키는 각종 수단을 알 것이다. 더욱이, 조성물의 효능의 평가는 실험 시스템 중 용이하게 측정될 수 있다. 분자와 조직 보호 펩티드와의 결합은 다수의 수단, 예컨대 불안정한, 공유 결합, 가교 등에 의해 달성될 수 있다. 비오틴/아비딘 상호작용이 이용될 수 있고; 예를 들어, 본 발명의 비오틴닐화 조직 보호 펩티드는 바람직하게 운반될 분자 및 아비딘의 불안정한 컨쥬게이트와 복합체화된다. 상기 언급한 바와 같이, 하이브리드 분자는 소정의 약리 활성을 갖는 분자 도메인 및 펩티드 조직 보호 수용체 활성의 조절의 원인이 되는 도메인 모두를 포함하는 재조합 또는 합성 수단, 예를 들어, 융합 또는 키메라 폴리펩티드에 의해 제조될 수 있다. 프로테아제 절단 부위가 분자에 포함될 수 있다.

[0201] 분자는 다관능기성 분자, 즉, 다관능기성 가교기를 통해 본 발명의 조직 보호 펩티드에 컨쥬게이션될 수 있다. 본원에서 사용시, 용어 "다관능기성 분자"는 하나 초과와 반응기를 갖는 분자, 뿐만 아니라 1 회 초과로 연속하여 반응할 수 있는 하나의 관능기를 갖는 분자, 예컨대 포름알데히드를 포함한다. 본원에서 사용시, 용어 "반응기"는 분자 (예를 들어, 내피 세포 장벽을 가로질러 전달될 펩티드, 단백질, 탄수화물, 핵산, 특히 호르몬, 항생제, 또는 항암제) 상의 관능기와 반응하여 가교기 및 상기 분자 간에 공유 결합을 형성하는, 가교기 상의 관능기를 말한다. 용어 "관능기"는 유기 화학에서의 이의 표준 의미를 갖는다. 사용될 수 있는 다관능기성 분자는 바람직하게는 생체적합성 링커이고, 즉, 이는 생체내에서 비발암성, 비독성, 및 실질적으로 비면역원성이다. 다관능기성 가교기, 예컨대 종래 기술에 공지되고 본원에 기재된 것을 동물 모델로 용이하게 시험하여 이의 생체적합성을 측정할 수 있다. 다관능기성 분자는 바람직하게는 2 관능기성이다. 본원에서 사용시, 용어 "2 관능기성 분자"는 2 개의 반응기를 갖는 분자를 말한다. 2 관능기성 분자는 이중 2 관능기성 또는 동종 2 관능기성일 수 있다. 이중 2 관능기성 가교기는 백터 컨쥬게이션을 가능하게 한다. 가교 반응이 수용액, 예컨대 pH 6 내지 8로 완충된 수용액 중 일어나고, 생성되는 컨쥬게이트가 더 효과적 생물-분포를 위해 수용성으로 유지되도록 하기 위하여, 다관능기성 분자는 물에 충분히 가용성인 것이 특히 바람직하다. 전형적으로, 다관능기성 분자는 아미노 또는 설피드릴 관능기와 공유 결합된다. 그러나, 기타 관능기, 예컨대 카르복실산기 또는 히드록실기와 반응성인 다관능기성 분자가 본 발명에 고려된다.

[0202] 동종 2 관능기성 분자는 동일한 2 개 이상의 반응성 관능기를 갖는다. 동종 2 관능기성 분자 상의 반응성 관능기로서, 예를 들어, 알데히드기 및 활성 에스테르기를 들 수 있다. 알데히드기를 갖는 동종 2 관능기성 분자로서, 예를 들어, 글루타르알데히드 및 수바알데히드를 들 수 있다. 글루타르알데히드의 가교제로서의 용도는

[Poznansky 등, Science 223, 1304-1306 (1984)]에 의해 개시되어 있다. 2 개이상의 활성 에스테르 단위를 갖는 동종 2 관능기성 분자로서 디카르복실산 및 N-히드록시석신이미드의 에스테르를 들 수 있다. 상기 N-석신이미딜 에스테르의 일부 예로서 디석신이미딜 수베레이트 및 디티오-비스-(석신이미딜 프로피오네이트), 및 이의 가용성 비스-설포산 및 비스-설포네이트 염, 예컨대 이의 나트륨 염 및 칼륨 염을 들 수 있다. 상기 동종 2 관능기성 시약은 일리노이주, 록포드 소재의 피어스 (Pierce)로부터 이용가능하다.

[0203] 이종 2 관능기성 분자는 2종 이상의 상이한 반응기를 갖는다. 반응기는, 예를 들어, 펩티드 및 분자 상에 존재하는 상이한 관능기와 반응한다. 이종 2 관능기성 가교제 상의 반응기와 반응하는 상기 2종의 상이한 관능기는 보통 아미노기, 예를 들어, 리신의 엡실론 아미노기; 설피드릴기, 예를 들어, 시스테인의 티올기; 카르복실산, 예를 들어, 아스파르트산의 카르복실레이트; 또는 히드록실기, 예를 들어, 세린 상의 히드록실기이다.

[0204] 물론, 본 발명의 각종 조직 보호 펩티드 중 어떤 것은 특정 가교제와 함께 사용하기 위해 이용가능한 적절한 반응기를 갖지 않을 수 있으나; 그러나, 당업자는 본 발명의 조직 보호 펩티드 중 가교에 이용가능한 기에 기초한 가교제의 선택에 대하여 충분히 알 것이다.

[0205] 이종 2 관능기성 분자의 반응기가 아미노기와 공유 결합을 형성하는 경우, 공유 결합은 보통 아미도 결합 또는 이미도 결합일 것이다. 아미노기와 공유 결합을 형성하는 반응성 기는, 예를 들어, 활성화된 카르복실레이트기, 할로카르보닐기, 또는 에스테르기일 수 있다. 바람직한 할로카르보닐기는 클로로카르보닐기이다. 에스테르기는 바람직하게는 반응성 에스테르기, 예를 들어, N-히드록시-석신이미드 에스테르기이다.

[0206] 기타 관능기는 전형적으로 티올기, 티올기로 전환될 수 있는 기, 또는 티올기와 공유 결합을 형성하는 기이다. 공유 결합은 보통 티오에테르 결합 및 이황화 물일 것이다. 티올기와 공유 결합을 형성하는 반응성 기는, 예를 들어, 티올기와 반응하는 이종 결합 또는 활성화된 이황화물일 것이다. 티올기와 반응할 수 있는 이종 결합을 포함하는 반응성 기는 말레이미도기이나, 기타, 예컨대 아크릴로니트릴도 가능하다. 반응성 이황화기는, 예를 들어, 2-피리딜디티오기 또는 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산)기일 수 있다. 반응성 이황화 결합을 포함하는 이종 2 관능기성 시약의 일부 예로서 N-석신이미딜 3-(2-피리딜-디티오) 프로피오네이트 [Carlsson, 등, 1978, Biochem J., 173:723-737], 나트륨 S-4-석신이미딜옥시카르보닐-알파-메틸벤질티오설포네이트, 및 4-석신이미딜옥시카르보닐-알파-메틸-(2-피리딜디티오) 톨루엔을 들 수 있다. N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트가 바람직하다. 티올기와 반응하는 이종 결합을 갖는 반응성 기를 포함하는 이종 2 관능기성 시약의 일부 예로서 석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 및 석신이미딜 m-말레이미도벤조에이트를 들 수 있다.

[0207] 기타 이종 2 관능기성 분자로서 석신이미딜 3-(말레이미도) 프로피오네이트, 설포석신이미딜 4-(p-말레이미도-페닐) 부티레이트, 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸-시클로헥산)-1-카르복실레이트, 말레이미도벤조일-N-히드록시-석신이미드 에스테르를 들 수 있다. 석신이미딜 m-말레이미도벤조에이트의 나트륨 설포네이트 염이 바람직하다. 상기 언급한 이종 2 관능기성 시약 및 이의 설포네이트 염 중 다수는 미국, 일리노이주, 록포드 소재의 피어스 케미컬 코퍼레이션 (Pierce Chemical Co.)으로부터 이용가능하다.

[0208] 상기 기재한 가역적 또는 불안정한 킨주게이션에 대한 필요성은 당업자에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 킨주게이트는 바람직한 약리 활성에 대해 시험관내에서 시험될 수 있다. 킨주게이트가 양쪽 특성 (킨주게이션된 분자의 특성 및 조직 보호 펩티드의 특성)을 보유하는 경우, 이의 적합성이 생체내에서 시험될 수 있다. 킨주게이션된 분자가 활성을 위해 조직 보호 펩티드로부터 분리될 것이 요구되는 경우, 지속성 에리스로포이에틴 또는 지속성 조직 보호 사이토카인과의 불안정한 결합 또는 가역적 결합이 바람직할 것이다. 불안정성 특징은 또한 생체내 시험 이전에 표준 시험관내 절차의 이용으로 시험될 수 있다.

[0209] 상기 뿐만 아니라 기타 다관능기성 시약의 제조 및 사용 방법에 대한 추가의 정보는 하기 공보 또는 종래 기술에서 이용가능한 그 밖의 것으로부터 얻어질 수 있다:

[0210] [Carlsson, J. 등, 1978, Biochem. J. 173:723-737];

[0211] [Cumber, J.A. 등, 1985, Methods in Enzymology 112:207-224];

[0212] [Jue, R. 등, 1978, Biochem 17:5399-5405];

[0213] [Sun, T.T. 등, 1974, Biochem. 13:2334-2340];

[0214] [Blattler, W.A. 등, 1985, Biochem. 24:1517-152];

- [0215] [Liu, F.T. 등, 1979, Biochem. 18:690-697];
- [0216] [Youle, R.J. 및 Neville, D.M. Jr., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:5483-5486];
- [0217] [Lerner, R.A. 등, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3403-3407];
- [0218] [Jung, S.M. 및 Moroi, M., 1983, Biochem. Biophys. Acta 761:162];
- [0219] [Caulfield, M.P. 등, 1984, Biochem. 81:7772-7776];
- [0220] [Staros, J.V., 1982, Biochem. 21:3950-3955];
- [0221] [Yoshitake, S. 등, 1979, Eur. J. Biochem. 101:395-399];
- [0222] [Yoshitake, S. 등, 1982, J. Biochem. 92:1413-1424];
- [0223] [Pilch, P.F. 및 Czech, M.P., 1979, J. Biol. Chem. 254:3375-3381];
- [0224] [Novick, D. 등, 1987, J. Biol. Chem. 262:8483-8487];
- [0225] [Lomant, A.J. 및 Fairbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:243-261];
- [0226] [Hamada, H. 및 Tsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:483-488]; 또는
- [0227] [Hashida, S. 등, 1984, J. Applied Biochem. 6:56-63],
- [0228] 상기 각각의 전문은 본원에서 참고로 인용한다.
- [0229] 추가로, 가교 방법은 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Means 및 Feeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12]에 의해 개관되어 있다.
- [0230] 상기 기재한 방법 및 본 발명의 조성물에 의해 가로질러지는 장벽의 비제한적인 예로서 혈액-뇌 장벽, 혈액-눈 장벽, 혈액-정소 장벽, 혈액-난소 장벽, 혈액-신경 장벽, 혈액-척수 장벽, 및 혈액-태반 장벽을 들 수 있다.
- [0231] 내피 세포 장벽을 가로지르는 운반을 위한 후보 분자로서, 예를 들어, 호르몬 (예컨대, 성장 호르몬), 향신경성 인자, 항생제, 항바이러스제, 또는 항진균제, 예컨대 뇌 및 기타 장벽을 지닌 장기로부터 일반적으로 차단되는 것, 펩티드 방사성 약물, 안티센스 약물, 생물활성제에 대한 항체 및 항바이러스제, 약제, 및 항암제를 들 수 있다. 상기 분자의 비제한적인 예로서 호르몬 (예컨대, 성장 호르몬), 신경 성장 인자 (NGF), 뇌 유래 향신경성 인자 (BDNF), 섬모 향신경성 인자 (CNTF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 전환 성장 인자 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), 전환 성장 인자 $\beta 2$ (TGF $\beta 2$), 전환 성장 인자 $\beta 3$ (TGF $\beta 3$), 인터루킨 1, 인터루킨 2, 인터루킨 3, 및 인터루킨 6, AZT, 종양 괴사 인자에 대한 항체, 및 면역억제제 (예컨대, 시클로스포린)를 들 수 있다. 추가로, 진단 목적을 위하여 염료 또는 마커를 본 발명의 조직 보호 펩티드에 부착하여 뇌 및 기타 장벽을 지닌 기관 내부의 세포, 조직, 또는 기관을 시각화할 수 있다. 예로서, 뇌 내부의 플라크를 시각화하기 위해 사용되는 마커가 조직 보호 펩티드에 부착되어 환자 내부의 알츠하이머병의 진행을 측정할 수 있다.
- [0232] 본 발명은 또한 트랜스사이토시스를 통해 내피 세포 치밀 이음부 장벽을 가로질러 운반될 분자 및 상기 기재한 조직 보호 펩티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 기재한 장벽을 가로지르는 분자의 전달을 위한 약학 조성물의 제조를 위한, 분자 및 상기 기재한 조직 보호 펩티드 사이토키인 간의 컨쥬게이트의 용도에 관한 것이다.
- [0233] 신경 보호 및 트랜스사이토시스의 각종 동물 모델 및 시험관내 시험이 PCT/US01/49479 (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 제시되어 본 발명의 조직 보호 펩티드의 유효성을 증명한다. 트랜스사이토시스에 대하여, 본 발명의 지속성 에리트로포이에틴에 컨쥬게이션된 모델 단백질이 비경구 투여 이후 뇌로의 운반에 대해 평가된다. 시험관내 모델 및 동물 모델에서의 상기 시험은 인간을 비롯한 기타 포유동물 종에서의 본 화합물의 효능을 예측하는 것이다.
- [0234] 본 발명은, 본 발명을 대표하는 것으로서 제시된, 하기 비제한적인 실시예를 참고로 하여 더 잘 이해될 것이다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 더 완전히 예시하기 위해 제공된 것이다. 이는, 그러나, 결코 본 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로서 이해되어서는 않된다.

[0235] **6. 실시예**

[0236] **실시예 1. 펩티드 합성 방법**

- [0237] A. 펩티드 A (서열 32, EPO 아미노산 서열 38-57에 해당함) 및 펩티드 B (서열 34, EPO 아미노산 서열 58-82에 해당함)의 합성.
- [0238] 펩티드 A, 서열 32, 및 펩티드 B, 서열 34, EPO의 단편 (표 1 참고)을 [Band, D., Chopra, N 및 Kent, S., "Total Synthesis of Crambin," J.AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 1377-1383] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 기재된 바와 같이, "제자리 중화" Boc 화학 단계별 고체상 펩티드 합성을 이용하여 합성하였다. 간략히, EPO 아미노산 서열 38-57 (펩티드 C, NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, 서열 29) 및 EPO 아미노산 서열 58-82 (펩티드 D, QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, 서열 30)에 해당하는 2 개의 단편을 -OCH₂-Pam-수지 (유리 ⁴ 카르복시 펩티드) 또는 HSCH₂CH₂CO-Leu-OCH₂-Pam-수지 (⁴ 티오에스테르 펩티드) 상에서 합성하였다. 합성 동안, 각종 아미노산의 측쇄를 하기와 같이 보호하였다: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(4-CH₃Bzl) 또는 Cys(ACM), Glu(OcHex), Lys(2-CI-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Br-Z). 펩티드 사슬을 어셈블링한 후, 펩티드를 탈보호하고 동시에 p-크레솔 (90:10, v/v)을 함유하는 무수 HF를 사용하여 0°C에서 1 시간 동안 처리함에 의해 수지 지지체로부터 절단하였다. 감압 하에 HF를 증발시킨 후, 조 생성물을 침전시키고 냉각된 디에틸 에테르로 트리터레이션하며 (trituated), 펩티드를 0.1%의 TFA를 함유하는 50%의 수성 아세토니트릴에 용해하고 분취 HPLC 시스템에 의해 정제하였다. LC-MS를 이용하여 펩티드 조성물을 확인하였다.
- [0239] **실시예 2. 펩티드 매개의 조직 보호의 확인**
- [0240] 좌골 신경 어세이를 이용하여 조직 보호 펩티드를 임의의 조직 보호 활성에 대하여 시험하였다. 스프래그-다우리 래트 (250 ~ 300 g) (대조군을 비롯한 군당 6 마리)를 이소플루란 (Baxter NPC 10019-773-60) 및 탁상용 실험실 마취 시스템 (유량계는 55 psi에서 2 ~ 3 ℓ/분 으로 설정됨)을 이용하여 적어도 3 분 동안 마취시켰다. 그 후, 래트를 항온성 담요 상에 위치시켜 래트의 심부 온도가 수술동안 35 ~ 37°C에서 유지되는 것을 보장하였다. 직장 프로브를 통해 심부 온도를 모니터링하였다. 마취된 래트의 우 좌골 신경을 사두근 절제를 통해 중간 넓적다리에서 노출시키고; 15 블레이드 스키펬을 이용한 2 cm 절개를 사두근 상부의 평행한 피부를 통해 수행하고, 해부용 가위를 이용하여 사두근을 절단하여 좌골 신경을 노출시켰다. 그 후, 좌골 신경을 주위 막으로부터 분리시켰다. 2-0 꼬아진 실크 사 (에티콘 (Ethicon), 685-G)를 신경 하부로 통과시키고 봉합사의 말단을 신경에 대해 수직으로 유지된 가이드를 통해 통과시켰다. 그 후, 봉합사의 말단을 비탄성 끈에 묶은 후, 이를 도르래 시스템 (안정 장치와 함께 MTD 1/4"B (PO 번호 04174-01)를 갖는 NYL 도르래) 주위에 싸고, 비탄성 끈에 부착된 100 g의 추를 서서히 풀었다. 상기 추가 1 분 동안 매달리게 한 후 실크 봉합사를 절단하여 추를 떼어내었다.
- [0241] 그 후, 289 pmol/kg 투여량의 카르바밀화 에리스로포이에틴, 289 pmol/kg 투여량의 일련의 A-J로부터의 하나의 펩티드 (표 1 참고), 또는 PBS를 1/2 cc의 인슐린 주사기를 이용하여 꼬리 정맥에 주사하였다. 상기 교시를 따르지 않는 색소 상피성 성장 인자 (PEDF)로부터의 20mer 단편 (아미노산 102-121에 해당함)을 대조군으로서 이용하였다.
- [0242] 그 후, 근육 및 수술 절개부를 닫고, 5 ml의 락트산이 가해진 링거액을 래트에게 피하 주사하였다. 회복 동안 고온 담요를 이용하여 래트의 심부 온도를 35 ~ 37°C에서 유지시켰다.
- [0243] 다음 4 일에 걸쳐, 래트를 디지털 스캐너의 스캐닝 표면 상의 30 cm 직경을 갖는 아크릴계 튜브 내에 위치시킴에 의해 래트의 뒷 발가락 벌어진 정도를 측정하였다. 순응시키기 위해 5 분 동안 대기 후, 명백히 모든 5 개의 발가락을 보여주는 래트의 뒷발의 스캔을 취하였다. 각 래트의 3 개의 허용가능한 스캔을 취하였다. 스캔으로부터, 발가락 퍼짐 (첫번째 발가락의 등근 부분 및 다섯번째 발가락의 등근 부분 사이의 거리) 및 중간 발가락 퍼짐 (두번째 발가락의 등근 부분 및 네번째 발가락의 등근 부분 사이의 거리)을 측정하였다. 그 후, 정적 좌골 지수를 [S. Erbayraktar 등, 2003, Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6741-6746] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 따라 계산하고 통계 분석을 수행하였다.
- [0244] B (서열 34), H (서열 47) 및 PEDF 유도체를 제외한 모든 펩티드는 동일한 보호성이었고, PBS/PEDF 단편에 대한 약 -67 내지 약 -68의 SSI와 대조시 약 -0.57의 정적 좌골 지수 ("SSI")를 제공하였다 (도 2). 도 2는 또한 염기성 펩티드의 효능이, 카르바밀화 에리스로포이에틴의 것과 비교시, 개선되지 않는 경우 적어도 동일하였다는 점을 보여준다.
- [0245] 표 1은 또한 시험된 펩티드에 있어서 카르보닐 탄소 간의 대략적 거리를 기재한다. 거리는 본원에서 참고로 이용하는 [Cheetham 등, 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866]에 의해 제공된 3차원 좌표를 이용하여

계산하였다. 조직 보호 활성에 대하여 양성으로 검사된 펩티드 각각은 약 3 Å 내지 약 5 Å의 카르보닐 탄소 대 카르보닐 탄소 거리/간격을 가졌다.

표 1

생체내 바이오아세이름 이용한 대표적 펩티드의 조직 보호 효능 (좌골 신경 손상 모델).

펩티드 종류	펩티드	EPO 서열	구조	카르보닐 탄소 간의 대략적 거리 (옹스트롬)	투여량 [μmoles/kg-bw]	좌골 신경 이세이
A) EPO 단편	A	1-23	APPRLLCDSPRYLERYLLEAKAE (서열 32) APPRLLCDSPRYLERYLLEAKAE (서열 32)	4.6 4.4	29, 290, 1450	+
	B	24-37	NITTCALHGSINE (SEQ ID NO.34)	2.8	290	-
	C	38-57	NITVPDTKYNFYVWRMEVG (서열 29)	4.6	290	+
	D	58-82	QQAVYVWQGLALSLSEAVLRGQALLV (서열 30)	4.8	29, 290, 1450	+
	E	28-47	GCAHCSLNENTVPTDKVN (서열 31)	4.4	290	+
	F	14-29	RYLLEAKAEANTTGC (서열 33)	3.6	290	+
	B) 나선 표면	G	58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84, 85	QEQLERAINSS (서열 40)	3.6	290
H		71, 72, 75, 76, 77	SELRGGQ (서열 47)	7.2	290	-
C) 키메라		I	펩티드 G+ β-병풍 구조 (33- 39)	CSLNENIQEQLERAINSS (서열 43)		290
	QEQLERAINSSLRRYNMLTRTR (서열 41)				290	+
	GM-CSTF 나선 A (13- 26)			WEHVNAIQEARLL (서열 35) WEHVNAIQEARLL (서열 35) WEHVNAIQEARLL (서열 35)	3.6 4.6 4.6	290
D) I형 사이토키인 모티프	L	CNTF 나선 A (26-41)	KIRSDLTALTESYVKH (서열 37)	4.7	290	+

실시예 3. 조직 보호 펩티드는 비-적혈구 조혈성임

A. 시험관내 평가:

UT-7epo, 인간 에리스로포이에틴 의존적 백혈병 세포주를 펩티드의 적혈구 조혈 효능의 측정을 위해 사용하였다. UT-7epo 세포 (도이체 잠루크 본 마이크로오가니즘 언트 쉐콜투렌 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). cat. No. ACC 363)를 10%의 FBS 및 5 ng/ml의 에리스로포이에틴을 갖는 완전 RPMI-1640 배지 중 성장시켰다. 에리스로포이에틴에 노출된 세포의 증식/성장 (= 생존력 증가) 반응은 전형적 적혈구형 에리스로포이에틴 수용체에 의해 매개되며 이는 에리스로포이에틴 변이체가 전형적 에리스로포이에틴 수용체를 자극하는 능력의 정량적 측정치이다.

- [0250] UT-7epo 세포를 10%의 기증자 태아 혈청, 4 mM의 L-글루타민을 함유하고, 5 ng/ml의 재조합 인간 에리스로포이에틴이 보충된 새로운 완전 RPMI 1640 배지로 옮겼다. 세포를 5%의 CO₂를 갖는 가슴 항온배양기 중 플라스크당 20 ml의 배지를 갖는 75 cm²의 플라스크 내에서 37°C에서 48 시간 동안 유지시켰다. 어세이의 2 일째, 즉, 48 시간째, 세포를 플라스크로부터 50 ml의 원뿔 튜브로 옮기고, 실온에서 5 분 동안 1,000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고 세포를 10 ml의 기아 배지 (3%의 기증자 태아 혈청, 4 mM의 L-글루타민)로 2 회 세정하였다. 그 후, 피펫의 상하 운동을 이용하여 세포를 기아 배지에 재현탁시켜 단세포 현탁액을 얻었다. 재현탁된 세포를 기아 배지로 희석하여 4 x 10⁵ 세포/ml의 밀도를 얻고, 25 cm²의 플라스크당 10 ml의 총 배양 부피로 평판 배양하였다. 4 시간의 항온 배양 이후, 세포를 다시 50 ml의 원뿔 튜브로 옮겼다. 대조군 세포를 5 ng/ml의 rhu-에리스로포이에틴을 이용하여 시종일관 유지시켰다.
- [0251] 세포를 기아 배지 중 200,000 세포/ml까지 희석시키고, 96 웰 평판 중 100 μl/웰 로 평판 배양시키며, 각종 농도의 에리스로포이에틴, 카르바밀화 에리스로포이에틴, 및 펩티드 D, 서열 30에 노출시켰다. 3%의 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 중 일련의 10 배 희석액을 사용하여 0.2 pM 내지 20 nM의 시험 화합물 농도를 생성하였다. 추가의 48 시간의 항온배양 후, 15 ml의 WST-1 세포 증식 시약 (로셰, Roche)의 용액을 각 웰에 첨가하고, CO₂ 중 37°C에서 1 시간 동안 항온배양하였다. 1 분 동안 혼합한 후, 평판을 평판 판독기 (650 nm에서의 바탕 흡수로부터 감해진, 450 nm에서의 흡수) 내에서 판독하였다.
- [0252] 펩티드 D는 10,000 pM 만큼의 높은 투여량에서 적혈구 조혈 활성을 나타내지 않았다 (도 3). 바람직하게는, 펩티드는 1 μg/ml보다 낮은 투여량, 더 바람직하게는 10 μg/ml보다 낮은 투여량에 있어서 적혈구 조혈 활성을 갖지 않을 것이다.
- [0253] **B. 생체내 평가:**
- [0254] 조직 보호 펩티드 F (서열 33) 또는 펩티드 G (서열 40, 나선 B에 존재하는 잔기로부터 구축된 상기 기재한 펩티드)의 적혈구 조혈 활성을 평가하기 위하여, 펩티드를 수컷 스프래그-다우리 래트에게 0.8 μg/kg으로 주당 3 회 피하 투여하였다. 투여 일정은 최대 적혈구 조혈성을 유도하도록 앞서 결정된 EPO의 동일 투여량 (몰 기준)에 해당한다. 자동 분석기 (케스카 코포레이션, Keska Corporation)를 이용하여 헤모글로빈 농도를 주기적으로 측정하였다.
- [0255] 펩티드 B나 펩티드 C는 연구 과정에 걸쳐 적혈구 용적률의 증가를 나타내지 않았다 (도 4; EPO의 동일 몰 투여량에 대한 반응이 비교를 위해 제공됨). 3 주 이후 EPO에 대해 기록된 헤모글로빈의 감소는 순 적혈구 무형성을 야기하는 항-EPO 중화 항체의 생성으로 인한 것이다. 이와 달리, 펩티드 G 또는 펩티드 F에 대하여 어떠한 중화 항체 반응도 관측되지 않았다.
- [0256] **실시예 4. 펩티드는 시험관내 어세이에서 조직 보호성임**
- [0257] 다수의 시험관내 어세이를 이용하여 펩티드를 조직 보호성에 대하여 용이하게 평가할 수 있다. 예를 들어, 흥분독성으로부터의 보호는 마우스 운동 신경세포의 카이닛 유도 죽음의 이용으로 측정될 수 있다. 앞서 기재되어 있는 바와 같이, 15 일령 스프래그-다우리 래트 태아로부터 척수를 얻었다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Siren 등, 2001, PNAS 98:4044]). 전각을 트립신 처리하고 300 X g에서 10 분 동안 4%의 BSA 쿠션 (cushion)을 통해 원심분리하였다. 세포 (혼합 신경세포-아교세포 배양액을 나타냄)를 폴리-DL 오르니틴 및 라미닌으로 미리 코팅된 24 mm 웰 평판에 2,000 세포/cm²의 밀도로 부착하였다. 면역패닝 (immunopanning)에 의해 운동 신경세포를 더 정제하고, 세포를 폴리-DL 오르니틴 및 라미닌으로 미리 코팅되고, 완전 배양 배지 [신경 기초 (Neurobasal)/B27 (2%); 0.5 mM의 L-글루타민; 2%의 말 혈청; 25 mM의 2 머캅토에탄올; 25 mM 글루타메이트; 1%의 페니실린 및 스트렙토마이신; 1 ng/ml의 BDNF]를 함유하는 24 mm 웰 평판 상에 저밀도 (20,000 세포/cm²)로 부착하였다. 배지 (글루타메이트 부재)를 4 일 및 6 일째 배양액에 재첨가하였다.
- [0258] 카인산 (혼합 신경세포-아교세포 배양액에 대하여 5 mM; 정제된 배양액에 대하여 50 mM)과 함께 48 시간 동안 항온배양함에 의해 6 일째 배양액 중 세포사를 유도하였다. 펩티드 D (5 ng/ml) 또는 비히클을 세포사 유도 72 시간 전에 배양액에 첨가하고, 처리를 48 시간 동안 지속하였다. 그 후, 배지를 폐기하고 세포를 PBS 중 4% (부피/부피)의 파라포름알데히드에 의해 40 분 동안 고정하고, PBS 중 10% (부피/부피)의 FCS로 차단된, 0.2%의 트리톤 X-100으로 투과시키며, 비-인산화 신경세포 (SMI-32; 1:9,000)에 대한 항체와 함께 밤새 항온배양하고, 디아미노벤지딘을 이용한 아비딘-비오틴 방법을 이용하여 시각화하였다. 커버 슬립의 4 개의 슬라이드 너머 SMI-32 양성 세포를 계수함에 의해 운동 신경세포의 생존력을 형태상으로 평가하고, H33258을 이용하여 아포토

시스템의 염색을 수행하였다.

[0259] 펩티드 D (서열 30, 서열 1의 아미노산 58-82에 해당함)는 운동 신경세포를 카이네이트에 의해 야기된 손상으로 부터 완전히 보호하였다 (도 5).

[0260] 대안으로, 신경세포와 유사하고 혈청의 투여 중지시 아포토시스를 통해 죽는 마우스 P19 세포를 이용하는 어세의 이용으로, 펩티드에 의해 제공된 조직 보호성을 측정할 수 있다. 앞서 공개되어 있는 바와 같이, P19 클론 P19S1801A1을 이용하여 펩티드 D (서열 30)의 조직 보호성을 EPO의 것과 비교하였다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Siren 등, 2001, PNAS 98:4044]). 세포는, 이하 완전 배지로서 일컬어지는, 2 mM의 L-글루타민; 100 단위/ml의 페니실린 G; 100 mg/ml의 스트렙토마이신 설페이트 (GIBCO); 1.2 g/l의 NaHCO₃ 및 10 mM의 HEPES 완충제를 함유하는 10% (부피/부피)의 FBS (하이클론, HyClone)이 보충된 DMEM 내에서 분화되지 않은 채 유지되었다. 무혈청 배지는 상기와 동일 성분을 함유하나, 단 혈청이 제거되고 5 mg/ml의 인슐린; 100 mg/ml의 트랜스페린; 20 nM의 프로게스테론; 100 nM의 푸트레신; 30 nM의 Na₂SeO₃ (시그마 (Sigma)사 제)가 첨가되었다. 실험을 위하여, 50%의 합류 세포를 EPO 또는 비히클을 이용하여 밤새 전처리하고, 트립신으로 해리하고, 무혈청 배지로 세정하며, 단독 또는 EPO가 첨가된 무혈청 배지 중 10⁴ 세포/cm²의 최종 밀도로 25 cm²의 조직 배양 플라스크 중 평판 배양하였다. 트리판 블루 배제 및 혈구 계산기에 의해 세포 생존력을 측정하였다.

[0261] 펩티드 C, 서열 29 (서열 1의 아미노산 38-57에 해당함)는 p19 세포의 아포토시스를 예방하는 데 있어서 EPO보다 중량 기준으로 적어도 10 배 더 강력하였다 (도 6).

[0262] **실시예 5. 중간 대뇌 동맥 폐쇄 모델**

[0263] 이탈리아, 칼코 소재의 찰스 리버 (Charles River)로부터 중량 250 ~ 280 g의 수컷 Cr1:CD(SD)BR 래트를 입수하였다. [Brines 등, 2000, PNAS USA 97:10526-10531] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)의 교시에 따라 수술을 수행하였다. 간략히, 클로랄 히드레이트 (400 mg/kg-bw, 복막내)를 사용하여 래트를 마취시키고, 경동맥을 시각화하며, 우측 경동맥을 2 번 레매어 폐쇄하고 절단하였다. 우측 안와에 인접한 문측 천두공은, 코 동맥 말단에 조각된, 중간 대뇌 동맥 ("MCA")의 시각화를 가능하게 하였다. 상기 고정된 MCA 병변 주위에 반음영 (가장자리 구역)을 생성하기 위하여, 대측성 경동맥을 미세 핀셋에 의해 제공된 견인력을 이용하여 1 시간 동안 폐쇄한 후 재개방하였다.

[0264] 스프래그-다우리 래트 (군당 8 마리)에 상기 기재한 MCAO 프로토콜을 실시하였다. 폐쇄의 해방시 래트에 PBS, 카르바밀화 에리스로포이에틴 (44 µg/kg), 또는 펩티드 D (aa 58-82; 4.4 µg/kg)를 투여하였다. 추가로, 펩티드 D (aa 58-82; 4.4 µg/kg)를 폐쇄 이후 2 시간 간격으로 개별 군에 4 회의 투여량으로 투여하였다. 손상의 평가를 위하여, 래트에 행동 시험을 실시하거나, 또는 앞서 기재한 프로토콜에 따라 수술 후 24 시간에 수행된 뇌 구획의 테트라졸륨 염색에 의해 병변의 부피를 측정하였다.

[0265] 도 7a는 MCAO 프로토콜로부터 발생한 병변의 부피를 증명하는 그래프를 제공한다. 펩티드 D (서열 30)의 단회 투여 또는 다회 투여에 의한 처리는 MCAO 수술로부터 발생한 병변 부피를 약 2/3 만큼 (카르바밀화 에리스로포이에틴의 조직 보호 효과와 통계적으로 동일함) 감소시켰다.

[0266] **(b) 조직 보호 펩티드의 치료 범위**

[0267] 상기 약술된 MCAO 프로토콜을 본 실시예에 대하여 반복하였다. 폐쇄 절차 이후, PBS, 카르바밀화 에리스로포이에틴 (44 µg/kg, 정맥내), 또는 펩티드 D (서열 30) (4.4 µg/kg)를, 경동맥 내에 재순환이 확립된 직후 (즉, 허혈의 발병 이후 1 시간에) 래트에게 투여하였다. 또한, 펩티드 D (서열 30)를 폐쇄 이후 2 시간 간격으로 4 회 투여량 (각각 4.4 µg/kg-bw)으로 투여하였다 (군당 8 마리의 래트).

[0268] **(c) 행동 시험**

[0269] 래트의 개별 군을 또한 풋 폴트 행동 프로토콜로 시험하였다. [Markgraf 등, 1992, Brain Research 575:238-246] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)의 프로토콜에 따라, 30 mm의 격자 크기를 갖는 30 cm x 30 cm의 높여진 스테인리스 강 격자 바닥 상에서 래트를 시험하였다. 격자 상에 위치되는 경우, 래트는 돌아다리고 하고, 때때로 발을 격자 상에 위치시키기보다 격자 틈을 통해서 떨어뜨릴 것이다 ("풋 폴트"). 풋 폴트의 수를 1 분 간격으로 측정하였다.

[0270] 재판류 이후 펩티드 D (서열 30)로 처리된 래트는 PBS로 처리된 래트보다 더 적은 풋 폴트를 겪었다 (도 7b). 다회 투여량의 펩티드 D (서열 30)의 투여 이후 어떠한 유의한 추가의 이점도 관측되지 않았다. 비록 풋 폴트

의 평균 수는 펩티드의 다회 투여량을 투여받은 군에서 더 적었지만, 관측된 차이는 단회 투여량을 투여받은 군으로부터 유의하게 상이하지 않았다.

[0271] **실시예 6. 당뇨병성 신경병증**

[0272] 앞서 기재되어 있는 바와 같이, 단식 래트에 60 mg/kg의 복막내 단회 투여량으로 투여된 스트렙토마이신을 이용하여 수컷 스프래그-다우리 래트 (이탈리아, 칼코 소재의 찰스 리버)에 당뇨병을 유도하였다 (본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Bianchi 등, 2004, Proc Natl Acad Sci U S A 101, 823-828]). 300 mg/dl (mg %) 초과인 증가된 혈청 글루코스 수준 (정상 수준은 < 100 mg %임)에 의해 당뇨병을 확인하였다. 그 후, 당뇨병 동물에 펩티드 D (서열 30; 4 µg/kg) 또는 비히클을 주당 5 회 복막내 투여하였다. 당뇨병 상태의 유도 후 2 주에, 꼬리 신경을 이용하여 신경 전도 속도를 측정하였다.

[0273] 도 8a에 도시된 바와 같이, 당뇨병 동물은 약 22 m/s (정상)로부터 약 19 m/s까지의 꼬리 신경 전도 속도의 감소를 나타내었다. 펩티드 D (서열 30)의 투여는 약 23 m/s까지의 전도 속도의 증가와 연관된다.

[0274] 추가로, "고온판" 시험으로 발이 움츠러드는 시간을 측정함에 의해 열 자극 역치를 측정하였다. 움츠림 잠재기는 고온판 상에 위치시킴 및 뒷발을 움츠리고 뺄는 시간 사이의 시간으로서 정의된다. 각 동물을 30 분의 휴식 간격으로 분리시켜 2 회 시험하였다. 뒷발 열 역치를 당뇨병의 유도 이후 4 주에 측정하였다. 펩티드 D (서열 30)는 당뇨병 동물에서 고온판에 대해 걸린 잠재기 시간을 감소시켰다 (도 8b).

[0275] **실시예 7. 좌골 신경 및 신장의 시스플라티늄 유도의 손상으로부터의 보호**

[0276] 본원에서 그 전문을 참고로 인용하는 [Bianchi 등, 2006, Clin Cancer Res 12: 2607-2612]에 기재된 바와 같이, 시스플라티늄 (CDDT)를 수컷 스프래그-다우리 래트에 2 mg/kg으로 주당 2 회로 5 주 동안 복막내 투여하였다. 동물을 각각 6 마리의 군으로 분리하였다. 5 주의 CDDT 투여 동안, 동물은 또한 주당 3 회 0.4 µg/kg-bw의 펩티드 G (서열 40) 또는 PBS를 복막내 투여받았다. 대조군은 CDDT 대신 PBS를 투여받았다. 고온판 잠재기를 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이 측정하였다.

[0277] CDDT 및 오로지 PBS만을 투여받은 동물은 대조군과 비교시 잠재기의 증가를 나타내었고: 즉, CDDT는 손상된 열민감성과 연관된다. 이와 달리, 펩티드를 투여받은 동물은 정상 고온판 잠재기를 나타내었다 (도 9a).

[0278] 펩티드 처리는 또한 CDDT 유도의 당뇨병을 예방하였다 (도 9b). 구체적으로, PBS를 투여받은 동물은 약 30 ml/일 로부터 약 47 ml/일 까지 일일 소변 생성량의 유의한 증가를 나타내었다. 이와 달리, 조직 보호 펩티드를 투여받은 동물은 CDDT 대신 PBS를 투여받은 대조군 동물과 유의하게 상이하지 않았다.

[0279] **실시예 8. 당뇨병 유도의 망막 혈관 누출로부터의 보호**

[0280] 조직 보호 펩티드가 고혈당 유도의 망막 혈관 누출에 미치는 이로운 효과는 당뇨병성 망막병증의 래트 모델의 이용으로 측정될 수 있다. 상기 모델에서, [Xu 등, 2001, Invest. Ophthalm. Vis. Sci 42: 789-794] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 의해 기재된 바와 같이, 에반스 블루를 사용하여 혈관으로부터 조직으로의 누출을 측정한다. 에반스 블루는 알부민에 밀접하게 결합되고, 따라서, 예컨대 제어되지 않은 진성 당뇨병에 의해 야기되는 혈관벽의 누출이 발생하지 않는 경우, 순환 내부에 보유된다.

[0281] 상기 모델에서, 단식 수컷 스프래그-다우리 래트는 스트렙토조토신 (60 mg/kg, 복막내)의 단회 투여량을 투여받는다. 2 일 후, 진성 당뇨병의 발생 (300 mg % 초과인 단식 혈청 글루코오스)의 입증 이후, 동물을 각각 6 마리의 동물의 군 뿐만 아니라 스트렙토조토신이 투여되지 않은 대조군으로 분류하였다. 2 개의 당뇨병 군에 4 µg/kg의 펩티드 D (서열 30)를 주당 5 일 복막내 투여하거나 PBS를 동일 일정으로 투여하였다. 3 주의 제어되지 않은 당뇨병 이후, 동물을 마취시키고 에반스 블루 염료 (30 mg/kg)를 정맥내 투여하여, 이것이 2 시간 동안 순환되게 하였다. 경심 천자를 이용하여, 동물을 그 후 유출액이 투명해질 때까지 PBS로, 이어서 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 그 후, 눈을 제거하여 망막을 주의 깊게 안구로부터 절개하였다. 망막을 포름아미드 중 80°C에서 18 시간 동안 항온배양함에 의해 에반스 블루의 망막 함량을 측정하였다. 그 후, 상청액을 제거하여 분석을 위해 보존하고 망막을 완전히 건조하여 측정하였다. 상청액 중 에반스 블루의 농도를 분광광도계에 의해 측정하고, 포름아미드에 용해된 에반스 블루의 표준 곡선을 확립하였다.

[0282] 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 펩티드 D (서열 30)를 투여받은 동물은 대조군과 비교시 망막 내부에 에반스 블루 염료의 증가를 경험하지 않았다. 이와 달리, PBS만을 투여받은 당뇨병 동물은 망막의 에반스 블루 함량의 증가를 나타내었고, 이는 혈관 누출이 발생했음을 지시한다.

[0283] **실시예 9. 급성 신부전으로부터의 보호**

[0284] 조직 보호 펩티드는 또한 허혈의 환경에 있는 신장에 대한 손상을 예방하는 데 효과적이다. 성인 수컷 위스타(Wistar) 래트를 마취시키고, 복부 절개를 실시하여 양쪽 신장 동맥을 시각화하였다. 비외상성 혈관 결자를 이용하여, 양쪽 동맥을 60 분 동안 압축하여, 신장 혈류를 완전히 정지시켰다. 그 후, 상기 결자를 제거하여 순환을 회복시키고, 펩티드 F (서열 33) 또는 펩티드 G (서열 40)를 290 pmol/kg-bw으로 정맥내 투여하였다. 허혈을 겪는 추가의 군은 오로지 PBS만을 정맥내 투여받았다.

[0285] 재관류 후 72 시간에, 동물을 마취시키고 파라포름알데히드를 이용하여 관류 고정을 실시하였다. 고정된 동물을 반으로 시상 절단하고, 실온에서 10%의 포름알데히드에 1 일 동안 침지시킴에 의해 더 고정하였다. [Sharples 등, 2005, J Amer Soc Nephrol: 15: 2115] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)의 프로토콜에 따라 신장의 조직학적 평가를 수행하였다. 간략히, 등급별 에탄올을 이용한 탈수 이후, 신장 조각을 파라핀에 포매시키고, 5 μm의 절편으로 절단하며, 유리 슬라이드 상에 올려 놓았다. 슬라이드 상의 절편을 크실렌에 의해 파라핀 제거하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 대조 염색하며, 광학 현미경 하에서 검사하였다. 각 신장에 대하여 100 개 부위를 검사하고, 각 관상 프로파일에 대하여 0 내지 3의 점수를 부여하였다: 0, 정상 조직; 1, 관상 세포 팽윤, 솔 변연 상실, 및 1/3 이하의 핵 소실을 갖는 핵 응축; 2, 점수 1에 있어서, 그러나 1/3 초과 및 2/3 미만의 핵 소실을 나타내는 관상 프로파일; 및 3, 2/3 초과의 핵 소실을 나타내는 관상 프로파일. 모든 점수를 더함에 의해 각 신장에 대한 조직학적 점수를 계산하였고, 최대 점수는 300이었다.

[0286] 펩티드 F (서열 33) 또는 펩티드 G (서열 40)의 투여는 대조군과 비교시 손상 점수의 유의한 감소 (p < 0.05)와 연관되었다.

[0287] **실시예 11. 뇌 말라리아에서의 조직 보호 펩티드의 효능**

[0288] 뇌 말라리아의 설치류 모델을 [Kaiser 등, 2006, J. Infect. Dis. 193:987-995] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 따라 생성하였다. 7 주령 암컷 CBA/J 마우스를 20 마리의 동물 군으로 분리하였다. 각 군을 10⁶ Pba의 감염된 적혈구의 투여량으로서 복막내 투여된 플라즈모디움 베르게이 안카 (*Plasmodium berghei Anka*, Pb A)로 감염시켰다. 마우스에게 4, 5, 및 6 일째 PBS 또는 펩티드 F (서열 33)를 2.6 μg/kg의 투여량으로 복막내 주사로서 투여하였다. 임상 상태 및 혈액 도말 표본 데이터를 후처리 (말기 D30) 동안 수집하였다. Kaplan-Meier 방법에 따라 누적 장기간 생존을 계산하고, 군을 로그 순위 검정법과 비교하였다. 생존 시간은 의존적 변수였다. < 0.05의 p-값을 유의한 것으로 생각하였다.

[0289] 도 12에 도시된 바와 같이, 대조군 (염수)의 모든 마우스는 8 일까지 사망하였다. 이와 달리, 펩티드 F (서열 33)를 투여받은 마우스는 연장된 생존을 나타내었고, 로그 순위 검정법의 이용시, 대조군으로부터 유의하게 상이하였다 (p < 0.005).

[0290] **실시예 12. 류린 EAE 모델에서의 조직 보호 펩티드의 효능**

[0291] 실험적 자가면역 뇌척수염 ("EAE")을 [Savino 등, 2006, J Neuroimmunol 172:27-37] (본원에서 그 전문을 참고로 인용함)에 따라 C57BL/6 암컷 마우스 (6 ~ 8 주령)에 유도하였다. 8 mg/ml의 결핵균 (균주 H37RA; 미국, 미시간주, 데트로이트 소재의 디프코 (Difco))이 보충된 불완전 프로인트 아주반트 (미국, 미주리주, 세인트 루이스 소재의 시그마 (Sigma)) 중 총 200 μg의 MOG35 - 55 (미국, 캘리포니아주, 샌디에이고 소재의 멀티펩티드 시스템스 (Multiple Peptide Systems))를 이용한 요구리의 피하 면역화에 의해 EAE를 유도하였다. 동물을 특정 병원균이 없는 조건에 두고, 음식 및 물에 대한 접근을 임의로 가능하게 하였다. 면역화 시점 및 48 시간 이후에 마우스에 500 ng의 퍼투신 (pertussin) 독소 (시그마)를 정맥내 투여하였다. 중량 및 임상 점수를 매일 기록하였다 (0 = 건강함, 1 = 이완된 꼬리, 2 = 운동 실조 및/또는 뒷다리 부전 마비, 또는 느린 직립 반사, 3 = 뒷다리 마비 및/또는 앞다리 부전 마비, 4 = 앞다리 대부전 마비, 5 = 빈사 상태 또는 사망). 음식 펠렛 및 음료수를 우리의 바닥 상의 페트리 판 상에 놓아 아픈 마우스가 먹고 마실 수 있게 하였다. 면역화 이후 4 일째 시작하여, 펩티드 E (서열 31)를 4.4 μg/kg-bw의 투여량으로 매일 피하 투여하였다.

[0292] 펩티드 E (서열 31)의 투여는 처치된 동물에 있어서 EAE를 임상적으로 나타내는 시간 진행 및 심각성 모두를 유의하게 감소시켰다 (p < 0.01) (도 13).

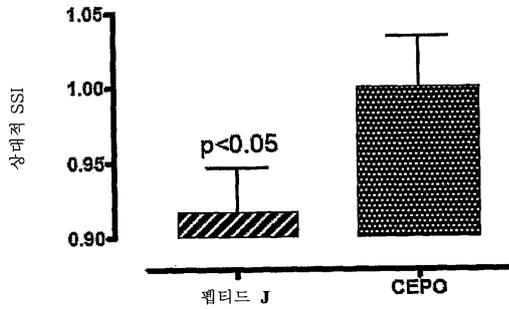
[0293] 본 발명은 본 발명의 개별 측면에 대한 단일 예시로서 의도된, 기재된 특정 실시양태에 의해 그 범위가 제한되지 않고, 기능적으로 동일한 방법 및 성분이 본 발명의 범위 이내에 있다. 실제, 본원에 도시되고 기재된 것에 추가하여, 본 발명의 각종 수정이 전술한 설명 및 첨부되는 도면으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 상기 수

정은 첨부된 특허청구범위 이내에 있는 것으로 의도된다.

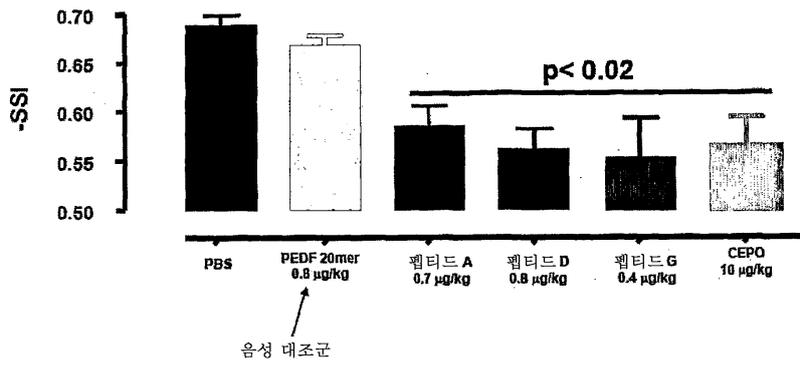
[0294] 본원에 인용된 모든 참고 문헌은 그 전문을 본원에서 모든 목적상 참고로 인용한다.

도면

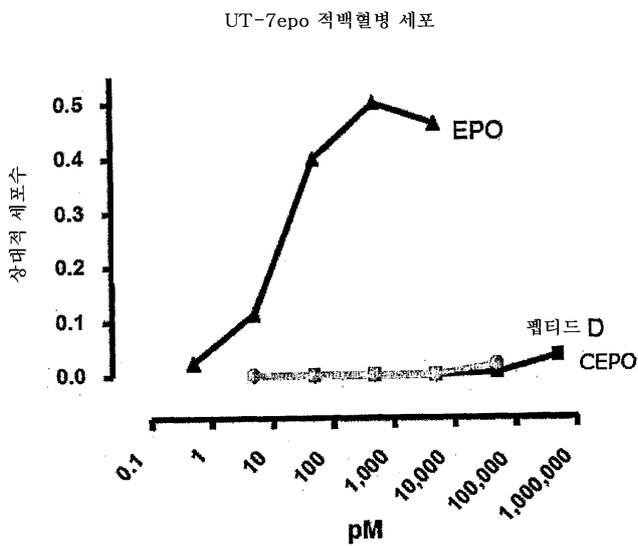
도면1



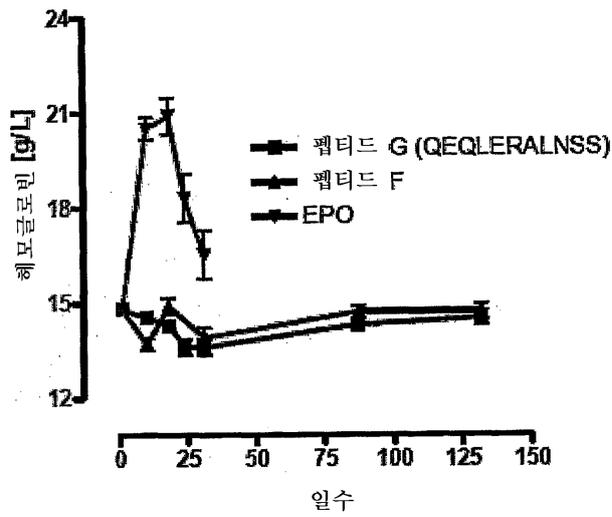
도면2



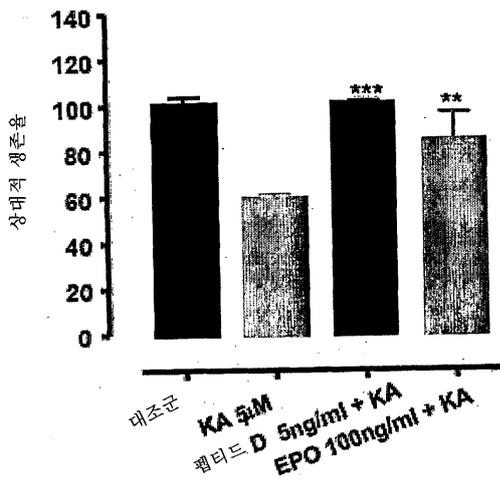
도면3



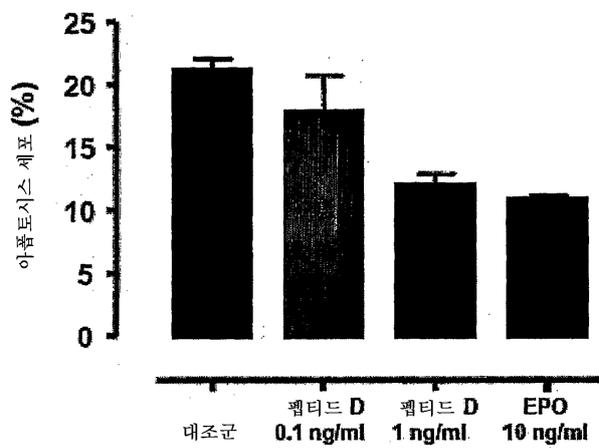
도면4



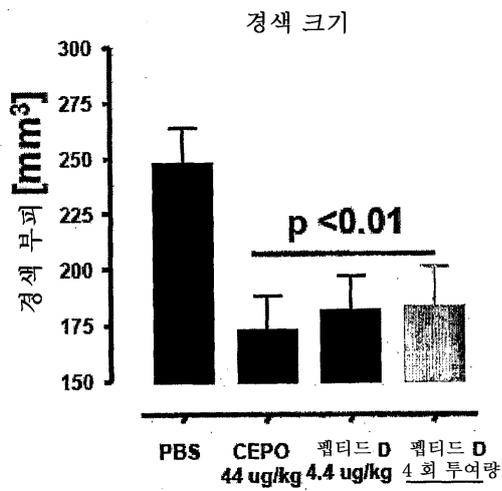
도면5



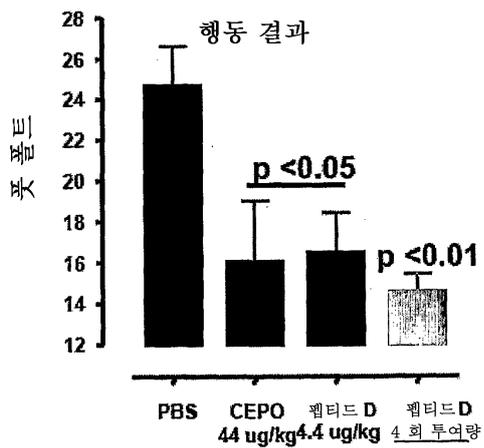
도면6



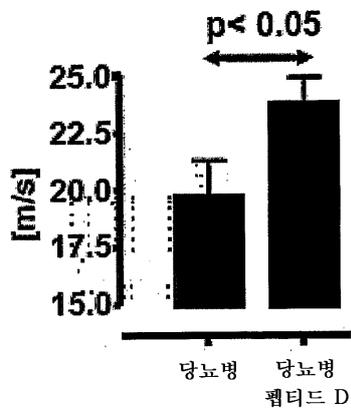
도면7a



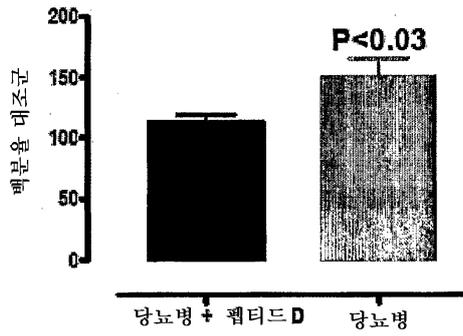
도면7b



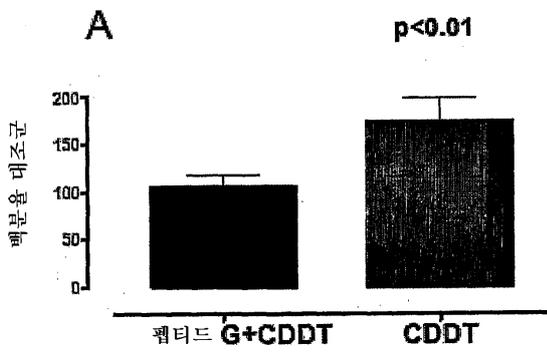
도면8a



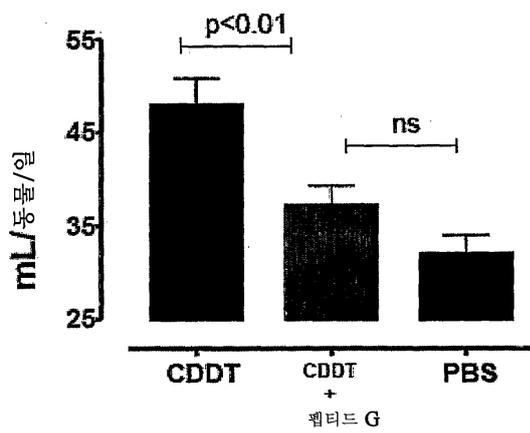
도면8b



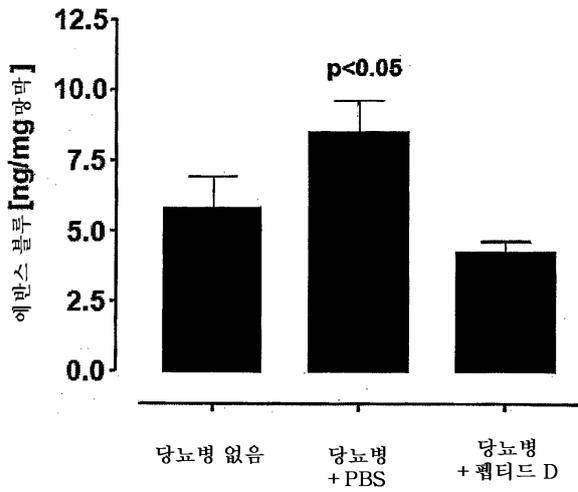
도면9a



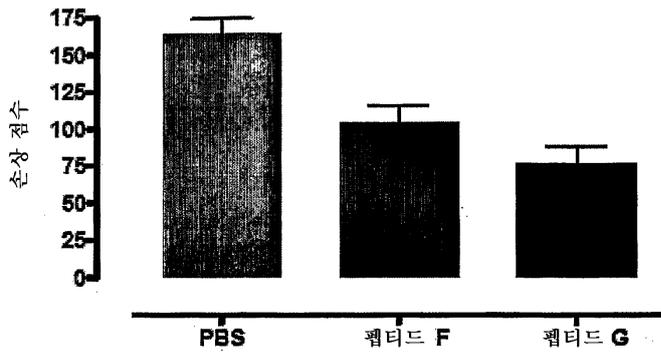
도면9b



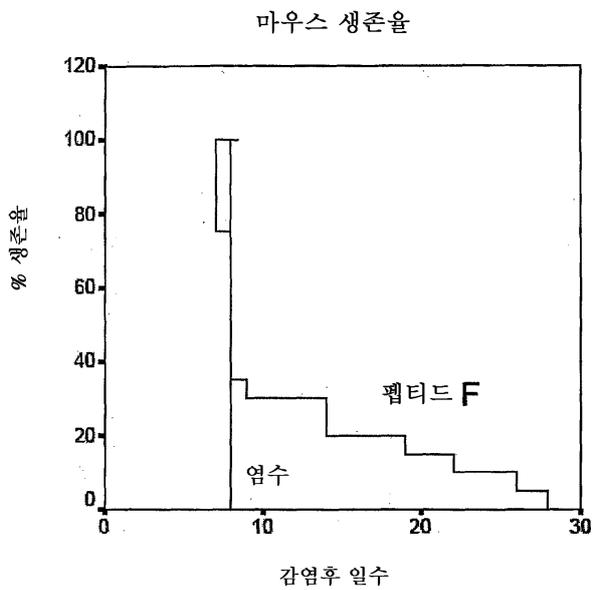
도면10



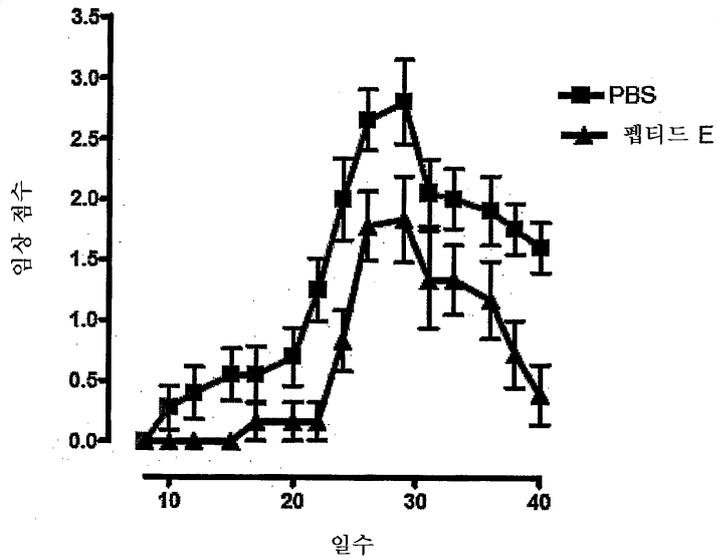
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Brines, Michael
- Cerami, Anthony
- Coleman, Thomas
- <120> Tissue Protective Peptides and Uses
- Thereof
- <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 for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Erythropoietin peptide

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> EPO amino Acids 44-49 associated with a high
 affinity receptor binding site 1

<400> 2

Thr Lys Val Asn Phe Tyr

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EPO amino acids 146-151 associated with a high
affinity receptor binding site 1

<400> 3

Ser Asn Phe Leu Arg Gly

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EPO amino acids 11-15 interacting with a low
affinity receptor binding Site 2

<400> 4

Val Leu Glu Arg Tyr

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EPO amino acids 100-104 interacting with a low
affinity receptor binding site 2

<400> 5

Ser Gly Leu Arg Ser

1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Isolated polypeptides comprising amino acid
structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1,4

<223> Xaa = any hydrophobic amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 2,3

<223> Xaa = any negatively charged amino acid (same or
different)

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1,5

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 2, 4

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any amino acid

<400> 7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1, 6

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 2,5

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1, 7

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 2,6
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 3,4,5
<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<400> 9
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising amino acid structural motif A
<220><221> VARIANT
<222> 1,8

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 2, 7
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 3,4,5,6
<223>

Xaa = Any amino acid (same or different)
<400> 10
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1, 9

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 2, 8

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5,6,7

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<400> 11

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2, 3

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 12

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ariant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2,4

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 3

<

223> Xaa = Any amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 13

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2,5

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2, 6

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or

different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2, 7

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5,6

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 16

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising

amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2, 8

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5,6,7

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Any polar amino acid

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising

amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT
<222> 2,3
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)
<220><221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid
<400> 18
Xaa Xaa Xaa Xaa
1
<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A
<220><221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa = Any polar amino acid
<220><221> VARIANT
<222> 2,4
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)
<220><221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = Any amino acid
<220><221> VARIANT
<222> 5
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid
<400> 19
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 20

<211

> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2, 5

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<400

> 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2,6
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 3,4,5
<223> Xaa = Any amino acid (same or different)
<220><
221> VARIANT
<222> 7
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid
<400> 21
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising amino acid structural motif A
<220><221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa = Any polar amino acid
<220><221> VARIANT
<222> 2,7
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5,6
<223> Xaa = Any amino acid (same or different)
<220><221> VARIANT
<222> 8
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid
<400> 22

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2,8

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 3,4,5,6,7

<223> Xaa = Any amino acid (same or different)

<220><221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<400> 23

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1,4

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid (same or
different)

<220><221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any positively charged amino acid

<400> 24

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A

<220><221> VARIANT

<222> 1,5

<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Any positively charged amino acid

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A
<220><221> VARIANT
<222> 1,4
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid

<220><221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa = Any positively charged amino acid
<220><221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = Any negatively charged amino acid
<400> 26
Xaa Xaa Xaa Xaa
1
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Variant of isolated EPO polypeptides comprising
amino acid structural motif A
<220><221> VARIANT
<222> 1,5
<223> Xaa = Any hydrophobic amino acid
<220><221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa = Any positively charged amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Any polar amino acid

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Any negatively charged amino acid

<400> 27

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amphipathic helix from pancreatic polypeptide

<400> 28

Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide C - loop AB and N-terminal portion of
helix B corresponding to EPO amino acids 38-57

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide D - the C-terminal portion of helix B
 corresponding to EPO amino acids 58-82

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide E - a portion of the A-B loop consisting
 of a small cysteine loop and a Beta-pleated sheet
 corresponding to EPO amino acids 28-47

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide A - consists of the N-terminal portion of
 Helix A corresponding to EPO amino acids 1-23

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide F - consists of EPO amino acids 14-19

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide B - consists of EPO amino acids 24-37

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> TPO helix A fragment

<400> 36

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His

1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CNTF helix A fragment

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Interleukin 3 (IL-3) helix A fragment

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide G - All exterior-presenting amino acids of
helix B of EPO

<400> 40

Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn Ser Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide J - A chimera peptide of Peptide G linked
to pancreatic polypeptide helix

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Beta-pleated sheet found within AB loop of EPO

<400> 42

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile

1 5

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide I - A chimera peptide linking the helix B exterior-presenting amino acids to the beta pleated sheet found within the AB loop of the 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Terminal portion of helix C corresponding to amino acids 111,112,113,116, and 118 of EPO

<400> 44

Ala Leu Gly Lys Ala

1 5

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Loop CD-partial corresponding to amino acids

112-133 of 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> Artificial Sequence

<220>

<223> amino acid fragment of Peptide F

<400> 46

Glu Ala Lys Glu

1

<210> 47

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide H - consists of EPO amino acids 61, 72,
75, 76, 77

<400> 47

Ser Glu Leu Arg Gly Gln

1

5

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Calcitonin

<400> 48

Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser

1

5

10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Corticotrophin Releasing Hormone

<400> 49

Val Ala Leu Leu Pro Cys Pro Pro Cys Arg Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 11

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Beta Endorphin

<400> 50

Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly

1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Secretin

<400> 52

Gly Gly Ser Ala Ala Arg Pro Ala Pro Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Parathyroid Hormone

<400> 56

Val Met Ile Val Met Leu Ala Ile Cys Phe Leu

1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220>

<223>

> A motif located proximal to the transmembrane

domain of the Erythropoietin Receptor ("EPOR")

protein

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = any amino acid

<400> 58

Trp Ser Xaa Trp Ser

1 5