

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **015672**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2011.10.31**

**(51)** Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**200800536**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2006.08.07**

---

**(54) ТКАНЕЗАЩИТНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 60/705,741; 60/706,276; 60/831,737

**(32)** 2005.08.05; 2005.08.08; 2006.07.18

**(33)** US

**(43)** 2009.02.27

**(86)** PCT/US2006/031061

**(87)** WO 2007/019545 2007.02.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АРАИМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Серами Энтони, Брайнс Майкл,**  
**Коулман Томас (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WOLFERT, M.A. Chloroquine and amphipathic peptide helices show synergistic transfection in vitro. Gene Therapy. 1998, Vol. 5, pages 409-411, figure 1 on page 410

NOLI, N. Design, Synthesis and Conformational Analysis of hGM-CSF(13-31)-Gly-Pro-Gly-(103-116). Journal of Peptide Science. 1997, vol. 3, pages 323-335, especially page 324, column 2

**(57)** Настоящее изобретение относится к новым тканезащитным пептидам. Тканезащитные пептиды согласно изобретению могут связываться с тканезащитным рецепторным комплексом. В частности, настоящее изобретение относится к тканезащитным пептидам, полученным из частей лигандов рецепторов цитокинов, включая эритропоэтин (ЕРО), или имеющим с ними общие консенсусные последовательности, при этом такие части не вовлечены в связывание лиганда с рецепторным комплексом, например с гомодимером рецептора ЕРО. Соответственно, тканезащитные пептиды согласно изобретению получают из аминокислотных последовательностей областей лигандов рецепторов цитокинов, которые обычно расположены в области белка лиганда, которая находится на противоположной стороне от рецепторного комплекса, т.е. обычно получают из аминокислотных последовательностей областей белка лиганда, которые повернуты в другую сторону от рецепторного комплекса в то время, когда лиганд связан с рецептором. Кроме того, изобретение относится к консенсусным последовательностям для применения в конструировании синтетического тканезащитного пептида. Указанные тканезащитные пептиды также включают фрагменты, химеры, а также пептиды, сконструированные для имитации пространственной локализации ключевых аминокислотных остатков в лигандах тканезащитных рецепторов, например ЕРО. В объем изобретения также входят способы лечения или профилактики заболевания или расстройства с использованием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению. Изобретение также охватывает способы усиления функции возбудимой ткани с использованием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению.

**B1**

**015672**

**015672**

**B1**

## 1. Введение

Настоящее изобретение относится к новым тканезащитным пептидам. Тканезащитные пептиды согласно изобретению могут связываться с тканезащитным рецепторным комплексом. В частности, настоящее изобретение относится к тканезащитным пептидам, полученным из частей лигандов рецепторов цитокинов, включая эритропоэтин (ЕРО), или имеющим с ними общие консенсусные последовательности, при этом такие части не вовлечены в связывание лиганда с рецепторным комплексом, например с гомодимером рецептора ЕРО. Соответственно, тканезащитные пептиды согласно изобретению получают из аминокислотных последовательностей областей лигандов рецепторов цитокинов, которые обычно расположены в области белка лиганда, которая находится на противоположной стороне от рецепторного комплекса, т.е. получают из аминокислотных последовательностей областей белка лиганда, которые повернуты в другую сторону от рецепторного комплекса в то время, когда лиганд связан с рецептором. Кроме того, изобретение относится к консенсусным последовательностям для применения в конструировании синтетического тканезащитного пептида. Указанные тканезащитные пептиды также включают в себя фрагменты, химеры, а также пептиды, сконструированные для имитации пространственной локализации ключевых аминокислотных остатков в лигандах тканезащитных рецепторов, например ЕРО.

В объем изобретения также входят способы лечения, профилактики или улучшения состояния при заболевании или расстройстве и/или способы лечения, регенерации или уменьшения повреждения ткани с использованием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению. Изобретение также охватывает способы усиления функции возбудимой ткани с использованием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению.

## 2. Уровень техники

Эритропоэтин ("ЕРО") является гликопротеидным гормоном, который обычно связывают с поддержанием гематокрита, а в последнее время - с защитой тканей. Зрелый белок ЕРО человека содержит 165 аминокислот и имеет молекулярную массу 34 кД, при этом гликозильные остатки составляют около 40 мас.% молекулы. Молекула ЕРО содержит четыре спирали, которые взаимодействуют посредством своих гидрофобных доменов с образованием преимущественно глобулярной структуры в водном окружении (Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Изобретение осуществлено на основании открытия того, что некоторые аминокислоты, направленные в сторону водной оболочки (т.е. в сторону от гидрофобного центрального ядра глобулы), опосредуют защиту ткани. Пептиды могут быть получены или сконструированы на основании сведений о тканезащитных областях, которые были идентифицированы заявителями.

Как указано выше, ЕРО является плюрипотентным. При осуществлении своей гормональной функции ЕРО регулирует гематокрит благодаря той роли, которую он играет в созревании эритроидных клеток-предшественников в эритроциты. ЕРО действует в качестве противоапоптозного агента в ходе процесса созревания эритроидных клеток-предшественников, обеспечивая возможность созревания клеток-предшественников в эритроциты. Пониженные уровни кислорода в тканях (гипоксия) запускают повышенную продукцию эритропоэтина почками, что приводит к усилению эритропоэза. Поскольку почки в норме продуцируют большую часть эритропоэтина сыворотки, нарушение функции почек, такое как хроническая почечная недостаточность, приводит к пониженной продукции ЕРО и часто приводит к анемии. Подобным образом, анемия может возникать в результате других хронических состояний, таких как злокачественная опухоль, или способов лечения, связанных с такими заболеваниями, например, в результате химиотерапии, которая непосредственно подавляет продукцию ЕРО. Имеется коммерчески доступный рекомбинантный эритропоэтин торговых марок PROCRIТ, доступный из Ortho Biotech. Inc., Raritan, NJ, и EPOGEN, доступный из Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, и такой эритропоэтин использовали для лечения анемии, возникающей на конечной стадии заболевания почек, в результате лечения AZT (зидовудином) ВИЧ-инфицированных пациентов, онкологических больных и в результате химиотерапии. В настоящее время имеется гипергликозилированный эритропоэтин, ARANESP™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), для лечения анемии. Кроме того, указанные соединения использовали для повышения гематокрита у пациентов, подвергаемых хирургическим операциям, чтобы уменьшить потребность в переливаниях аллогенной крови.

Недавно полученные данные показали, что ЕРО также функционирует локально паракрино-аутокринным путем, минимизируя повреждение ткани. Например, ЕРО улучшает микроокружение клеток при гипоксии и снижает запрограммированную гибель клеток, вызванную метаболическим стрессом. Обе указанные активности частично опосредованы взаимодействием ЕРО со специфическим рецептором клеточной поверхности, в состав которого входит белок рецептора эритропоэтина ("ЕРОR"). ЕРОR является белком с молекулярной массой около 66 кД и является представителем семейства рецепторов цитокинов типа 1. Данное семейство включает в себя рецепторы, которые сгруппированы вместе на основе общей гомологии их внеклеточных доменов, и включает рецепторы интерлейкина IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), ингибирующего лейкоз фактора (LIF), цилиарного нейротрофического фактора (CNTF), тромбопоэтина, гормона роста и пролактина. Консервативный внеклеточный домен указанных рецепторов имеет длину примерно 200 аминокислот, содержит четыре кон-

сервативных по своему положению остатка цистеина в аминоконцевой области (Cys 294, Cys 283, Cys 248 и Cys 238, которые, по-видимому, важны для поддержания и структурной целостности рецепторов (Murray, 1996, Harpers Biochemistry, 24<sup>th</sup> ed. p. 524-526, Appilion and Lange, Ltd.; Caravella et al., 1996, Protein: Struct. Funct. Gen. 24:394-401, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме)) и мотив Trp-Ser-X-Trp-Ser (SEQ ID NO:58), расположенный вблизи трансмембранного домена.

В связи с эритропозом EPOR функционирует подобно другим рецепторам в семействе рецепторов цитокинов типа 1. Во-первых, лиганд рецептора, например EPO, связывается с предварительно образуемым димером EPOR, (EPOR)<sub>2</sub>. Было определено, что EPO взаимодействует с внеклеточным доменом классического гомодимерного рецептора (EPOR)<sub>2</sub> посредством двух отдельных областей на поверхности лиганда: высокоаффинный участок связывания с рецептором (участок 1) и низкоаффинный участок связывания с рецептором (участок 2). Аминокислотные последовательности EPO, связанные с участком 1, представляют собой последовательность TKVNFY, SEQ ID NO:2, соответствующую аминокислотам 44-49 в SEQ ID NO:1, и последовательность SNFLRG, SEQ ID NO:3, соответствующую аминокислотам 146-151 в SEQ ID NO:1; последовательности, связанные с участком 2, представляют собой последовательность VLERY, SEQ ID NO:4, соответствующую аминокислотам 11-15 в SEQ ID NO:1, и SGLRS, SEQ ID NO:5, соответствующую аминокислотам 100-104 в SEQ ID NO:1 (Cheetham et al., 1998, Nature Structural Biology, 5:861-866, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Активация гомодимера EPOR приводит к фосфорилированию тирозина сигнальных белков, которые связаны с EPOR, например тирозинкиназ Jak2, которые, в свою очередь, могут активировать несколько разных путей, включая, например, путь киназы фосфатидилинозитола (PI) 3, путь Ras/MAP-киназы и/или путь STAT. Указанные пути запускают противоапоптозные функции, необходимые для эритропоза, которые опосредованы эритропоэтином (Kirito et al., 2002, Blood. 99:102-110; Livnah et al., 1999, Science. 283:987-990; Naranda et al., 2002, Endocrinology. 143:2293-2302; Remy et al., 1999, Science. 283:990-993 и Yoshimura et al., 1996, The Oncologist. 1:337-339, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Недавно авторы изобретения обнаружили, что тканезащитные свойства EPO опосредованы рецептором, который содержит не только EPOR, но также другой белок рецептора, общий рецептор бета ("β<sub>c</sub>"). Рецептор EPOR/β<sub>c</sub> в отличие от гомодимера (EPOR)<sub>2</sub> является гетерокомплексом (см. ниже) и, как известно, играет роль в защите возбудимых тканей. См., например, WO 2004/096148 и PCT № PCT/US01/49479, поданную 28 декабря 2001 г., заявку на выдачу патента США № 09/753132, поданную 29 декабря 2000 г., и заявку 10/188905, поданную 3 июля 2002 г., каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Хотя авторы изобретения установили, что β<sub>c</sub>-рецептор является центральным рецептором путей тканевой защиты таких возбудимых тканей, структура активирующих лигандов для рецепторов еще неизвестна.

### 3. Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к изолированным полипептидам, которые обладают по меньшей мере одной защищающей клетки активностью в отношении чувствительной клетки, ткани или органа, и такие полипептиды содержат аминокислотные мотивы, включающие в себя консенсусную последовательность (a) H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(X)<sub>n</sub>-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (b) H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(X)<sub>n</sub>-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>, где n равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (c) L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(X)<sub>n</sub>-N<sub>2</sub>-H<sub>1</sub>, где n равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (d) H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(L)<sub>n</sub>-P<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0 или 1; или (e) H<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-(L)<sub>n</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0 или 1, и где H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub> означают гидрофобные аминокислоты, N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> означают отрицательно заряженные аминокислоты, X означает любую аминокислоту, L<sub>1</sub> означает полярную аминокислоту и P<sub>1</sub> означает положительно заряженную аминокислоту. В некоторых вариантах пептиды согласно изобретению также не обладают эритропоэтической активностью, например не повышают содержание гемоглобина или гематокрит у реципиента. В следующих вариантах изолированные полипептиды согласно изобретению состоят не более чем из 10, не более чем из 15, не более чем из 20 или не более чем из 30 аминокислот. В других вариантах изолированный пептид обладает менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55%, менее чем 50%, менее чем 45%, менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30% или менее чем 20%-ной идентичностью последовательности с любой частью аминокислотной последовательности зрелого эритропоэтина ("EPO") человека, указанной в SEQ ID NO:1, при этом указанная часть EPO содержит такое же количество аминокислотных остатков, что и указанный пептид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных выше, в которых изолированный полипептид содержит структурный мотив (a) H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(X)<sub>n</sub>-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5 (указанный последовательностями с идентификационными номерами 6-11 соответственно, которые обсуждаются ниже); (b) H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-(L)<sub>n</sub>-P<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0 или 1 (указанный последовательностями с идентификационными номерами 24-25 соответственно, которые обсуждаются ниже); или (e) H<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-(L)<sub>n</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, где n равно 0 или 1 (указанный последовательностями с идентификационными номерами 26-27 соответственно, которые обсуждаются ниже), H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub> могут быть одной и той же гидрофобной аминокислотой. В других вариантах осуществления изобретения, описанных выше, в которых изолированный полипептид содержит

структурные мотивы (а)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , где  $n$  равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (d)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , где  $n$  равно 0 или 1; или (е)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , где  $n$  равно 0 или 1,  $H_1$  и  $H_2$  могут представлять собой разные гидрофобные аминокислоты. В других вариантах изобретение относится к изолированному полипептиду, содержащему аминокислотный мотив (а)  $H_1N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , где  $n$  равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , где  $n$  равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; (с)  $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ , где  $n$  равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5, и где  $N_1$  и  $N_2$  могут означать одну и ту же или разные отрицательно заряженные аминокислоты.

Изобретение относится к изолированным полипептидам, содержащим аминокислотные мотивы, описанные выше, при этом указанные мотивы образованы следующими друг за другом аминокислотами в аминокислотной последовательности указанного полипептида. В конкретных примерах согласно данному варианту изобретение относится к изолированному полипептиду, содержащему аминокислотный мотив

$H_1-N_1-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:6),  $H_1-N_1-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:7),  $H_1-N_1-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:8),  $H_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:9),  $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:10),  $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:11),  $H_1-N_1-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:12),  $H_1-N_1-X-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:13),  $H_1-N_1-X-X-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:14),  $H_1-N_1-X-X-X-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:15),  $H_1-N_1-X-X-X-X-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:16),  $H_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-L_1$  (SEQ ID NO:17),  $L_1-N_1-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:18),  $L_1-N_1-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:19),  $L_1-N_1-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:20),  $L_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:21),  $L_1-N_1-X-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:22),  $L_1-N_1-X-X-X-X-X-N_2-H_2$  (SEQ ID NO:23),  $H_1-N_1-P_1-H_2$  (SEQ ID NO:24),  $H_1-N_1-L_1-P_1-H_2$  (SEQ ID NO:24),  $H_1-N_1-L_1-P_1-H_2$  (SEQ ID NO:25),  $H_1-P_1-N_1-H_2$  (SEQ ID NO:26) или  $H_1-P_1-L_1-N_1-H_2$  (SEQ ID NO:27),

где  $H_1$  и  $H_2$  означают гидрофобные аминокислоты;

$N_1$  и  $N_2$  означают отрицательно заряженные аминокислоты;

$X$  означает любую аминокислоту;

$L_1$  означает полярную аминокислоту;

$P_1$  означает положительно заряженную аминокислоту.

В некоторых аспектах, соответствующих данному варианту, в которых изолированный полипептид содержит мотив, имеющий аминокислотные остатки  $H_1$  и  $H_2$ ,  $H_1$  и  $H_2$  могут быть одинаковыми или могут быть разными гидрофобными аминокислотами. В других аспектах, соответствующих данному варианту, в которых изолированный полипептид содержит мотив, имеющий аминокислотные остатки  $N_1$  и  $N_2$ ,  $N_1$  и  $N_2$  могут быть одинаковыми или могут быть разными отрицательно заряженными аминокислотами.

В других вариантах осуществления изобретение относится к изолированным полипептидам, в которых аминокислотный мотив образован благодаря пространственной организации аминокислот в третичной структуре полипептида, т.е. аминокислоты, образующие мотив, пространственно близки друг другу в трехмерной структуре, т.е. в третичной структуре, полипептида, но могут быть разделены одной или несколькими аминокислотами в первичной аминокислотной последовательности полипептидной цепи. В конкретном примере согласно данному варианту аминокислотный мотив, содержащий аминокислотные остатки  $H_1$ ,  $N_1$ ,  $N_2$  и  $H_2$ , аналогичный последовательности SEQ ID NO:6, обсуждаемой выше, может образоваться в результате формирования третичной структуры, принимаемой, например, благодаря белковой укладке пептидов, содержащих, например, последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO:11, в которых аминокислотные остатки между  $N_1$  и  $N_2$ , например  $(X)_n$ , подвергаются укладке таким образом, что  $N_1$  и  $N_2$  становятся линейно близкими. Соответственно, изобретение охватывает изолированные пептиды, содержащие аминокислотный мотив  $H_1N_1N_2H_2$ ;  $H_1N_1N_2L_1$ ;  $L_1N_1N_2H_1$ ;  $H_1N_1(L)_nP_1H_2$ , где  $n$  равно 0 или 1; или  $H_1P_1(L)_nN_1H_2$ , где  $n$  равно 0 или 1, и указанные мотивы образуются в результате формирования третичной структуры указанного полипептида. В родственных вариантах, в которых аминокислотный мотив содержит  $N_1$  и  $N_2$ , третичные структуры образуются так, что расстояние между карбонильными атомами углерода  $N_1$  и  $N_2$  составляет примерно от 3 до 5 Å, предпочтительно примерно от 4 до 5 Å и более предпочтительно примерно от 4,4 до 4,8 Å. В других вариантах осуществления, в которых аминокислотный мотив содержит  $N_1$  и  $N_2$ , третичные структуры образуются так, что расстояние между  $N_1$  и  $N_2$  пространственно ограничено, так что расстояние, разделяющее заряды, например заряженные боковые цепи двух аминокислот, составляет примерно от 6,5 до 9 Å. В родственном варианте  $N_1$  и  $N_2$  соответственно пространственно ограничены в результате того, что они находятся в аминокислотной последовательности, которая образует всю или часть альфа-спирали, и могут быть разделены 1, 2 или более чем 2 аминокислотами в последовательности указанных аминокислот, образующей указанную спираль. В других родственных вариантах, в которых аминокислотный мотив содержит  $N_1$  и  $P_1$ , третичные структуры образуются так, что расстояние между карбонильными атомами углерода  $N_1$  и  $P_1$  составляет примерно от 3 до 5 Å, предпочтительно примерно от 4 до 5 Å и более предпочтительно примерно от 4,4 до 4,8 Å. В других вариантах, в которых аминокислотный мотив содержит  $N_1$  и  $P_1$ , третичные структуры образуются так, что расстояние между  $N_1$  и  $P_1$  пространственно ограничено, так что расстояние, разделяющее заряды, например заряженные боковые цепи

двух аминокислот, составляет примерно от 6,5 до 9 Å. В родственном варианте N<sub>1</sub> и P<sub>1</sub> пространственно ограничены в результате того, что они находятся в аминокислотной последовательности, которая образует всю или часть α-спирали, и могут быть разделены 1, 2, или более чем 2 аминокислотами в последовательности указанных аминокислот, образующих указанную спираль. В некоторых вариантах аминокислоты, образующие мотив в третичной структуре указанного полипептида, отделены друг от друга одинаковым количеством промежуточных аминокислотных остатков в линейной аминокислотной последовательности указанного полипептида. В других вариантах аминокислоты, образующие мотив в третичной структуре указанного полипептида, отделены друг от друга разным количеством промежуточных аминокислотных остатков в линейной аминокислотной последовательности указанного полипептида. В некоторых вариантах изолированный полипептид согласно изобретению образует регулярную третичную структуру, например α-спираль или β-складчатый слой, так что поверхность указанной структуры представлена аминокислотами, составляющими указанный мотив, и таким образом мотив как таковой направлен к границе раздела структуры белка и водного окружения, т.е. представлена мотивом на поверхности подвергнутого укладке полипептида. В предпочтительных вариантах третичные структуры полипептидов согласно изобретению образуются в водной среде в физиологических условиях, например в PBS (13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, pH 7,4) при 37°C.

В конкретных вариантах изобретение относится к изолированным полипептидам, содержащим аминокислотные мотивы, описанные выше, например

- пептид A (APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE, SEQ ID NO:32);
- пептид C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29);
- пептид D (QQAWEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30);
- пептид E (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO:31);
- пептид F (RYLLUNITTGC, SEQ ID NO:33);
- пептид G (QEQLERALNSS, SEQ ID NO:40);
- пептид I (CSLNENIQEQLERALNSS, SEQ ID NO:43);
- пептид J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEQ ID NO:41);
- пептид K (WEHVNAIQEARRLL, SEQ ID NO:35) или
- пептид L (KIRSDLTALTESYVKH, SEQ ID NO:37).

В некоторых вариантах изобретение относится к изолированным полипептидам, содержащим 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более или более чем 6 аминокислотных мотивов, описанных в данной публикации. В конкретных аспектах изобретения в соответствии с данным вариантом, в которых изолированный полипептид содержит по меньшей мере два аминокислотных мотива, описанных выше, указанные по меньшей мере два мотива могут быть одинаковыми мотивами или могут быть разными мотивами.

В некоторых аспектах изобретение относится к изолированным полипептидам, не обладающим эритропоэтической активностью, например не увеличивающим уровень гемоглобина у реципиента. Предпочтительно изолированные полипептиды не обладают другими активностями, включая без ограничения вазоактивное действие (например, сужение кровеносных сосудов), гиперактивацию тромбоцитов, прокоагулянтные активности и стимуляцию пролиферации и/или продукции тромбоцитов и/или зависимость от эритропоэза клеток (см. Coleman et al., 2006, PNAS, 103:5965-5970, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). В других аспектах изобретение относится к изолированным полипептидам, которые обладают по меньшей мере одной защитной в отношении клеток активностью. Такая защитная в отношении клеток активность включает без ограничения защиту, сохранение, усиление или восстановление функции или жизнеспособности чувствительной клетки, ткани или органа млекопитающего. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению изолированного полипептида, охарактеризованного в данном описании, для получения фармацевтических композиций для защиты, сохранения, усиления или восстановления функции или жизнеспособности чувствительных клеток, тканей или органов млекопитающих. В родственных вариантах композиции предназначены для введения нуждающемуся в таком введении субъекту. В предпочтительных вариантах указанным субъектом является млекопитающее и предпочтительно человек.

В других аспектах настоящее изобретение относится к применению изолированного полипептида, охарактеризованного в данном описании, для получения фармацевтической композиции для защиты и/или предотвращения повреждения чувствительной ткани, для восстановления или для обновления чувствительной ткани и/или чувствительной функции ткани у нуждающегося в этом субъекта. В одном конкретном аспекте чувствительные клетки млекопитающих и связанные с ними клетки, ткани или органы являются дистальными в отношении сосудистой сети из-за плотного барьера, состоящего из эндотелиальных клеток. В другом конкретном аспекте клетки, ткани, органы или другие части тела выделены от организма млекопитающего, например предназначены для трансплантации. В качестве не ограничивающих примеров чувствительная клетка или ткань может представлять собой нейронную клетку или ткань, клетку или ткань глаза (например, сетчатки), жировую, соединительную, клетку или ткань волоса, зубов, слизистой оболочки, поджелудочной железы, эндокринную, уха, эпителиальную, кожи, мышц, сердца,

легкого, печени, почки, кишечника, надпочечника (например, коры надпочечников, мозгового вещества надпочечников), капилляров, эндотелия, семенников, яичника, костей, кожи или эндометрия. Кроме того, не ограничивающие примеры чувствительных клеток включают фоторецепторы (палочки и колбочки), клетки нервного узла, биполярные, горизонтальные, амакринные, Мюллеровские, Пуркинне, миокарда, водителя ритма, синусно-предсердного узла, синусового узла, соединительной ткани, атриовентрикулярного узла, пучка Гиса, гепатоциты, звездчатые, Купфера, мезангиальные, эпителиальные клетки почек, тубулярные интерстициальные, бокаловидные, кишечных крипт, эндокринные клетки кишечника, клетки клубочковой зоны, клетки пучковой зоны, ретикулярные, хромоаффинные, перициты, Лейдига, Сертоли, сперматозоиды, Граафовых пузырьков, примордиальных фолликулов, островков Лангерганса,  $\alpha$ -клетки,  $\beta$ -клетки,  $\gamma$ -клетки, F-клетки, остеогенные клетки-предшественники, остеокласты, остеобласты, стромы эндометрия, эндометриальные, стволовые и эндотелиальные клетки. Указанные примеры чувствительных клеток являются только иллюстративными. В одном аспекте чувствительные клетки или связанные с ними клетки, ткани или органы представляют собой возбудимые клетки, ткани или органы или преимущественно включают возбудимые клетки или ткани. В некоторых аспектах изобретения возбудимой тканью является ткань центральной нервной системы, ткань периферической нервной системы, ткань сердца или ткань сетчатки. В другом аспекте чувствительная клетка или связанные с ней клетки, ткани или органы являются невозбудимыми клетками, тканями или органами либо они преимущественно не содержат возбудимых клеток или тканей.

Эритропоэтическая и/или защищающая клетки активность изолированного полипептида согласно изобретению в отношении чувствительных клеток можно оценить и/или определить любым способом, охарактеризованным в данном описании и/или известным в данной области. В некоторых вариантах эритропоэтическую и/или защищающую клетки активность определяют в анализе *in vitro*. В других вариантах эритропоэтическую и/или защищающую клетки активность определяют в анализе *in vivo*. В родственном варианте, в котором защищающая клетки активность представляет собой нейропротекцию, изобретение относится к способу оценки указанной активности *in vitro* посредством (а) осуществления контакта тестируемой культуры первичных нейронов гиппокампа с N-метил-D-аспартатом и указанным пептидом и (б) определения жизнеспособности клеток через 48 ч после указанного контакта, при этом если жизнеспособность клеток, определяемая на стадии (б), выше, чем в контрольной культуре в отсутствие указанного пептида, то пептид обладает защищающей клетки активностью.

В конкретном варианте клетка, ткань или орган млекопитающего, в отношении которых применяют указанный выше изолированный пептид, представляют собой клетку, ткань или орган, которые в течение определенного периода времени подверглись или будут подвергаться воздействию по меньшей мере одного состояния, неблагоприятного для жизнеспособности клетки, ткани или органа. В соответствии с данным вариантом изолированные пептиды согласно изобретению обеспечивают защиту и/или предотвращают повреждение ткани, возникающее в результате таких состояний, обеспечивают восстановление или обеспечивают обновление ткани и/или функции ткани у нуждающегося в этом субъекта до, во время или после возникновения таких состояний. Такие состояния включают вызванную травмой гипоксию *in situ* или метаболическую дисфункцию, индуцированную хирургическим вмешательством гипоксию *in situ* или метаболическую дисфункцию или воздействие токсина *in situ*, последнее может быть связано с химиотерапией или лучевой терапией. В других вариантах изолированные пептиды согласно изобретению обеспечивают защиту и/или предотвращают повреждение ткани, возникающее в результате заболевания или расстройства, обеспечивают восстановление или обеспечивают обновление ткани и/или функции ткани у нуждающегося в этом субъекта до, во время или после возникновения таких состояний. В родственных вариантах указанное повреждение вызвано эпилепсией, рассеянным склерозом, инсультом, гипертонией, остановкой сердца, ишемией, инфарктом миокарда, воспалением, связанной с возрастом потерей когнитивной функции, радиационным поражением, церебральным параличом, нейродегенеративным заболеванием, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, митохондриальным заболеванием, связанной со СПИДом деменцией, потерей памяти, боковым амиотрофическим склерозом, алкоголизмом, расстройством настроения, тревожным расстройством, синдромом нарушения внимания, аутизмом, болезнью Крейтцфельда-Якоба, травмой или ишемией головного или спинного мозга, искусственным кровообращением, хронической сердечной недостаточностью, дегенерацией желтого пятна, диабетической нейропатией, диабетической ретинопатией, гепатитом, панкреатитом, глаукомой, ишемией сетчатки, травмой сетчатки, сердечно-сосудистым заболеванием, сердечно-легочным заболеванием, респираторным заболеванием, болезнью почек, болезнью мочевой системы, заболеванием репродуктивной системы, заболеванием костей, кожной болезнью, заболеванием соединительной ткани, желудочно-кишечным заболеванием, эндокринным нарушением, метаболическим нарушением или заболеванием или расстройством центральной или периферической нервной системы. В других вариантах неблагоприятные состояния являются результатом применения экстракорпорального кровообращения (аппарата искусственного кровообращения), которое используют при некоторых хирургических операциях. В других вариантах указанное повреждение представляет собой когнитивную дисфункцию. В конкретном варианте клетка, ткань или орган млекопитающего, в отношении которого применяют указанный выше

изолированный пептид, экспрессируют  $\beta_c$ -рецептор.

В некоторых вариантах изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные выше изолированные полипептиды для введения субъекту, нуждающемуся в таком введении. В конкретных аспектах данного варианта фармацевтическая композиция согласно изобретению дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Такие фармацевтические композиции могут быть приготовлены для орального, интраназального, глазного, ингаляционного, трансдермального, ректального, подъязычного, вагинального или парентерального введения или в форме перфузируемого раствора для поддержания жизнеспособности клеток, тканей или органов *ex vivo*. В родственных вариантах осуществления изобретения субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.

В других аспектах изобретение относится к способу облегчения транцитоза молекулы через барьер из эндотелиальных клеток у нуждающегося в этом субъекта, который включает в себя введение указанному субъекту композиции, содержащей указанную молекулу, связанную с изолированным пептидом согласно изобретению, описанным выше. В родственном варианте связь представляет собой лабильную ковалентную связь, стабильную ковалентную связь или нековалентное связывание с участком связывания для указанной молекулы.

Согласно другому аспекту изобретения изолированный пептид согласно изобретению, описанный выше, способен преодолеть барьер эндотелиальных клеток. В родственном варианте барьер эндотелиальных клеток включает в себя гематоэнцефалический барьер, гематоофтальмический барьер, гематотестикулярный барьер, гематоовариальный барьер, гематоплацентарный барьер, барьер кровь-сердце, кровь-почки, кровь-нервы или кровь-спинной мозг.

Согласно одному аспекту изобретения предлагается изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, содержащий описанный выше изолированный полипептид.

В другом варианте осуществления изобретения предлагается изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность (т.е. кДНК, нуклеотидную последовательность, прерываемую интронами или непрерываемую интронами), которая кодирует полипептид, содержащий или состоящий из изолированного полипептида согласно изобретению, который описан выше. В одном варианте нуклеотидную последовательность, кодирующую изолированный полипептид согласно изобретению, синтезируют, используя предпочтительные кодоны, которые способствуют оптимальной экспрессии в конкретной клетке-хозяине. Такие предпочтительные кодоны могут быть оптимальными для экспрессии в клетках определенного вида растений, бактерий, дрожжей, млекопитающих, грибов или насекомых.

Изобретение также относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты. Изобретение также относится к экспрессирующему вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты и по меньшей мере одну регуляторную область, оперативно связанную с молекулой нуклеиновой кислоты. В другом варианте изобретение относится к клетке, содержащей экспрессирующий вектор. В еще одном варианте предлагается генетически сконструированная клетка, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

В другом варианте изобретение относится к способу рекомбинантного получения изолированного пептида согласно изобретению, который описан выше, включающему в себя культивирование в среде клетки-хозяина, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид согласно изобретению, в условиях, подходящих для экспрессии указанного пептида, и извлечение и/или выделение экспрессированного полипептида из указанной среды.

### 3.1. Терминология.

В используемом в данном описании смысле термины "около" или "примерно" при использовании в сочетании с числом относятся к любому числу в пределах 1, 5 или 10% от указанного числа.

Термин "вводимый в сочетании с" в контексте способов согласно изобретению означает введение соединения до, одновременно и/или после начала заболевания, расстройства или состояния.

Подразумевается, что термин "аминокислота" или любое указание конкретной аминокислоты включают встречающиеся в природе протеогенные аминокислоты, а также не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как аналоги аминокислот. Специалистам в данной области будет понятно, что такое определение, если не оговорено особо, включает встречающиеся в природе протеогенные (L)-аминокислоты, их оптические (D)-изомеры, химически модифицированные аминокислоты, включая аналоги аминокислот, такие как пеницилламин (3-меркапто-D-валин), встречающиеся в природе непротеогенные аминокислоты, такие как норлейцин, и химически синтезированные белки, которые обладают свойствами, которые, как известно в данной области, характерны для аминокислоты.

В используемом в данном описании смысле аминокислоты будут обозначены либо трехбуквенным сокращением, либо однобуквенным символом следующим образом: аланин = Ala или A, аргинин = Arg или R, аспарагин = Asn или N, аспарагиновая кислота = Asp или D, цистеин = Cys или C, глутаминовая кислота = Glu или E, глутамин = Gln или Q, глицин = Gly или G, гистидин = His или H, изолейцин = Ile или I, лейцин = Leu или L, лизин = Lys или K, метионин = Met или M, фенилаланин = Phe или F, пролин = Pro или P, серин = Ser или S, треонин = Thr или T, триптофан = Trp или W, тирозин = Tyr или Y и валин

= Val или V.

Кроме того, термин "эквивалент аминокислоты" относится к соединениям, которые отличаются по структуре от встречающихся в природе аминокислот, но которые, по существу, имеют структуру аминокислоты, так что ими можно заменить аминокислоту в пептиде, который при этом сохраняет свою биологическую активность, несмотря на замену. Таким образом, например, эквиваленты аминокислот могут включать аминокислоты, имеющие модификации или замещения боковых цепей, а также включают родственные органические кислоты, амиды или т.п. Подразумевается, что термин "аминокислота" включает эквиваленты аминокислот. Термин "остатки" относится как к аминокислотам, так и к эквивалентам аминокислот. Аминокислоты также могут быть отнесены к следующим группам, которые общеизвестны в данной области:

- (1) гидрофобные аминокислоты: His, Trp, Tyr, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala;
- (2) нейтральные гидрофильные аминокислоты: Cys, Ser, Thr;
- (3) полярные аминокислоты: Ser, Thr, Asn, Gln;
- (4) кислый/отрицательно заряженные аминокислоты: Asp, Glu;
- (5) заряженные аминокислоты: Asp, Glu, Arg, Lys, His;
- (6) положительно заряженные аминокислоты: Arg, Lys, His и
- (7) основные аминокислоты: His, Lys, Arg.

В используемом в данном описании смысле "возбудимая ткань" означает ткань, которая содержит возбудимые клетки. Возбудимые клетки представляют собой клетки, которые активно отвечают на электрический стимул и имеют электрический заряд, который отличается с разных сторон их клеточных мембран. Возбудимые клетки обычно способны подвергаться потенциалу действия. Такие клетки обычно экспрессируют каналы, такие как потенциалозависимые, лигандозависимые и зависимые от натяжения каналы, которые позволяют проходить ионам (калия, натрия, кальция, хлорида и т.д.) через мембрану. Возбудимые ткани включают нервную ткань, мышечную ткань и железистую ткань. К возбудимым тканям относятся без ограничения нервные ткани, такие как ткань периферической нервной системы (уха и сетчатки) и центральной нервной системы (головного и спинного мозга); сердечно-сосудистая ткань, такая как клетки сердца и связанных нервов; и железистая ткань, такая как ткань поджелудочной железы, в которой кальциевые каналы Т-типа вместе с щелевидными межклеточными контактами принимают участие в секреции инсулина. Иллюстративный список возбудимых тканей включает органы и ткани, которые включают нервы, скелетные мышцы, гладкую мускулатуру, сердечную мышцу, матку, центральную нервную систему, спинной мозг, головной мозг, сетчатку, обонятельную систему, слуховую систему и т.д.

Термин "клетка-хозяин" в используемом в данном описании смысле относится к конкретной клетке субъекта, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может быть не идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, вследствие мутаций или влияния окружающей среды, которые могут возникать в следующих поколениях, или вследствие интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

"Изолированный" или "очищенный" полипептид, по существу, не содержит клеточных веществ или других загрязняющих белков из клеточного или тканевого источника, из которого белок или полипептид получают, или, по существу, не содержит химических предшественников или других химических веществ в случае химического синтеза. Формулировка "по существу, не содержит клеточных веществ" относится к препаратам полипептида, в которых полипептид отделен от клеточных компонентов клеток, из которых его выделяют или в которых его рекомбинантно получают. Таким образом, полипептид, который, по существу, не содержит клеточных веществ, включает препараты полипептидов, имеющие менее чем примерно 30, 20, 10 или 5% (сухой массы) гетерологичного белка (также называемого в данном описании "загрязняющим белком"). В том случае, когда полипептид получают рекомбинантно, он также предпочтительно, по существу, не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем примерно 20, 10 или 5% объема препарат белка. В том случае, когда полипептид получают в результате химического синтеза, он предпочтительно, по существу, не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. отделен от химических предшественников или других химических веществ, которые были использованы в синтезе белка. Соответственно такие препараты полипептида имеют менее чем примерно 30, 20, 10, 5% (сухой массы) химических предшественников или других соединений, отличных от представляющего интерес антигена. В предпочтительном варианте полипептиды согласно изобретению являются изолированными или очищенными.

"Изолированная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, "изолированная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, по существу, может не содержать других клеточных веществ или культуральной среды в том случае, если ее получают рекомбинантными способами, или, по существу, не содержит химических предшественников или других химических веществ в случае химического синтеза. В конкретном варианте молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид согласно изобретению, является изолиро-



ванной или очищенной.

В используемом в данном описании смысле при указании структуры в пределах полипептида термин "мотив" относится или к набору следующих друг за другом аминокислот в аминокислотной последовательности полипептидной цепи и/или к набору линейно близко расположенных аминокислот в третичной структуре указанного полипептида. Поскольку мотив целиком или частично может быть образован в результате фолдинга белка, то аминокислоты, которые являются соседними в описанном мотиве, могут быть разделены 0, 1 или более, 5 или более, 10 или более, 15 или более или 20 или более аминокислотами в линейной аминокислотной последовательности полипептида.

В используемом в данном описании смысле термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и в широком смысле они относятся к ограниченным (т.е. имеющим некоторый элемент структуры, например наличие аминокислот, которые инициируют  $\beta$ -виток или  $\beta$ -складчатый слой, или, например, циклизированным вследствие присутствия связанных дисульфидной связью остатков Cys) или неограниченным (например, линейным) аминокислотным последовательностям. В некоторых вариантах пептид согласно изобретению состоит менее чем из 30 аминокислот. Однако при чтении данного описания специалисту в данной области будет понятно, что не длина конкретного пептида, а его способность связывать тканезащитный рецепторный комплекс и/или конкурировать за связывание с пептидом, охарактеризованным в данном описании, является отличительным признаком пептида согласно изобретению. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к соединениям, содержащим эквиваленты аминокислот или другие неаминокислотные группы, но при этом еще сохраняющим требуемую функциональную активность пептида. Эквиваленты пептидов могут отличаться от обычных пептидов заменой одной или нескольких аминокислот родственными органическими кислотами (такими как РАВА), аминокислотами или т.п. или заменой или модификацией боковых цепей или функциональных групп.

Термин "профилактика заболевания, расстройства или состояния" относится к задержке начала, задержке прогрессирования, задержке проявления, защите, подавлению или исключению возникновения или уменьшению частоты такого заболевания, расстройства или состояния. Использование термина "профилактика" не означает, что имеется в виду, что у всех пациентов в популяции пациентов, которым проводят профилактическую терапию, никогда не разовьется заболевание, расстройство или состояние, которое является целью профилактики, но в популяции пациентов будет уменьшена частота встречаемости заболевания, расстройства или состояния.

Например, многие вакцины против гриппа не на 100% эффективны для профилактики гриппа у пациентов, которым вводят вакцину. Специалист в данной области легко может идентифицировать пациентов и ситуации, при которых профилактическое лечение может быть полезным, например, но не ограничиваясь указанным, может идентифицировать людей, которые намереваются осуществлять деятельность, которая может привести к травме и повреждению (например, солдаты, участвующие в военных действиях, водители гоночных автомобилей и т.д.), пациентов, которым запланирована операция, пациентов, для которых существует риск появления наследственных болезней, расстройств или состояний, пациентов, для которых существует риск возникновения заболеваний, расстройств или состояний, обусловленных факторами окружающей среды, или частей популяции, для которых существует риск развития конкретных заболеваний, расстройств или состояний, таких как пожилые люди, новорожденные или люди с ослабленной иммунной системой, или пациенты с генетическими или другими факторами риска развития заболевания, расстройства или состояния.

В используемом в данном описании смысле термины "субъект" и "пациент" используют взаимозаменяемо. В используемом в данном описании смысле термины "субъект" и "субъекты" относятся к животному, предпочтительно млекопитающему, включая животное, отличное от приматов (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса и мышь) и примата (например, обезьяна или человек), и более предпочтительно к человеку.

В используемом в данном описании смысле термины "защитная по отношению к ткани активность" или "защита ткани" относятся к эффекту ингибирования или отсрочивания повреждения или гибели клетки, ткани или органа. Если не оговорено особо, "отсрочивание" повреждения или гибели клетки, ткани или органа оценивают по сравнению с контрольными условиями в отсутствие пептида согласно изобретению. Защитная по отношению к ткани активность применима для различных состояний, заболеваний и повреждений клетки, органа и/или ткани, которые, например, описаны в разделе 5.3. Защитная в отношении ткани активность специфична для ткани, клеток и/или органов, экспрессирующих тканезащитный рецепторный комплекс (т.е. для чувствительной ткани, клетки и/или органа соответственно), таких как, без ограничения, ткани центральной нервной системы. В конкретных вариантах чувствительные клетки не являются клетками-предшественниками эритроцитов.

Термин "тканезащитный рецепторный комплекс" в используемом в данном описании смысле означает комплекс, содержащий по меньшей мере одну субъединицу рецептора эритропоэтина и по меньшей мере одну общую  $\beta$ -субъединицу рецептора. Тканезащитный рецепторный комплекс может содержать несколько субъединиц рецептора эритропоэтина и/или общих бета-субъединиц рецептора, а также дру-

гие типы рецепторов или белков. См. WO 2004/096148, которая включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Чтобы определить процент идентичности двух аминокислотных последовательностей, последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения. Затем сравнивают аминокислотные остатки в соответствующих положениях аминокислот. Если положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны по данному положению. Идентичность в процентах между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % идентичности = количество идентичных совпадающих положений/общее количество положений  $\times$  100%). В одном варианте две последовательности имеют одинаковую длину. В альтернативном варианте последовательности имеют разную длину, и соответственно идентичность в процентах относится к сравнению более короткой последовательности с частью более длинной последовательности, при этом указанная часть имеет такую же длину, как и указанная более короткая последовательность.

#### 4. Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображены результаты, полученные на модели повреждения седалищного нерва *in vivo* при сравнении эффективности пептида J (SEQ ID NO:41) с тканезащитной молекулой карбамилированного EPO (CEPO), при этом пептид J (SEQ ID NO:41) является химерным пептидом, состоящим из аминокислот, расположенных на наружной поверхности спирали В EPO (т.е. пептид G, SEQ ID NO:40), объединенных с амфипатической спиралью из панкреатического полипептида (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO:28).

На фиг. 2 изображено тканезащитное влияние пептидов согласно изобретению, которые тестировали в модели повреждения седалищного нерва *in vivo*. В анализе повреждали правый седалищный нерв у крыс (n=6 на группу) и животному немедленно вводили дозы PBS или PBS, содержащего равные молярные концентрации карбамилированного EPO, пептида А EPO (SEQ ID NO:32, соответствующего аминокислотам 1-23 последовательности SEQ ID NO:1), пептида D (SEQ ID NO:30, соответствующего аминокислотам 58-82 последовательности SEQ ID NO:1) или пептида G (SEQ ID NO:40). Пептид G (SEQ ID NO:40) основан на аминокислотах в пределах спирали В EPO, которые направлены в наружную сторону от глобулярного центра молекулы EPO в гидрофобную среду, т.е. находятся на поверхности полипептида. Кроме того, в качестве негативного контроля включали 20-мер, сконструированный из области фактора, полученного из пигментного эпителия, который, как известно, является тканезащитным, действуя посредством другого рецептора. Восстановление после повреждения в течение следующих 4 суток показывает, что пептид G (SEQ ID NO:40) и пептид D (SEQ ID NO:30) оказывают тканезащитное действие в указанном анализе на модели *in vivo*, которое эквивалентно или лучше, чем действие карбамилированного EPO (CEPO).

На фиг. 3 изображено эритропоэтическое действие пептида D (SEQ ID NO:30) и CEPO, у которого, как известно, отсутствует эритропоэтическая активность, которые тестировали в UT-7-анализе эритропоэтической активности. Результаты указанного анализа *in vitro* показывают, что ни пептид D (SEQ ID NO:30), ни CEPO не обладают эритропоэтической активностью в дозах до 10000 пМ.

На фиг. 4 изображены результаты анализа *in vivo* для определения того, являются ли пептид F (SEQ ID NO:33, соответствующий аминокислотам 14-29 SEQ ID NO:1), и пептид G (SEQ ID NO:40) эритропоэтическими и не вызывают ли нейтрализацию антител против EPO. Результаты показывают, что ни один из белков не повышает уровни гемоглобина у крыс при введении в дозе 0,8 мкг/кг 3 дня/неделю подкожно (п/к) в течение курса продолжительностью 130 дней. Кроме того, ни один из пептидов не вызывал гуморального ответа, в отличие от введения EPO.

На фиг. 5 изображены результаты исследований *in vitro*, которые показывают, что пептид D (SEQ ID NO:30) защищает мотонейроны от индуцированной каинамом гибели.

На фиг. 6 показано, что пептид D (SEQ ID NO:30, в дозах 0,1 и 1 нг/мл защищает клетки P-19 от апоптоза, связанного с лишением клеток сыворотки.

На фиг. 7А, 7В изображены результаты анализа окклюзии средней мозговой артерии у крыс.

На фиг. 7А изображен график, показывающий, что пептид D (SEQ ID NO:30) соответствующий аминокислотам 58-82 последовательности SEQ ID NO:1) в однократной дозе 4,4 мкг/кг способен уменьшать объем инфаркта головного мозга также эффективно, как четыре дозы 4,4 мкг/кг, вводимые с 2-часовыми интервалами.

На фиг. 7В изображены результаты анализа "промахов" стопы, чтобы определить расстройство поведения, вызванное окклюзией средней мозговой артерией. На фиг. 7В показано, что крысы демонстрировали исправление поведения при введении пептида D (SEQ ID NO:30) как при схеме с использованием однократной дозы (1 $\times$ 4,4 мкг/кг), так и при схеме с многократными дозами (4 $\times$ 4,4 мкг/кг).

На фиг. 8А, 8В изображены результаты анализа *in vivo* диабетической невропатии. Диабет индуцируют у крыс, используя стрептозотозин. После подтверждения индуцированного диабета крыс лечили пептидом D (SEQ ID NO:30) или PBS пять раз в неделю в дозе 4 мкг/кг массы тела в/б в течение двух недель. Регистрировали скорость проводимости нерва и задержку между стимулом и реакцией на горячую пластинку у крыс.

На фиг. 8А показано, что у крыс, обработанных пептидом D (SEQ ID NO:30) наблюдаются повышенные скорости проводимости по сравнению с необработанными крысами.

На фиг. 8В показано, что задержка между стимулом и реакцией на горячую пластинку у обработанных крыс была уменьшена по сравнению с необработанными крысами, что дополнительно свидетельствует о повышении скорости проводимости.

На фиг. 9А, 9В изображены результаты лечения индуцированной цисплатином невропатии химерой спирали В ЕРО.

На фиг. 9А показано, что у животных, обработанных пептидом G (SEQ ID NO:40), химера спирали В) наблюдаются улучшенные результаты при тестировании в анализе задержки между сигналом и реакцией на горячую пластинку.

На фиг. 9В показано, что мочеотделение, являющееся мерой почечной функции, сохранялось на уровне нормы у животных, обработанных пептидом G (SEQ ID NO:40).

На фиг. 10 изображено влияние пептида D (SEQ ID NO:30) на "просачивание" в сетчатке, связанное с диабетической ретинопатией. На фигуре показано, что пептид D (SEQ ID NO:30) способен значительно снижать просачивание в сетчатке у обработанных животных.

На фиг. 11 изображены результаты, полученные при использовании пептида F (SEQ ID NO:33) или пептида G (SEQ ID NO:40) в модели ишемии-реперфузии почек. На фигуре показано, что оба пептида уменьшали оценку в баллах повреждения, возникающего в результате 60-минутной ишемии-реперфузионного повреждения, определяемую через 72 ч.

На фиг. 12 показано, что введение пептида F (SEQ ID NO:33) защищает мышей от экспериментальной церебральной малярии.

Фиг. 13. Клинический показатель в мышинной модели ЕАЕ после обработки пептидом Е (SEQ ID NO:31). На фиг. 13 изображено клиническое течение неврологической функции у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом. 4,4 мкг/кг пептида Е вводили в/б ежедневно. Введение пептида Е значительно улучшало неврологическую функцию по сравнению с контролем. Клинические стадии: 1 - поникший хвост; 2 - атаксия и/или паралич задних конечностей или медленный рефлекс выпрямления; 3 - паралич задних конечностей и/или паралич передних конечностей; 4 - парез передних конечностей; 5 - агония или гибель.

## 5. Подробное описание изобретения

### 5.1. Тканезащитные пептиды.

Эритропоэтическая активность эритропоэтина ("ЕРО") хорошо охарактеризована в данной области (см., например, Cheetham et al., 1998, *Nat. Struct. Biol.* 5:861-866, публикация включена в виде ссылки в полном объеме). ЕРО инициирует эритропоэз посредством связывания с внеклеточной частью предварительно образованного гомодимера рецептора эритропоэтина (ЕРОR) (т.е. (ЕРОR)<sub>2</sub>) таким образом, что он образует мостик между специфичными положениями на отдельных субъединицах ЕРОR. Когда ЕРО связывается с (ЕРОR)<sub>2</sub>, крупные части глобулярного лиганда удаляются от областей связывания и поворачиваются наружу, в сторону от комплекса ЕРО и (ЕРОR)<sub>2</sub> в водную среду. Авторы изобретения определили, что защита ткани, в отличие от эритропоэза, опосредована другим рецептором, отличным от (ЕРОR)<sub>2</sub>, который состоит из мономера ЕРОR, связанного с другим рецептором, CD131 (также известным как общая  $\beta$ -субъединица рецепторов ( $\beta_c$ )). ЕРОR и  $\beta_c$  взаимодействуют с образованием рецепторного гетеродимера, ЕРОR- $\beta_c$ . В настоящее время не известно, вовлечены ли другие белки в указанное взаимодействие. Настоящее изобретение относится к тканезащитным пептидам, полученным из трехмерной структуры ЕРО, и, в частности, из частей ЕРО, направленных в сторону от участков связывания ЕРОR, т.е. не взаимодействующих с классическим эритропоэтическим гомодимером ЕРОR (ЕРОR)<sub>2</sub>. Не имея намерения быть связанными с какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что указанная часть молекулы ЕРО взаимодействует с тканезащитным рецептором и, тем самым, опосредует защиту ткани.

Общепринята трехмерная структура ЕРО, которая описана в Cheetham et al., 1998, *Nat. Struct. Biol.* 5:861-866, включенной в данное описание в виде ссылки в полном объеме, и указана в виде последовательности SEQ ID NO:1 (также доступна в виде данных, депонированных в банке данных о белках National Center for Biotechnology Information, доступ "IBUY"). Части молекулы ЕРО, которые направлены в сторону от проксимальной по отношению к мембране части гомодимера ЕРОR при связывании с указанным рецептором (т.е. в сторону от клеточной мембраны, когда гомодимер (ЕРОR)<sub>2</sub> экспрессирован на поверхности клетки), состоят из следующих вторичных структур: петля АВ (соответствующая аминокислотам 29-55 последовательности SEQ ID NO:1), спираль В (соответствующая аминокислотам 56-82 последовательности SEQ ID NO:1), петля ВС (соответствующая аминокислотам 83-92 последовательно-

сти SEQ ID NO:1) и петля CD (соответствующая аминокислотам 112-138 последовательности SEQ ID NO:1). В одном варианте осуществления изобретения тканезащитные пептиды состоят из аминокислотных последовательностей, соответствующих последовательностям различных структур молекулы EPO.

Не имея намерения быть связанными с какой-либо теорией, авторы изобретения полагают, что тканезащитный рецептор образуется заранее, т.е. что белковые субъединицы EPOR и  $\beta_c$  функционально связываются до их взаимодействия с EPO. EPO является членом надсемейства цитокинов типа I. Члены ветви надсемейства цитокинов типа I характеризуются наличием четырех спиралей, которые гидрофобно взаимодействуют, образуя глобулярный белок, наружная поверхность которого взаимодействует с водной средой, и ее называют "направленной наружу". Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что не один, а несколько пептидов, полученных из направленной наружу части молекулы EPO, являются тканезащитными. Следующее неожиданное открытие заключается в том, что пептиды, полученные из частей молекулы EPO, которые погружены в комплекс EPO:(EPOR)<sub>2</sub>, и пептиды, которые также могут содержать части участков 1 или 2 связывания при эриптропоэзе, также являются высокоэффективными в защите ткани. Чтобы объяснить указанные открытия, авторы изобретения предположили, что успешная активация тканезащитного рецептора обусловлена подходящей пространственно компактной конфигурацией зарядов в пептидном лиганде. Кроме того, такая компактная конфигурация зарядов формируется двумя различными структурными мотивами: (1) двумя отрицательно заряженными аминокислотами, расположенными рядом друг с другом и фланкированными гидрофобными аминокислотами; или (2) положительно и отрицательно заряженными (т.е. основной и кислотной) аминокислотами, расположенными непосредственно рядом друг с другом и фланкированными одним гидрофобным или полярным аминокислотными остатками. Близость таких зарядов может возникать благодаря линейной структуре, обусловленной образованием пептидных связей, т.е. структура может быть образована следующими друг за другом аминокислотами в полипептидной цепи, или альтернативно близость также может возникать в результате пространственной взаимосвязи между различными частями молекулы EPO (или других молекул, родственных цитокину типа I), обусловленной третичной структурой белка, т.е. трехмерной структурой. Не имея намерения быть связанными с какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что, в общем, такое требование предполагает, что тканезащитный пептид будет иметь определенную третичную структуру (например, спирали или складчатые слои), которая обеспечивает требуемую пространственную локализацию пары заряженных аминокислот (т.е. двух отрицательно заряженных аминокислот и/или положительно и отрицательно заряженных аминокислот). Простым исключением является линейный пептид, в котором аминокислоты в паре расположены непосредственно рядом друг с другом, имеющий требуемую жесткость, придаваемую пептидным остовом. Соответственно, структурный мотив (1) подпадает под линейную последовательность аминокислотных остатков, например N<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6), или линейную последовательность аминокислотных остатков, в которой N<sub>1</sub> и N<sub>2</sub> разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более промежуточными остатками, например N<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-X-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11).

Для защиты ткани пара заряженных аминокислот должна быть пространственно ориентирована так, чтобы карбонильные атомы углерода находились на расстоянии друг от друга примерно от 3 до 5 Å, предпочтительно примерно от 4 до 5 Å друг от друга и более предпочтительно примерно от 4,4 до 4,8 Å друг от друга. Это может быть достигнуто несколькими путями, например за счет соседних заряженных аминокислот в простом линейном пептиде (см., например, пример 2 и пептид G, SEQ ID NO:40, в табл. 1) или в случае пептидов, которые могут образовывать альфа-спираль, за счет заряженных аминокислот, разделенных промежуточным аминокислотным остатком (см., например, пример 2 и пептид F, SEQ ID NO:33, в табл. 1). Необходимо отметить, что третичная структура (например, альфа-спираль в амфипатических пептидах) также может быть образована в том случае, когда пептид находится в специфическом микроокружении, таком как на границе раздела внеклеточного пространства и мембраны клеточной поверхности (см., Segrest, 1990, *Proteins*. 8:103-117, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Кроме того, защитная в отношении ткани активность прогнозируется для пептидов, которые содержат пары заряженных аминокислот, так, что заряженные боковые цепи (либо положительно и отрицательно заряженные, либо две отрицательно заряженные) находятся в пространстве в ограниченных пределах примерно от 6,5 до 9 Å друг от друга. Это может быть в условиях альфа-спирали благодаря тому, что заряженные члены пары разделены одной или двумя аминокислотами, что обеспечит нахождение зарядов более или менее на одной и той же стороне спирали на требуемом разделяющем их расстоянии примерно от 6,5 до 9 Å. Не ограничивающим примером такого пептида является пептид F (см. пример 2, SEQ ID NO:33 в табл. 1). Специалист в данной области может определить третичную структуру пептида, которая, в общем, требуется для получения подходящего трехмерного положения заряженных аминокислот, а также конструкцию небольших молекул для имитации разделения зарядов в пептиде.

Расстояния в пространстве между карбонильными атомами углерода любых двух аминокислот или между боковыми цепями любых двух аминокислот можно рассчитать любым способом, известным в данной области или описанным в данной публикации. Например, когда известна трехмерная структура

белка, разделение зарядов двух боковых цепей или расстояние в пространстве между двумя карбонильными атомами углерода в представляющей интерес части указанного белка могут быть рассчитаны на основании опубликованных или иначе принятых в данной области трехмерных координат аминокислотных остатков в указанной представляющей интерес части. В том случае, когда трехмерная структура белка, и поэтому представляющей интерес части, неизвестна или когда конструируют полностью синтетический пептид на основе приведенного в данном описании руководства, трехмерная структура которого неизвестна, разделение зарядов двух боковых цепей или расстояние в пространстве между двумя карбонильными атомами углерода в указанном пептиде можно оценить с использованием трехмерной структуры, рассчитанной с помощью компьютерной программы моделирования белков, которая известна в данной области. Не ограничивающими примерами такой компьютерной программы являются MOE™, Chemical Computing Group (Quebec, Canada) и Modeler by Accelrys (San Diego, California). Подобным образом в данной области также известна компьютерная программа для прогнозирования, также доступная от указанных выше компаний, для конструирования малых молекул, и соответственно специалист в данной области на основании приведенных в данном описании инструкций мог бы получить небольшие молекулы, которые имитируют описанные структурные мотивы.

Могут быть сконструированы не встречающиеся в природе или химерные пептиды, которые имитируют необходимую пространственную близость, описанную выше, посредством линейной последовательности аминокислот. Поэтому настоящее изобретение относится к новым тканезащитным пептидам, включая пептиды, которые имеют указанные структурные мотивы, которые приводят в действие защиту ткани.

Настоящее изобретение также относится к применению тканезащитных фрагментов других цитокинов типа I, включая без ограничения, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), интерлейкин-3 (IL-3), тромбопоэтин (TPO), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и ингибирующий лейкоз фактор (LIF), которые структурно гомологичны указанным выше направленным наружу аминокислотным последовательностям EPO и/или содержат описанные выше структурные мотивы.

Кроме того, тканезащитные пептиды могут представлять собой химерные соединения, основанные на структурных мотивах, описанных выше, объединяющие структурные элементы, которые не являются соседними, и только аминокислоты, представленные на поверхности. В частности, авторы изобретения определили, что добавление амфипатической пептидной спирали к указанным выше последовательностям увеличивает эффективность пептида.

Кроме того, тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению включают слитые пептиды, образованные в результате объединения двух или более указанных выше пептидов или объединения с родственной или неродственной макромолекулой для специфичного транспорта, такой как нативный EPO, инсулин или лептин.

#### 5.1.1. Фрагменты.

##### A. Полученные из EPO пептидные фрагменты.

Настоящее изобретение относится к новым тканезащитным пептидам, которые в одном варианте состоят из фрагментов аминокислотных последовательностей EPO, полученных на основании трехмерной структуры белка EPO, и, в частности, получены из таких областей EPO, которые направлены в сторону от участков связывания лиганда и/или внутренней части гомодимера EPOR. Указанные фрагменты получают из следующих структур EPO:

- (1) петля АВ и N-концевая часть спирали В (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29, соответствующая аминокислотам 38-57 последовательности SEQ ID NO:1);
- (2) С-концевая часть спирали В (QQAQVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30, соответствующая аминокислотам 58-82 последовательности SEQ ID NO:1) и
- (3) часть петли А-В, состоящая из небольшой цистеиновой петли и β-складчатого слоя (GCAENCSLNENITVPDTKVN, SEQ ID NO:31, соответствующая аминокислотам 28-47 последовательности SEQ ID NO:1).

Все указанные пептидные фрагменты, как описано в примере 2 (см. фиг. 1 и табл. 1), обладают тканезащитными свойствами.

Неожиданно некоторые пептиды, полученные из других областей молекулы EPO, которые скрыты, и другие пептиды, которые содержат части участков связывания с (EPOR)<sub>2</sub>, также являются тканезащитными. Например, пептид, состоящий из N-концевой части спирали А (APPRLICDSRVLRYLLEAKEAE, SEQ ID NO:32, соответствующая аминокислотам 1-23 последовательности SEQ ID NO:1), которая содержит часть участка 2 связывания EPOR (подчеркнута), является тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1). Однако присутствие аминокислот участка 2 не объясняет защитной в отношении ткани активности, так как пептид, состоящий из аминокислот 14-19 последовательности SEQ ID NO:1 (RYLLEAKEAENITTC, SEQ ID NO:33) и не содержащий аминокислот 11-13 последовательности SEQ ID NO:1 (т.е. VLE; аминокислоты участка 2, которые необходимы для связывания EPO с димером EPOR, (EPOR)<sub>2</sub>), также является тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1, также Elliott et al., 1997, Blood

89:493, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Авторы изобретения ранее показали, что мутации в участках связывания при эритропоэзе, которые аннулируют эритропоэз, не модифицируют тканезащитные свойства EPO (Leist et al. Science (2004), 305:239, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Специалисту в данной области будет понятно, что тканезащитный пептид могут образовывать фрагменты разной длины, хотя предпочтительно фрагмент имеет длину менее 30 аминокислот. Кроме того, тщательный отбор других молекул для включения, например D-аминокислот или полиэтиленгликоля, также позволит получить тканезащитные пептиды, но с увеличенным биологическим временем полужизни.

**В. Структурные мотивы.**

В частности, были идентифицированы следующие структурные мотивы, которые приводят в действие тканезащитный рецепторный комплекс.

(a) Конфигурация отрицательных зарядов ("структурный мотив А").

В данном структурном мотиве пептид имеет две отрицательно заряженные аминокислоты, которые могут быть разделены 5 аминокислотами, фланкированные гидрофобными аминокислотами. Структурно мотив можно представить в виде:

(a1) HNNH;

(a2) HNXNH;

(a3) HNXNH;

(a4) HNXNH;

(a5) HNXNH; или

(a6) HNXNH,

где H означает гидрофобные аминокислоты (например, умеренно гидрофобные аминокислоты: глицин, пролин, цистеин, тирозин и триптофан и предпочтительно высокогидрофобные аминокислоты: аланин, валин, изолейцин, метионин, лейцин, фенилаланин);

N означает отрицательно заряженные аминокислоты, такие как глутамат или аспартат;

X означает любую аминокислоту, хотя предпочтительно гидрофильную аминокислоту.

В некоторых вариантах фланкирующие гидрофобные аминокислоты являются одинаковыми. В других вариантах фланкирующие аминокислоты являются разными.

Вариант указанного структурного мотива включает пептид, в котором одна из фланкирующих гидрофобных аминокислот была заменена полярной аминокислотой, такой как серин, треонин, аспарагин или глутамин.

В качестве альтернативы пептидным связям, создающим взаимную близость двух отрицательных зарядов в линейной последовательности, необходимая близость зарядов также может быть создана благодаря трехмерной структуре, которая обсуждается выше (раздел 5.1). Например, отрицательно заряженные аминокислоты могут непосредственно соседствовать в пространстве на внешней поверхности спирали, но будут разделены дополнительными аминокислотами в линейной последовательности пептида. Например, в спирали А EPO (соответствующей аминокислотам 10-28 в последовательности SEQ ID NO:1), E18 и E21 находятся рядом в трехмерной структуре, но между ними имеются две промежуточные аминокислоты в линейной пептидной последовательности. В качестве дополнительного примера в спирали В (пептид D (SEQ ID NO:30; соответствующий аминокислотам 58-82 последовательности SEQ ID NO:1) E62 и E72 разделены двумя аминокислотами (Q65 и L69) на поверхности спирали, но между ними имеется 9 аминокислот в линейном пептиде. Пептиды, сконструированные из спирали А или спирали В, являются тканезащитными (см. пример 2 и табл. 1 ниже). В отличие от этого, пептид В (NITTGCAEHC~~SLNE~~, SEQ ID NO:34), пептид со сдвоенными отрицательными зарядами (подчеркнуты) на соответствующем расстоянии, но не имеющий фланкирующих гидрофобных аминокислот, не является тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1 ниже).

(b) Конфигурация отрицательной/положительной аминокислот ("структурный мотив В").

В данном структурном мотиве пептид имеет положительно заряженную аминокислоту вблизи отрицательно заряженной аминокислоты, и обе заряженные аминокислоты фланкированы одной и той же гидрофобной аминокислотой. Структурно мотив можно представить в виде:

(b1) HNRH; или

(b2) HRNH,

где R означает положительно заряженную аминокислоту, такую как аргинин, лизин или гистидин;

N означает отрицательно заряженную аминокислоту - глутамат или аспартат.

Как и в первом мотиве, взаимная близость двух противоположных зарядов может быть создана благодаря трехмерной структуре. Например, положительно и отрицательно заряженные аминокислоты могут быть пространственно близки на поверхности спирали, но будут разделены одной или несколькими аминокислотами в линейной пептидной последовательности. Например, в спирали В (соответствующей аминокислотам 58-82 в последовательности SEQ ID NO:1) E72 и R76 непосредственно соседствуют друг с другом на внешней поверхности спирали, и пептид, сконструированный из такой спирали, является

тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1).

В варианте такого конкретного мотива отрицательно и положительно заряженные аминокислоты могут быть разделены полярной аминокислотой, например

(b3) HNLPH;

(b4) HPLNH,

где L означает полярную аминокислоту, такую как серин, треонин, аспарагин или глутамин.

Примером такого мотива является пептид E (GCAEHC<sup>S</sup>LNENITV<sup>P</sup>DTKVN, SEQ ID NO:34), который является тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1).

Учитывая, что ядро указанного выше структурного мотива имеет длину, равную четырем аминокислотам, пептид с ядром в виде такого структурного мотива может приводить в действие тканезащитный рецептор. В некоторых вариантах полипептиды согласно изобретению содержат 1 структурный мотив. В альтернативных вариантах полипептиды согласно изобретению содержат более 1, более 2, более 3 или более 4 структурных мотивов. В некоторых вариантах, в которых полипептид содержит по меньшей мере два структурных мотива, мотивы являются одинаковыми. В альтернативных вариантах, в которых полипептид содержит по меньшей мере два структурных мотива, мотивы являются разными. Предпочтительно множество пептидов согласно настоящему изобретению, которые специалист в данной области может создать, имеют длину менее 30 аминокислот.

Специалисту в данной области будет понятно, что указанные выше структурные мотивы, в противоположность реальной аминокислотной последовательности ЕРО, являются важными для настоящего изобретения. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что изолированный пептид может иметь менее чем 90, менее чем 85, менее чем 80, менее чем 75, менее чем 70, менее чем 65, менее чем 60, менее чем 55, менее чем 50, менее чем 45, менее чем 40, менее чем 35, менее чем 30 или менее чем 20%-ную идентичность последовательности с любой частью аминокислотной последовательности зрелого эритропоэтина ("ЕРО") человека, указанной в SEQ ID NO:1, при этом указанная часть ЕРО содержит такое же количество аминокислотных остатков, что и указанный пептид.

Кроме того, в патенте США № 5700909, O'Brien et al. (который включен в данное описание в виде ссылки в полном объеме) описана 17-аминокислотная пептидная последовательность ЕРО (SEQ ID NO:11, O'Brien), которая индуцирует биологическую активность в клетках NS20Y, SK-N-MC и PC12, включая прорастание, дифференцировку, нейрозащиту и предотвращение гибели нейронов. Последовательность SEQ ID NO:11 согласно O'Brien (названная эпопептидом АВ), хотя и заявлена как последовательность, предположительно обладающая эритропоэтической активностью, в действительности не обладает такой эритропоэтической активностью и, как было обнаружено позже, не обладает активностью *in vivo*. Когда эпопептид АВ инъецировали в мышцу мышей, частота прорастания концевой пластинки двигательного нерва в расположенные рядом мышцы возрастала подобно тому, как это происходит при индукции цилиарным нейротрофическим фактором. Полученные данные объяснимы в рамках представления о том, что нейронные (но не гематологические) клетки отвечают на пептидную последовательность в пределах ЕРО и что ЕРО может иметь отдельные домены для нейротрофической и гематрофической активности (Campana et al., Int. J. Mol. Med. (1998), 1(1):235-241; J.S. O'Brien в патенте США № 5700909, выданном 23 декабря 1997 г.; J.S. O'Brien в патенте США № 5571787, выданном 5 ноября 1996 г.; J.S. O'Brien в патенте США № 5714459, выданном 3 февраля 1998 г.; и J.S. O'Brien and Y. Kashimoto в патенте США № 5696080, выданном 9 декабря 1997 г.). Однако O'Brien не рассматривал структурные мотивы, предлагаемые в настоящем изобретении, основанные на близости заряженных аминокислот в третичной структуре пептида.

### С. Фрагменты цитокина типа 1.

Учитывая пространственно компактную конфигурацию зарядов, способную активировать тканезащитный рецептор, авторы изобретения обнаружили, что некоторые фрагменты цитокинов типа 1 предположительно перекрестно взаимодействуют с тканезащитным рецептором. Такое семейство цитокинов включает без ограничения интерлейкин IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), лептин, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF), ингибирующий лейкоз фактор (LIF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), тромбopoэтин (TPO), гормон роста, колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF), эритропоэтин (ЕРО) и пролактин.

Рассмотрение вторичной структуры ЕРО является руководством для получения кандидата тканезащитных пептидов с помощью пространственного расположения аминокислот, полученных на основе гомологичных аминокислот, локализованных в гомологичных вторичных структурах в других лигандах рецепторов цитокинов типа 1: например, было показано, что среди прочих GM-CSF и IL-3 (Kannan, 2000, Neuroimmunomod. 8:132-141, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме) обладают высокими нейротрофическими и нейрозащитными активностями, в основном, как полагают авторы изобретения, вследствие стимуляции тканезащитного рецептора. Например, при рассмотрении спирали В цитокинов типа I видно: гомологичные аминокислоты в тромбopoэтине (TPO; Protein Data Bank (PDB), доступ 1V7M) включают D62, G65, T68, L69, E72, A76 и Q80, при этом указанные аминокис-

кислоты находятся в пространстве рядом друг с другом в линейном расположении; гомологичные аминокислоты в ингибирующем лейкоз факторе (LIF; PDB, доступ 1EMR) включают E61, R64, Y68, S72, N75 и D79; гомологичные аминокислоты в цилиарном нейротрофическом факторе (CNTF; PDB, доступ 1CNT) включают E71, E75. Все примеры являются примерами мотива А, описанного выше (раздел 5.1.1), где подчеркнутые аминокислоты являются отрицательно заряженными.

Примеры пептидов, полученных из цитокинов типа 1, которые являются примером структурного мотива В, охарактеризованного в данном описании выше (раздел 5.1.1), включают без ограничения фрагмент А-спирали GM-CSF, WENVNAIQEARRLL (SEQ ID NO:35); фрагмент А-спирали TPO, LSKLLRDSHVLH (SEQ ID NO:36); фрагмент В-спирали TPO: E56, K59; фрагмент А-спирали CNTF, KIRSDLTALTESYVKH (SEQ ID NO:37); фрагмент В-спирали CNTF: R89, E92, фрагмент В-спирали LIF, GTEKAKLVELYRIVVYL (SEQ ID NO:38) и фрагмент А-спирали интерлейкина 3 (IL-3) SIMIDEIINHLKRPPNPL (SEQ ID NO:39).

Указанные выше аминокислоты являются только примерами из нескольких членов надсемейства цитокинов, которые передают сигнал через рецепторы цитокинов типа 1, и специалист в данной области легко сможет идентифицировать гомологичные области в других членах надсемейства цитокинов.

### 5.1.2. Химеры.

"Химерные" тканезащитные пептиды - линейные аминокислотные последовательности, которые содержат нелинейные структурные элементы направленных наружу аминокислот молекулы EPO и имеют указанные выше структурные мотивы, - также входят в объем настоящего изобретения. Химерные тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению могут состоять из объединенных в одном пептиде структурных элементов отдельных аминокислотных последовательностей. Другими словами, химерный тканезащитный пептид может состоять из аминокислотных последовательностей, полученных из нелинейных, но расположенных рядом структурных элементов, таких как фрагмент, полученный из аминокислотных последовательностей 110-115, 133-136 и 160-165 последовательности SEQ ID NO:1, который может обеспечить возможность контактирования структурных элементов С-концевой части спирали С и N-концевой части петли С-D, β-складчатого слоя в петле С-D и С-концевой части EPO в одном пептиде. Кроме того, химерные тканезащитные пептиды могут быть использованы для отбора важных характерных признаков конкретной структуры, например направленных наружу аминокислот конкретной третичной структуры. Таким образом, химерный тканезащитный пептид может состоять из фрагмента, состоящего из аминокислот спирали В 58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84 и 85 (например, пептид G, QEQLERALNSS, SEQ ID NO:40) или, другими словами, из всех представленных с наружной стороны аминокислот спирали В EPO. Данный пептид является тканезащитным, как показано в примере 2 ниже (см. табл. 1).

Кроме того, эффективность тканезащитных пептидов согласно изобретению может быть увеличена посредством связывания амфипатической пептидной спирали. Амфипатические пептидные спирали хорошо известны в данной области, например спирали из пептидов, которые передают сигнал через сопряженные с G-белком рецепторы класса В (например, Segrest et al., 1990, Proteins. 8:103, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме), служащие для локализации пептидного лиганда на клеточной мембране. Примеры таких спиралей включают без ограничения высокогидрофобные области из кальцитонина (ALSILVLLQAGS, SEQ ID NO:48); кортиколиберина (VALLPCPPCRA, SEQ ID NO:49); бета-эндорфина (NAIKNAYKKG, SEQ ID NO:50); глюкагона (GSWQRSLODTE, SEQ ID NO:51); секретина (GGSAAARPAPP, SEQ ID NO:52); вазоинтестинального полипептида (NALAENDTPYY, SEQ ID NO:53); нейропептида Y (GALAEAYPSKP, SEQ ID NO:54); гонадолиберина (GCSSQHWSYGL, SEQ ID NO:55); паратиреоидного гормона (VMIVMLAICFL, SEQ ID NO:56); панкреатического полипептида (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO:28) и пептида, ассоциированного с геном кальцитонина (LALSILVLYQA, SEQ ID NO:57) (описанного в Grace et al., 2004, PNAS. 101:12836, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Например, химерный пептид, полученный из пептида с поверхностным мотивом зарядов спирали В EPO (QEQLERALNSS, SEQ ID NO:40), связанным на карбоксильном конце с амфипатической спиралью панкреатического полипептида (LRRYINMLTRP, SEQ ID NO:28) для получения химерного пептида. Могут быть осуществлены дополнительные модификации на карбоксильном конце амфипатической спирали, не влияющие на тканезащитные свойства. Таким образом, в следующем примере замена концевой пролина указанного выше химерного пептида последовательностью TR (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEQ ID NO:41) создает молекулу, обладающую высокой тканезащитной активностью, которая показана в анализе седативного нерва (см. фиг. 1).

Кроме того, вместо указанных выше спиралей с тканезащитными пептидами могут быть связаны другие третичные структуры. Например, представленные с наружной стороны аминокислоты спирали В могут быть связаны с β-складчатым слоем (CSLNENI, SEQ ID NO:42), обнаруженным в АВ-петле EPO, с образованием химерного пептида, имеющего последовательность CSLNENIQEQLERALNSS (SEQ ID NO:43), который является тканезащитным (см. пример 2 и табл. 1). Кроме того, наружные ами-



нокислоты концевой части спирали C (ALGKA, SEQ ID NO:44, соответствующие аминокислотам 111, 112, 113, 116 и 118 последовательности SEQ ID NO:1) могут быть объединены во всей или с частью неполной петли CD (LGAQKEAISPPDAASAAPLRTI, SEQ ID NO:45, соответствующей аминокислотам 112-133 последовательности SEQ ID NO:1). Предпочтительно между слитыми пептидами будет присутствовать связывающее плечо, чтобы обеспечить гибкость, так чтобы связанные пептиды могли принять надлежащую структурную ориентацию, чтобы связаться с тканезащитным рецепторным комплексом. Такие слитые пептиды могут обладать синергетическим действием, совместно давая больший тканезащитный эффект, чем при их действии по отдельности, вероятно благодаря усиленному связыванию с тканезащитным рецепторным комплексом или увеличенным биологическим временем полужизни.

Специалисту в данной области будет понятно польза объединения различных требуемых структурных элементов в одном пептиде для максимизации тканезащитных эффектов таких соединений. Такие химеры могут содержать состоящие из аминокислот пептиды и неаминокислотные элементы, такие как линкеры или образующие мостики атомы или остатки.

#### 5.1.3. Слитые пептиды.

Настоящее изобретение дополнительно предполагает, что два или более из указанных выше тканезащитных пептида, полученных фрагментов или химер, могут быть связаны с родственным или неродственным белком, таким как эритропоэтин, альбумин и т.д.

#### 5.1.4. Производство тканезащитных пептидов.

Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием способов рекомбинации или синтеза, хорошо известных в данной области. В частности, твердофазный синтез белков хорошо подходит для относительно коротких тканезащитных пептидов и может давать более высокие выходы с более постоянными результатами. Кроме того, твердофазный синтез белков может обеспечивать дополнительную гибкость производства тканезащитных пептидов. Например, требуемые химические модификации могут быть введены в тканезащитный пептид на стадии синтеза: в синтезе можно использовать гомоцитруллин вместо лизина, тем самым устраняя необходимость карбамиллировать пептид после синтеза.

#### Синтез.

При твердофазном синтезе пептида аминокислоты с защитой  $\alpha$ -аминогруппы и защитой боковой цепи иммобилизуют на смоле. См., например, Nilsson, B., Soellner, M., and 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 и Songster M.F., Barany G. 1997. *Handles for solid-phase synthesis*. *Methods Enzymol.* 289:126-74. Обычно используют два типа защитных групп  $\alpha$ -аминогруппы: чувствительную к кислотам трет-бутоксикарбонильную (Boc) группу или чувствительную к основаниям 9-флуоренилметилоксикарбонильную (Fmoc) группу. Wellings D.A., Atherton E. 1997. *Standard Fmoc protocols*. *Methods Enzymol.* 289:44-67. После быстрого и полного удаления указанных защитных групп  $\alpha$ -аминогруппы другие защищенные аминокислоты с активированной карбоксильной группой могут быть связаны с незащищенным связанным со смолой амином. Использование избытка активированных растворимых аминокислот приводит к полному завершению реакций связывания. Цикл удаления защиты и связывания повторяют до получения полной последовательности. После удаления защиты боковых цепей и отщепления от смолы получают требуемый пептид. Guy C.A., Fields G.B. 1997. *Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry*. *Methods Enzymol.* 289:67-83 и Stewart J.M. 1997. *Cleavage methods following Boc-based solid-phase synthesis*. *Methods Enzymol.* 289:29-44. Дополнительные способы осуществления твердофазного синтеза белка описаны в Bang, D. and Kent, S. 2004. *A One-Pot Total Synthesis of Crambin*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:2534-2538; Bang, D., Chopra, N., and Kent, S. 2004. *Total Chemical Synthesis of Crambin*. *J. Am. Chem. Soc.* 126:1377-1383; Dawson, P. et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science.* 266:776-779; Kochendoerfer et al. 2003. *Design and Chemical Synthesis of a Homogenous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein*. *Science.* 299:884-887. (Каждая цитированная в данном абзаце публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

При необходимости меньшие по размеру пептиды, полученные в результате твердофазного синтеза пептидов, могут быть объединены посредством связывания пептидов, например, с помощью естественных химических связей. В данном способе тиолат N-концевого остатка цистеина одного пептида воздействует на C-концевой тиоэфир второго пептида, приводя к транстиоэтерификации. Амидная связь образуется после быстрого ацильного переноса S $\rightarrow$ N. См. Dawson, P. et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science.* 266:776-779, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению могут включать пептидомиметики, пептиды, содержащие как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как пептоиды. Пептоиды являются олигомерами N-замещенных глицинов, гликохолевой кислоты, тиопролина, саркозина и тиорфана. Указанные структуры имеют тенденцию к образованию общей структуры  $(-(C=O)-CH_2-NR-)_n$ , при этом

R-группа действует в качестве боковой цепи. Такие пептоиды могут быть синтезированы с использованием твердофазного синтеза согласно протоколам Simon et al., *Peptoids: A molecular approach to drug discovery*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9367-9371 (1992) и Li et al., *Photolithographic Synthesis of Peptoids*, J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 4088-4089, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению пептидомиметиков или миметиков пептидов, непептидных лекарственных средств, обладающих свойствами, аналогичными свойствам матричных пептидов (Fauchere, J. (1986), *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Friedinger (1985), *TINS*, p. 32 и Evans et al. (1987), *J. Med. Chem.* 30:1229, публикации включены в виде ссылки). Обзор синтеза различных типов пептидомиметиков можно найти, например, в *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, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Способы рекомбинации.

Можно использовать различные системы хозяин-экспрессирующего вектора, чтобы получить тканезащитные пептиды согласно изобретению. Такие системы экспрессии в хозяине представляют собой векторы, посредством которых представляющий интерес тканезащитный пептид может быть получен и затем очищен, но также представляют собой клетки, в которых при трансформации или трансфекции подходящими кодирующими нуклеотидными последовательностями можно обнаружить модифицированный продукт гена эритропоэтина *in situ*. Такие системы включают без ограничения системы хозяев: бактерии, насекомые, растения, млекопитающие, включая человека, такие как, без ограничения, система клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусами), содержащими последовательности, кодирующие тканезащитный пептид; системы клеток растений, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, Ti-плазмидой), содержащими последовательности, кодирующие родственные эритропоэтину молекулы; или системы клеток млекопитающих, включая системы клеток человека, например HT1080, COS, CHO, ВНК, 293, 3Т3, несущих рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих, например промотор металлопротеина, или из вирусов млекопитающих, например поздний промотор аденовируса; промотор 7.5К вируса вакцинии.

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию встроенных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт специфичным требуемым образом. Такие модификации и процессинг белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Как известно специалистам в данной области, разные клетки-хозяева имеют специфичные механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Могут быть выбраны подходящие линии клеток или системы хозяев, чтобы обеспечить правильную модификацию и процессинг чужеродного экспрессированного белка. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые имеют клеточный аппарат для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такими клетками-хозяевами млекопитающих, включая клетки-хозяева человека, являются без ограничения HT1080, CHO, VERO, ВНК, HeLa, COS, MDCK, 293, 3Т3 и WI38.

Для долговременной, высокопроизводительной продукции рекомбинантных пептидов предпочтительна стабильная экспрессия.

Например, могут быть сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют продукт рекомбинантного гена тканезащитной родственной цитокину молекулы. Вместо использования экспрессирующих векторов, которые содержат вирусные начала репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК под контролем подходящих элементов регуляции экспрессии, например промотора, энхансера, последовательностями терминации транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.п., и селективируемым маркером. После введения чужеродной ДНК сконструированным клеткам дают возможность расти в течение 1-2 дней в обогащенных средах и затем переводят на селективные среды. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает резистентность к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в их хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножать до получения линий клеток. Такой способ преимущественно можно использовать, чтобы сконструировать линии клеток, которые экспрессируют тканезащитный продукт. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно применимы для скрининга и оценки соединений, которые влияют на эндогенную активность продукта гена родственной ЕРО молекулы.

Дополнительные модификации.

Могут быть осуществлены дополнительные модификации тканезащитных пептидов. Например, пептид может быть синтезирован с одной или несколькими (D)-аминокислотами. Выбор включения (L)- или (D)-аминокислоты в пептид согласно настоящему изобретению отчасти зависит от требуемых характеристик пептида. Например, включение одной или нескольких (D)-аминокислот может обеспечить повышенную стабильность пептида *in vitro* или *in vivo*. Включение одной или нескольких (D)-аминокислот также может увеличивать или уменьшать активность связывания пептида, которую определяют, например используя биологические анализы, описанные в данной публикации, или другие способы, хорошо известные в данной области.

Замена всей или части последовательности (L)-аминокислот соответствующей последовательностью энантиомерных (D)-аминокислот создает оптически изомерную структуру в соответствующей части полипептидной цепи. Инверсия последовательности всей или части последовательности (L)-аминокислот создает обратный аналог пептида. Комбинация замены энантиомеров (L на D или D на L) и инверсии последовательности создает обратный инверсный аналог пептида. Специалистам в данной области известно, что энантиомерные пептиды, их обратные аналоги и их обратные инверсные аналоги сохраняют значительную топологическую взаимосвязь с исходным пептидом и часто получают особенно высокую степень сходства исходного пептида и его обратного инверсного аналога. Указанная взаимосвязь и сходство могут отражаться в биохимических свойствах пептидов, в частности высокой степени связывания соответствующих пептидов и аналогом с белком-рецептором. Синтез обратных инверсных аналогов с определенными свойствами обсуждается, например, в *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) и цитированных в указанных публикациях ссылках, которые все включены в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

"Модификация" аминокислоты относится к изменению встречающейся в природе аминокислоты с получением не встречающейся в природе аминокислоты. Производные пептидов согласно настоящему изобретению с не встречающимися в природе аминокислотами могут быть созданы при химическом синтезе или посредством сайт-специфичного включения неприродных аминокислот в полипептиды во время биосинтеза, как описано в Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, 1989, *Science*, 244:182-188, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Миметики пептидов, которые сходны по структуре с терапевтически применимыми пептидами, можно использовать для получения эквивалентного терапевтического или профилактического действия. В общем, пептидомиметики структурно сходны с эталонным полипептидом (т.е. полипептидом, который обладает биохимическим свойством или фармакологической активностью), но в них одна или несколько пептидных связей необязательно заменены связью, выбранной из группы, состоящей из: --CH<sub>2</sub>-NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-- , --CH=CH-- (цис- и транс-), --COCH<sub>2</sub>-- , --CH(OH)CH<sub>2</sub>-- и --CH<sub>2</sub>SO-- ,

способами, известными в данной области и дополнительно описанными в следующих публикациях: Spatola, A.F. в «*Chemistry и 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*» (общий обзор); Morely, J.S., *Trends Pharma Sci.* (1980) pp. 463-468 (общий обзор); Hudson, D. et al., (1979) *Int. J. Pept. Prot. Re.* 14: 177-185 (--CH<sub>2</sub>-NH--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--); Spatola, A.F. et al., (1986) *Life Sci.* 38: 1243-1249 (--CH<sub>2</sub>-S); Harm, M. M., (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 307-314 (--CH=CH--, цис- и транс-); Almquist, R. G. et al., (1980) *J. Med.* 23: 1392(--COCH<sub>2</sub>--); Jennings-White, C et al., (1982) *Tetrahedron Lett.* 23: 2533 (--COCH<sub>2</sub>--); Szelke, M et al., *European Appln. EP 45665*(1982) CA:97:39405 (1982)(--CH(OH)CH<sub>2</sub>--); Holladay, M.W. et al., (1983) *Tetrahedron Lett* 24: 4401-4404 (--C(OH)CH<sub>2</sub>--) и Hruby, V.J., (1982) *Life Sci* 31: 189-199 (--CH<sub>2</sub>-S--);

каждая из которых включена в данное описание в виде ссылки.

В другом варианте особенно предпочтительной непептидной связью является --CH<sub>2</sub>NH--. Такие миметики пептидов могут иметь существенные преимущества по сравнению с полипептидными вариантами, включая, например более экономичное получение, более высокую химическую стабильность, улучшенные фармакологические свойства (время полужизни, всасывание, активность, эффективность и т.д.), измененную специфичность (например, биологические активности широкого спектра действия), пониженную антигенность и др.

Возможны различные конструкции миметиков пептидов. Например, циклические пептиды, в которых необходимая конформация стабилизирована непептидными компонентами, специально рассмотрены в патенте США № 5192746, Lobl, et al., патенте США № 5576423, Aversa, et al., патенте США № 5051448,

Shashoua и патенте США № 5559103, Gaeta, et al., которые включены в данное описание в виде ссылки, в которых описано несколько способов создания таких соединений. Синтез непептидных соединений, которые имитируют пептидные последовательности, также известен в данной области. В публикации Eldred et al., J. Med. Chem. 37:3882 (1994) (включенной в данное описание в виде ссылки в полном объеме) описаны непептидные антагонисты, которые имитируют пептидную последовательность. В публикации Likewise, Ku et al., J. Med. Chem. 38:9 (1995) (включенной в данное описание в виде ссылки в полном объеме) дополнительно описан синтез серии таких соединений.

После синтеза могут быть осуществлены дополнительные модификации. Например, тканезащитные пептиды могут быть дополнительно химически модифицированы, т.е. карбамилированы, ацетилированы, сукцинированы и т.д., согласно заявке на выдачу патента США № 10/188905, которая опубликована как 20030072737-A1 17 апреля 2003 г. и описывает химически модифицированный ЕРО, и согласно заявке на выдачу патента США № 10/612665, поданной 1 июля 2003 г., и заявке на выдачу патента США № 09/753132, поданной 29 декабря 2000 г., которые включены в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Кроме того, тканезащитные пептиды могут состоять из рекомбинантных тканезащитных пептидомутеинов. Обнаруженные мутации могут включать замены, делеции, включая внутренние делеции, присоединения, включая присоединения, которые дают слитые белки, или консервативные замены аминокислотных остатков в пределах и/или рядом с аминокислотной последовательностью, которые приводят к "молчащему" изменению, и неконсервативные аминокислотные замены и более крупные инсерции и делеции, которые описаны ранее в PCT/US03/20964, озаглавленной "Recombinant Tissue Protective Cytokines and Encoding Nucleic Acids Thereof for Protection, Restoration, and Enhancement of Responsive Cells, Tissues, and Organs" (которая включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Могут быть осуществлены либо консервативные, либо неконсервативные замены в одном или нескольких аминокислотных остатках. Могут быть осуществлены как консервативные, так и неконсервативные замены. Консервативными заменами являются замены, которые имеют место в пределах семейства аминокислот, которые являются родственными по своим боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты могут быть разделены на четыре семейства: (1) кислые = аспаргат, глутамат; (2) основные = лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные (гидрофобные) = цистеин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, глицин, тирозин и (4) незаряженные полярные = аспарагин, глутамин, серин, треонин. Неполярные могут быть дополнительно разделены на сильно гидрофобные = аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин и умеренно гидрофобные = глицин, пролин, цистеин, тирозин, триптофан. Альтернативным образом набор аминокислот можно сгруппировать в следующем виде: (1) кислые = аспаргат, глутамат; (2) основные = лизин, аргинин, гистидин; (3) алифатические = глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, при этом серин и треонин необязательно образуют отдельную группу алифатических, содержащих гидроксил аминокислот; (4) ароматические = фенилаланин, тирозин, триптофан; (5) амидные = аспарагин, глутамин и (6) серосодержащие = цистеин и метионин. (См., например, Biochemistry, 4<sup>th</sup> ed., Ed. by L. Stryer, W.H. Freeman and Co., 1995, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Альтернативно мутации могут быть введены случайным образом на протяжении всей или части кодирующей последовательности тканезащитного пептида, например посредством насыщающего мутагена, и может быть проведен скрининг полученных в результате мутантов в отношении биологической активности, чтобы идентифицировать мутанты, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый пептид может быть рекомбинантно экспрессирован и может быть определена активность рекомбинантного тканезащитного пептида.

В другом варианте тканезащитный пептид может быть дополнительно модифицирован посредством присоединения полимеров (таких как полиэтиленгликоль), сахара или дополнительных белков (например, в слитой конструкции), чтобы попытаться продлить время полужизни тканезащитного пептида и усилить тканезащитное действие пептида. Примеры таких модификаций описаны в WO/04022577 A3 и WO/05025606 A1, которые включены в данное описание в виде ссылки.

## 5.2. Анализы для тестирования тканезащитных пептидов.

### 5.2.1. Биологические скрининги или анализы.

Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению можно тестировать в отношении тканезащитной активности, например в отношении защиты клеток, тканей или органов. Кроме того, защитные активности могут быть тестированы с использованием анализов *in vitro* и *in vivo*. Тесты *in vitro*, которые являются показателем тканезащитной активности, включают, например, анализы пролиферации клеток, анализы дифференцировки клеток или выявление присутствия белков или нуклеиновых кислот, активность которых подвергается повышающей регуляции тканезащитным рецепторным комплексом, например тканезащитным рецепторным комплексом цитокинов, например нуклеолин, нейроглобин, цитоглобин или фратаксин. Нейроглобин, например, может быть вовлечен в осуществление транспорта или кратковременного хранения кислорода. Поэтому анализы транспорта или хранения кислорода можно использовать в качестве анализа для идентификации или скрининга соединений, которые модулируют тканезащитную активность.

Нейроглобин экспрессируется в клетках и тканях центральной нервной системы в ответ на гипоксию или ишемию и может обеспечивать защиту от повреждения (Sun et al. 2001, PNAS, 98:15306-15311; Schmid et al., 2003, J. Biol. Chem. 276:1932-1935, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Цитоглобин может играть сходную роль в защите, но экспрессируется в различных тканях на разных уровнях (Pesce et al., 2002, EMBO, 3:1146-1151, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). В одном варианте осуществления изобретения уровни подвергаемого повышающей регуляции белка в клетке могут быть измерены до и после контактирования тканезащитного пептида с клеткой. В некоторых вариантах присутствие подвергаемого повышающей регуляции белка, связанного с тканезащитной активностью в клетке, можно использовать для подтверждения тканезащитной активности пептида.

Нуклеолин может защищать клетки от повреждения. Он играет многочисленные роли в клетках, включая модулирование процессов транскрипции, специфичное для последовательности РНК связывания белка, цитокинеза, нуклеогенеза, сигнальной трансдукции, апоптоза, индуцированного Т-клетками, ремоделирования хроматина или репликации. Он также может функционировать в качестве ДНК/РНК-геликазы рецептора клеточной поверхности, ДНК-зависимой АТФазы, челночного белка, компонента фактора транскрипции или репрессора транскрипции (Srivastava and Pollard, 1999, FASEB J., 13:1911-1922 и Ginisty et al., 1999, J. Cell Sci., 112:761-772, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Фратаксин представляет собой белок, который вовлечен в митохондриальный метаболизм железа и который, как было показано ранее, в значительной степени подвергается повышающей регуляции при действии ЕРО как *in vivo*, так и *in vitro* (Sturm et al. (2005), Eur. J. Clin. Invest. 35:711, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

Экспрессия подвергаемого повышающей регуляции белка может быть выявлена посредством регистрации уровней мРНК, соответствующей белку, в клетке. мРНК можно гибридизовать с зондом, который специфично связывает нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, подвергаемый повышающей регуляции.

Гибридизация может представлять собой, например, нозерн-блот, саузерн-блот, гибридизацию на матрицах, аффинную хроматографию или гибридизацию *in situ*.

Тканезащитная активность полипептида согласно изобретению также может быть выявлена с использованием анализа нейрозащиты *in vitro*. Например, первичные культуры нейронов могут быть получены из гиппокампа новорожденных крыс трипсинизацией, и их можно культивировать любым способом, известным в данной области и/или описанным в данной публикации, например в ростовой среде МЕМ-II (Invitrogen), содержащей 20 мМ D-глюкозы, 2 мМ L-глутамин, 10% Nu-сыворотки (бычья; Vecton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 2% добавки B27 (Invitrogen), 26,2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 100 ед./мл пенициллина и 1 мг/мл стрептавидина (см., например, Leist et al., 2004, Science. 305:239-242, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Через 1 день после посева добавляют 1 мкМ цитозинарабинофуранозида. Затем 13-дневные культуры предварительно инкубируют с возрастающими дозами ЕРО или СЕРО (3-3000 пМ) в течение 24 ч. На 14-й день среду удаляют и культуры стимулируют 300 мкМ NMDA в PBS при комнатной температуре. Через 5 мин ранее кондиционированную среду возвращают в культуры, и культуры возвращают в инкубатор на 24 ч. Клетки фиксируют в параформальдегиде, красят Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR), затем можно подсчитать конденсированные апоптотные ядра. В качестве позитивных контролей включают NGF (50 нг/мл) и МК801 (1 мкМ).

Модельные системы на животных можно использовать для демонстрации тканезащитной активности соединения или для демонстрации безопасности и эффективности соединений, идентифицированными способами скрининга согласно изобретению, описанными выше. Соединения, идентифицированные в анализах, затем можно тестировать в отношении биологической активности, используя модели на животных для представляющего интерес типа повреждения ткани, заболевания, состояния или синдрома. Модели включают животных, созданных так, чтобы они содержали тканезащитный рецепторный комплекс, связанный с функциональной индикаторной системой, таких как трансгенная мышь.

Модели на животных, которые можно использовать для тестирования эффективности защитной по отношению к клеткам или тканезащитной активности идентифицированного соединения, включают, например, защиту от появления острого экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЕАЕ; см. пример 11) у крыс Lewis, восстановление или защиту от понижения когнитивной функции у мышей после получения травмы головного мозга, ишемии головного мозга ("инсульта"; пример 5) или судороги, индуцированной эксцитотоксинами (Brines et al., 2000, PNAS, 97:10295-10672, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме), защиту от индуцированной ишемии сетчатки (Rosenbaum et al., 1997, Vis. Res. 37:3443-51, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме), защиту от повреждения седлищного нерва (см. пример 2) и защиту от ишемического-реперфузионного повреждения сердца (исследования кардиомиоцитов *in vitro* и ишемического-реперфузионного повреждения *in vivo*, см., например, Calvillo et al., 2003, PNAS, 100:4802-4806 и Fiordaliso et al., 2005, PNAS, 102:2046-2051, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Такие анализы более подробно описаны в Grasso et al. (2004), Med. Sci. Monit.

10:BR1-3 или в публикации PCT № WO 02/053580, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Описанные способы *in vivo* направлены на введение ЕРО, однако было показано, что тканезащитные белки, введенные вместо ЕРО, также проявляют сходную биологическую активность, например, Leist et al. (2004), Science, 305:239-242, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Пептиды для тестирования также могут иметь замены. Другие анализы для определения тканезащитной активности пептида хорошо известны специалистам в данной области.

#### 5.2.2. Анализы связывания с клетками.

Альтернативно можно использовать анализы связывания клетками для оценки полипептидов согласно изобретению. Например, представляющий интерес тканезащитный пептид может быть связан с биологическим маркером, таким как флуоресцентный или радиоактивный маркер, для облегчения регистрации и затем тестирован в отношении связывания с трансфицированными клетками ВаF3, экспрессирующими ЕРОR и/или  $\beta_c$ -рецептор. В 96-луночный планшет высевают восемь серийных разведений 1:2 представляющего интерес тканезащитного пептида в среде роста (RPMI 1640, 10% фетальная телячья сыворотка, 1 мМ пируват натрия, 2 мМ L-глутамин), так чтобы конечный объем в каждой лунке составлял около 100 мкл. Исходную линию ВаF3 и клетки ВаF3, трансфицированные ЕРОR и/или  $\beta_c$ -рецептором, можно три раза промыть в среде роста (см. выше), осадки ресуспендировать в среде роста и клетки подсчитать и разбавить в среде роста до концентрации 5000 клеток/100 мкл. Затем добавляют 100 мкл разбавленных клеток к каждому разбавлению пептида. Затем анализируемый планшет инкубируют в инкубаторе при 37°C в течение 3-4 дней. Затем планшет/клетки промывают и планшет считывают в устройстве для регистрации флуоресценции с планшетов или другим подходящим способом, чтобы определить уровень биомаркера, связанного с биологической активностью представляющего интерес тканезащитного пептида.

Подобным образом можно использовать конкурентный анализ для определения того, является ли тканезащитный пептид тканезащитным. В конкурентном анализе соединение, известное как тканезащитное, включая без ограничения тканезащитные цитокины, такие как цитокины, описанные в заявках на выдачу патента США № 10/188905 и 10/185841 (каждая из которых включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме), могут быть связаны с подходящим биомаркером.

В 96-луночный планшет помещают восемь серийных разведений 1:2 известного тканезащитного соединения/биомаркера в подходящей среде роста и такую же серию разведений известного тканезащитного соединения/биомаркера и избыток представляющего интерес тканезащитного пептида. Конечный объем каждого разведения должен составлять около 100 мкл. Затем клетки ВаF3 высевают в планшеты, как описано выше, и инкубируют. Через определенный период времени клетки промывают и планшет считывают в устройстве для определения флуоресценции в планшетах или любым другим подходящим способом, известным в данной области для регистрации биомаркера. Если показания для планшетов и/или лунок, содержащих известное тканезащитное соединение/биомаркер и представляющий интерес тканезащитный пептид, меньше, чем показания для планшетов, содержащих только известное тканезащитное соединение/биомаркер, то представляющий интерес тканезащитный пептид является тканезащитным.

#### 5.2.3. Цитокинная активность и активность в пролиферации/дифференцировке клеток.

Многие белковые факторы, обнаруженные до настоящего времени, включая все известные цитокины, проявляли активность в одном или нескольких анализах зависимой от факторов пролиферации клеток, и поэтому такие анализы служат для соответствующего подтверждения цитокинной активности.

Активность тканезащитного пептида может быть подтверждена любым из ряда обычных анализов зависимой от факторов пролиферации клеток для клеточных линий, включая без ограничения 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, ВаF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e и CMK. Указанные клетки культивируют в присутствии или в отсутствие тканезащитного пептида и пролиферацию клеток регистрируют, например, измеряя включение меченного тритием тимидина или колориметрическим анализом, основанным на метаболическом расщеплении бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) (Mosman, 1983, J. Immunol. Meth. 65:55-63, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

#### 5.2.4. Другие анализы.

Если тканезащитный пептид проявляет тканезащитную активность, то специалисту в данной области будет понятно, что может быть полезной проверка результата с использованием одного из анализов нейрозащиты и защиты ткани, известных специалистам в данной области, таких как, без ограничения, анализы на клетках Р-19 и РС-12. Кроме того, различные модели *in vivo*, такие как модели на животных, связанные с повреждением спинного мозга, ишемическим инсультом, повреждением периферического нерва, сердца, глаз, почек и т.д., могут быть применимы для дополнительной характеристики тканезащитного пептида. Подходящие анализы *in vitro* и *in vivo* описаны в заявках на выдачу патентов США № 10/188905 и 10/185841, которые включены в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

### 5.3. Терапевтическое применение.

Специалисту в данной области будет понятно, что тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению применимы в качестве терапевтических средств для лечения или профилактики различных заболеваний, расстройств и состояний. Специалисту в данной области также будет понятно, что такие пептиды можно использовать для осуществления модулирования тканезащитного рецепторного комплекса, например тканезащитного цитокинового комплекса. Способы *in vitro* и *in vivo*, которые можно использовать для оценки терапевтических показаний для применения соединений, идентифицированных в предлагаемых в изобретении и указанных выше анализах, описаны в заявке РСТ № РСТ/US01/49479, заявке на выдачу патента США № 10/188905 и 10/185841, включенных в данное описание в виде ссылки.

Указанные выше тканезащитные пептиды согласно изобретению в общем могут быть применимы для профилактики, терапевтического лечения или профилактического лечения заболеваний или расстройств центральной нервной системы или периферической нервной системы человека, при которых главным образом наблюдаются неврологические или психиатрические симптомы, глазных болезней, сердечно-сосудистых заболеваний, сердечно-легочных заболеваний, респираторных заболеваний, заболеваний почек, мочевой системы и репродуктивной системы, костных болезней, кожных болезней, заболеваний соединительной ткани, желудочно-кишечных заболеваний и эндокринных и метаболических нарушений. Примеры применения включают без ограничения защиту от повреждений и восстановление повреждений, возникающих в результате травмы и приводящих к воспалению головного мозга (ишемический инсульт, тупая травма, субарахноидальное кровоизлияние), спинного мозга (ишемия, травма от удара тупым предметом), периферических нервов (повреждение седалищного нерва, диабетическая нейропатия, синдром карпального канала), сетчатки (отек желтого пятна, диабетическая ретинопатия, глаукома) и сердца (инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность). В частности, такие заболевания, расстройства и состояния включают состояния гипоксии, которые неблагоприятно влияют на чувствительные ткани, такие как возбудимые ткани, например ткани центральной нервной системы, ткани периферической нервной системы, или ткани сердца, или ткани сетчатки, такие как, например, ткани головного мозга, сердца или сетчатки/глаза. Поэтому тканезащитные пептиды согласно изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики повреждения чувствительной ткани в результате состояний гипоксии при различных состояниях и обстоятельствах. Не ограничивающие примеры таких состояний и обстоятельств указаны в таблице ниже.

Тканезащитные полипептиды также представляют интерес для модулирования активности стволовых клеток. Было установлено, что цитокины, проявляющие тканезащитную активность, например ЕРО, способны мобилизовать стволовые клетки, стимулируя миграцию в области повреждения и помогая процессу восстановления, например регенерации. Например, в случае экспериментального инсульта ЕРО опосредует миграцию нейробластов в область ишемического повреждения с регенерацией нейронов в ходе восстановительного периода (Tsai et al., *J. Neurosci* (2006), 26:1269-74, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). В качестве другого примера ЕРО и СЕРО мобилизуют эндотелиальные клетки-предшественники из костного мозга в кровообращение. Затем происходит хоминг указанных клеток в отдаленных областях, и они участвуют в образовании новых кровеносных сосудов (эффект ЕРО см. Bahlmann et al., 2003, *Kidney Int.* 64:1648-1652, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Не имея намерения быть связанными с какой-либо конкретной теорией, авторы полагают, что изолированные полипептиды, охарактеризованные в данном описании, оказывают подобное влияние на миграцию стволовых клеток.

В примере защиты от патологий нервной ткани, которые можно лечить и предотвращать с использованием тканезащитных пептидов согласно изобретению, такие патологии включают патологии, которые возникают в результате пониженной оксигенации нервных тканей. Любое состояние, которое уменьшает доступность кислорода в нервную ткань, приводящее к стрессу, повреждению и, наконец, гибели нервных клеток, можно лечить с применением тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению. В общем называемые гипоксией и/или ишемией такие состояния возникают в результате или включают без ограничения инсульт, окклюзию сосудов, пренатальную или постнатальную кислородную недостаточность, удушье, асфиксию, клиническую смерть, отравление оксидом углерода, вдыхание дыма, травму, включая хирургическую операцию и лучевую терапию, асфиксию, эпилепсию, гипогликемию, хроническое обструктивное легочное заболевание, эмфизему, респираторный дистресс-синдром взрослых, гипотензивный шок, септический шок, анафилактический шок, инсулиновый шок, серповидноклеточный кризис, остановку сердца, аритмию, азотный наркоз и неврологические расстройства, вызванные процедурой искусственного кровообращения.

В одном варианте, например, тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению, идентифицированные с использованием предложенного в изобретении анализа, могут быть введены отдельно или в виде части композиции для профилактики травмы или повреждения ткани в случае существования риска травмы или повреждения ткани перед, во время или после хирургической операции или медицинской процедуры. Например, хирургические операции могут включать резекцию опухоли или реконструкцию при аневризме, и медицинские процедуры могут включать роды или родоразрешение. Другие патологии, вызванные или возникающие в результате гипогликемии, которые можно лечить с примене-

нием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению, включают передозировку инсулина, также называемую ятрогенной гиперинсулинемией, инсулиному, недостаточность гормона роста, гипокортицизм, передозировку лекарственных средств и некоторые опухоли.

Другие патологии, возникающие в результате повреждения возбудимой нервной ткани, включают судорожные расстройства, такие как эпилепсия, конвульсии или хронические судорожные расстройства. Другие состояния и заболевания, которые можно лечить, включают без ограничения такие заболевания, как инсульт, рассеянный склероз, гипотонию, остановку сердца, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, церебральный паралич, травму головного или спинного мозга, связанную со СПИДом деменцию, возрастную потерю когнитивной функции, потерю памяти, боковой амиотрофический склероз, судорожные расстройства, алкоголизм, ишемию сетчатки, повреждение зрительного нерва в результате глаукомы и гибель нейронов.

Специфические тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или профилактики воспаления в результате патологических состояний или различных травм, например физически или химически индуцированного воспаления. Также предполагается применение тканезащитных пептидов для лечения и профилактики воспалительных состояний в одном или нескольких органах или тканях, включая без ограничения головной мозг, спинной мозг, соединительную ткань, сердце, легкое, почки и мочевыводящие пути, поджелудочную железу, глаза и простату. Не ограничивающие примеры такой травмы включают тендинит, ангиит, хронический бронхит, панкреатит, остеомиелит, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, неврит зрительного нерва, височный артериит, энцефалит, менингит, поперечный миелит, дерматомиозит, полимиозит, некротизирующий фасцит, гепатит и некротизирующий энтероколит. Кроме того, тканезащитные цитокины можно применять для лечения или профилактики воспаления, возникающего в результате ишемических и неишемических состояний, включая без ограничения аллергии, ревматические заболевания, спортивные тренировки, инфекции, включая вирусные, грибковые и бактериальные. Воспаление может быть острым или хроническим. Дополнительные применения в области воспаления указаны в заявке PCT/US2004/031789, поданной 29 сентября 2004 г. и опубликованной как WO 2005/032467, которая включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Специфические тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний центральной нервной системы и периферической нервной системы, возникающих в результате демиелинизации или повреждения миелиновой оболочки. Такие заболевания главным образом определяют как заболевания, в которые вовлечены воспалительные повреждения миелиновой оболочки неизвестного происхождения, за исключением заболеваний, связанных с недостаточностью миелинизации, таких как лейкодистрофия, и заболеваний вследствие очевидных причин. Рассеянный склероз (MS) является типичным заболеванием в группе демиелинизирующих заболеваний и патологически характеризуется изменениями, в основном, воспалительной демиелинизацией и глиозом. Так его этиология неизвестна, то диагноз осуществляют на основе клинических признаков, т.е. разнообразными в пространственном и временном отношении повреждениями центральной нервной системы. Кроме того, к демиелинизирующим заболеваниям относятся острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM), воспалительный диффузный склероз, острый и подострый некротизирующий геморрагический энцефаломиелит и поперечный миелит. Также сохранение миелиновой оболочки периферических нервов основано на Шванновских клетках, и повреждение таких клеток вызывает периферическое демиелинизирующее заболевание.

Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или профилактики состояний и повреждения сердца, включая любое хроническое или острое патологическое явление, в которое вовлечено сердце и/или связанные с ним ткани (например, перикард, аорта и другие связанные кровеносные сосуды), включая ишемическое-реперфузионное повреждение; застойную сердечную недостаточность; остановку сердца; инфаркт миокарда; атеросклероз, нарушение герметичности митрального клапана, трепетание предсердий, кардиотоксичность, вызванную соединениями, такими как лекарственные средства (например, доксорубин, герцептин, тиоридазин и цизаприд); повреждение сердца вследствие паразитарной инфекции (бактериями, грибами, риккетсиями и вирусами, например сифилис, хроническая инфекция *Toxoplasma gondii*); молниеносный амилоидоз сердца; операцию на сердце; трансплантацию сердца; ангиопластику, лапароскопическую операцию, повреждение сердца в результате травмы (например, проникающее или тупое повреждение сердца и разрыв клапанов аорты), хирургическое восстановление аневризмы грудной аорты; аневризму надпочечниковой артерии; кардиогенный шок вследствие инфаркта миокарда или сердечной недостаточности; нейрогенный шок и анафилактику. Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения людей, для которых существует риск болезни сердца, такой как сердечная недостаточность (т.е. когда сердце не способно перекачивать кровь со скоростью, необходимой для метаболизирующих тканей, или когда сердце может выполнять эту задачу только при повышенном давлении наполнения). К таким пациентам группы риска могут относиться пациенты, имеющие инфаркт миокарда, или для которых существует риск развития инфаркта миокарда, имеющие болезнь коронарных артерий, миокардит, химиотерапию, кардиомиопатию, гипертонию, порок клапана сердца (наиболее часто митральную недостаточ-



ность и стеноз устья аорты) и индуцированную токсинами кардиомиопатию (например, этанолом, кокаином и т.д.) и т.п.

Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или профилактики состояний и повреждения глаз, например ткани сетчатки. Такие расстройства включают без ограничения ишемию сетчатки, дегенерацию желтого пятна, отслоение сетчатки, пигментную дегенерацию сетчатки, артериосклеротическую ретинопатию, гипертензивную ретинопатию, закупорку артерии сетчатки, закупорку вены сетчатки, гипотензию и диабетическую ретинопатию.

В другом варианте тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению и принципы осуществления изобретения можно применять для профилактики или лечения повреждения, возникающего в результате повреждения чувствительной ткани облучением. Дополнительным применением тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению является лечение отравления, такого как отравление нейротоксинами (например, отравление домоевой кислотой моллюсков), токсинами (этанолом, кокаином и т.д.), также как в результате воздействия химиотерапевтических средств и облучения; нейролатиризма; болезни Гуама; бокового амиотрофического склероза и болезни Паркинсона.

Как указано выше, настоящее изобретение также относится к тканезащитным пептидам согласно настоящему изобретению для применения при усилении функции ткани в случае отвечающих клеток, тканей и органов млекопитающего посредством периферического введения тканезащитного цитокина, который описан выше. Различные заболевания и состояния поддаются лечению с применением указанного способа. Например, данный способ применим для усиления функции возбудимых тканей, приводящего к повышению когнитивной функции даже в отсутствие какого-либо состояния или заболевания. Кроме того, тканезащитные цитокины применимы для улучшения качества заживления ран, уменьшения времени, необходимого для заживления, улучшения качества излеченных тканей и уменьшения частоты образования рубцов в результате ранения. См. заявку PCT/US2004/031789, поданную 29 сентября 2004 г. и опубликованную как WO 2005/032467, которая включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Указанные применения согласно настоящему изобретению более подробно описаны ниже и включают улучшение обучения и тренировки как у человека, так и у млекопитающих, отличных от человека.

Состояния и заболевания, которые можно лечить или предотвращать с использованием тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению, направленных на центральную нервную систему, включают без ограничения расстройства настроения, тревожные расстройства, депрессию, аутизм, гиперактивное расстройство с дефицитом внимания и когнитивную дисфункцию. При указанных состояниях полезно усиление функции нейронов. Другие расстройства, которые можно лечить согласно инструкциям, предлагаемому в настоящем изобретении, включают нарушение сна, например апноэ во сне, и расстройства, связанные с путешествиями; субарахноидальное кровоизлияние и кровоизлияние при аневризмах, гипотонический шок, повреждение при ударе, септический шок, анафилактический шок и осложения при различных энцефалитах и менингитах, например, связанные с заболеванием соединительной ткани церебриты, например волчанку.

Другие применения включают профилактику или защиту от отравления нейротоксинами, такого как отравление домоевой кислотой моллюсков, нейролатиризма и болезни Гуама, бокового амиотрофического склероза, болезни Паркинсона; для послеоперационного лечения эмболического или ишемического повреждения; облучения всего головного мозга; серповидноклеточного кризиса и эклампсии.

Следующая группа состояний, которые можно лечить или предотвращать с применением тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению, включает митохондриальную дисфункцию либо наследственной природы, либо приобретенную, которая является причиной множества неврологических болезней, характеризующихся повреждением и гибелью нейронов. Например, болезнь Лейга (подострая некротизирующая энцефалопатия) характеризуется прогрессирующей потерей зрения и энцефалопатией вследствие утраты нейронов и миопатии. В таких случаях нарушенный метаболизм в митохондриях не может поставлять достаточно высокоэнергетические субстраты для подпитки метаболизма возбудимых клеток. Тканезащитный пептид оптимизирует поврежденную функцию при различных митохондриальных заболеваниях. Как указано выше, состояния гипоксии неблагоприятно влияют на возбудимые ткани. Возбудимые ткани включают без ограничения ткань центральной нервной системы, ткань периферической нервной системы и ткань сердца. Кроме описанных выше состояний, тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению применимы для лечения ингаляционного отравления, такого как вдыхание оксида углерода и дыма, тяжелой астмы, респираторного дистресс-синдрома взрослых и удушья, и клинической смерти. Кроме состояний, которые создают условия гипоксии, или другими путями индуцируют чувствительную ткань, например возбудимую ткань, повреждение включает гипогликемию, которая может возникать при введении несоответствующих доз инсулина или в случае продуцирующих инсулин неоплазм (инсулиномы).

Различные нейropsychологические расстройства, которые, как описано, возникают в результате повреждения возбудимой ткани, можно лечить с применением тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению. Хронические расстройства, в которые вовлечено повреждение нейронов и лечение или профилактика которых предлагается в настоящем изобретении, включают расстройства, связанные с

центральной нервной системой и/или периферической нервной системой, включая возрастную потерю когнитивной функции и старческую деменцию, хронические судорожные расстройства, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, потерю памяти, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, туберозный склероз, болезнь Вильсона, церебральный и прогрессирующий супрануклеарный паралич, болезнь Гуама, деменцию с тельцами Леви, прионные болезни, такую как губчатая энцефалопатия, например болезнь Якоба-Крейтцфельда, болезнь Хантингтона, миотоническую дистрофию, атаксию Фрейдриха и другие атаксии, а также синдром Жиль де ля Туретта, судорожные расстройства, такие как эпилепсия и хроническое судорожное расстройство, инсульт, травму головного мозга или спинного мозга, связанную со СПИДом деменцию, алкоголизм, аутизм, ишемию сетчатки, глаукому, расстройства автономной функции, такие как гипертония и расстройства сна, и нейропсихиатрические расстройства, которые включают без ограничения шизофрению, шизофреноподобное аффективное расстройство, расстройство с дефицитом внимания, дистимическое расстройство, глубокое депрессивное расстройство, манию, обсессивно-компульсивное расстройство, расстройства вследствие применения психоактивных веществ, тревожность, паническое расстройство, а также монополярные и биполярные аффективные расстройства. Дополнительные нейропсихиатрические и нейродегенеративные расстройства включают, например, расстройства, перечисленные в American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM), самая последняя версия которого включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Следующая группа состояний, которые можно лечить или предотвращать с применением тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению, включает заболевания почек, такие как почечная недостаточность, острая и хроническая. Кровоснабжение почек может быть прервано вследствие нескольких причин, включая шок в результате инфекций, проникающих в кровоток (сепсис), внутренние или наружное кровотечение, потерю жидкости организмом в результате тяжелой диареи или ожогов, реакции на трансфузии, остановку сердца или аритмии, хирургическую травму и трансплантации почек. Уменьшенный поток крови в почки, возникающий в результате указанных выше состояний, может уменьшать поток крови до опасно низких уровней в течение достаточно большого периода времени, чтобы вызвать развитие острой почечной недостаточности. Пониженный поток крови также приводит к некрозу или гибели ткани в почке, повреждая почечные тубулярные клетки. Почечная недостаточность также может возникать в результате заболеваний (интерстициальных и диабетических) нефротических синдромов, инфекций, повреждения (СРВ-индуцированного), токсинов (индуцированная контрастными веществами, индуцированная химиотерапией, циклоспорином), аутоиммунного воспаления (например, волчанки, эритроза и т.д.). Тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению способствуют восстановлению или предотвращению такого повреждения, помогая уменьшить острую почечную недостаточность. В следующей таблице перечислены дополнительные иллюстративные не ограничивающие показания в отношении различных состояний и заболеваний, поддающихся лечению указанными выше тканезащитными пептидами.

Клетка, ткань или орган	Дисфункция или патология	Состояние или заболевание	Тип
Сердце	Ишемия	Болезнь коронарных артерий	Острое, хроническое, стабильное, нестабильное
		Инфаркт миокарда	Синдром Дресслера
		Стенокардия	
		Врожденный порок сердца	Вальвулярный Кардиомиопатия
		Стенокардия Принцметала	
		Разрыв сердца	Аневризматический Перфорация перегородки
		Ангиит	
	Аритмия	Тахикардия, брадикардия, суправентрикулярная, вентрикулярная, нарушения проводимости	Стабильный, нестабильный Гипертензивный каротидный синусный узел
	Застойная сердечная недостаточность	Левый, правый, оба желудочка, систолическая, диастолическая	Кардиомиопатии, такие как идиопатическая семейная, инфекционная, метаболическая, болезнь накопления, недостаточности, заболевание соединительной ткани, инфильтрация и гранулемы, нейроваскулярная
		Миокардит	Аутоиммунный, инфекционный, идиопатический
		Легочное сердце	
	Радиационное повреждение		
	Тупая и проникающая травма		
	Токсины	Токсичность кокаина, адриамицин	
Сосуды	Гипертензия	Легочная, вторичная	
	Декомпрессионная болезнь		
	Фиброзно-мышечная гиперплазия		
	Аневризма	Расслаивающаяся, с разрывом, расширяющаяся	
Легкие	Обструктивное	Астма	
		Хронический бронхит, Эмфизема и обструкция дыхательных путей	
	Ишемическая болезнь легких	Легочная эмболия, Легочный тромбоз, жировая эмболия	
	Болезни легких, обусловленные факторами среды		
	Ишемическая болезнь легких	Легочная эмболия, Легочный тромбоз	
Интерстициальное заболевание легких	Идиопатический легочный фиброз		

	Врожденная	Кистозный фиброз		
	Легочное сердце			
	Травма			
	Пневмония и пневмониты	Инфекционные, паразитарные, токсические, травматические, ожоговые, аспирационные		
	Саркоидоз			
Поджелудочная железа	Эндокринные	Сахарный диабет типа I и II	Недостаточность бета-клеток, дисфункция, диабетическая нейропатия	
		Другая недостаточность эндокринных клеток поджелудочной железы		
	Экзокринные	Экзокринная недостаточность поджелудочной железы	Панкреатит	
Кости	Остеопения	Первичная	Гипогонадизм Иммобилизация Постменопаузная Возрастная Гиперпаратиреозидизм Гипертиреозидизм Недостаточность кальция, магния, фосфора и/или витамина D	
		Вторичная		
		Остеомиелит		
		Аваскулярный некроз		
	Травма			
Болезнь Педжета				
Кожа	Алопеция	Очаговая Тотальная	Первичная Вторичная Облысение мужского типа	
	Витилиго	Локализованное Генерализованное	Первичное Вторичное	
	Образование язв	Диабетическое Пролежни	Пролежни, пролежневые язвы	
	Болезнь периферических сосудов			

	Хирургические раны, рваные раны		
	Ожоговые повреждения		
Аутоиммунные заболевания	Системная красная волчанка, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, гломерулонефрит, ангиит		
	Гистиоцитоз Лангерганса		
Глаза	Неврит зрительного нерва		
	Тупые и проникающие повреждения, инфекции, саркоид, серповидноклеточная болезнь, отслоение сетчатки, височный артериит		
	Ишемия сетчатки, дегенерация желтого пятна, пигментная дегенерация сетчатки, артериосклеротическая ретинопатия, гипертензивная ретинопатия, закупорка артерии сетчатки, закупорка вены сетчатки, гипотензия, диабетическая ретинопатия, глаукома и отек желтого пятна		
Эмбриональные и фетальные расстройства	Асфиксия		
	Ишемия		
ЦНС	Синдром хронической усталости, острый и хронический гипоосмолярный и гиперосмолярный синдромы, связанная со СПИДом деменция, смертельная электротравма		
	Церебральная малярия		
	Энцефалит	Бешенство, герпес	
	Менингит		
	Субдуральная гематома		

	Никотиновая зависимость		
	наркомания и абстинентный синдром	Кокаин, героин, крэк, марихуана, ЛСД, РСР, употребление нескольких наркотиков, экстази, опиоиды, седативные снотворные, амфетамины, кофеин	
	Обсессивно-компульсивные расстройства		
	Стеноз позвоночного канала, поперечный миелит, синдром Гийена-Барре, травма, компрессия корешков нервов, тепловой удар		
Ухо, нос, горло	Шум в ушах, синдром Меньера, потеря слуха		
	Травматическое повреждение, баротравма		
Почки	Почечная недостаточность	Острая, хроническая	Васкулярная/ишемическая, интерстициальное заболевание, диабетическая болезнь почек, нефротические синдромы, инфекции, повреждение, индуцированное контрастными веществами, индуцированное химиотерапией, циклоспорином, СРВ-индуцированное или профилактическое
	Радиационного повреждение		
	Болезнь Шенлейн-Геноха,		
Поперечно-полосатая мышца	Аутоиммунные расстройства	Злокачественная миастения, дерматомиозит, полимиозит	
	Миопатии	Наследственная метаболическая, эндокринная и токсическая	
	Тепловой удар		
	Повреждение с раздавливанием ткани		
	Рабдомиолиз		

	Митохондриальное заболевание		
	Инфекция	Некротизирующий фасциит	
Половая дисфункция	Центральная и периферическая (например, эректильная дисфункция)	Вторичная импотенция в результате приема лекарств (диабет)	
Печень	Гепатит	Вирусный, бактериальный, паразитарный	
	Ишемическая болезнь		
	Цирроз, жировая печень		
	Инфильтративные/ метаболические заболевания		
Желудочно-кишечный тракт	Ишемическая болезнь кишечника		
	Воспалительное заболевание кишечника		
	Некротизирующий энтероколит		
Трансплантация органов	Лечение донора и реципиента		
Репродуктивный тракт	Бесплодие	Васкулярное, аутоиммунное, аномалии матки, болезни, связанные с имплантацией	
Эндокринная система	Гиперфункция и гипофункция желез		
Общие	Шок	Септический, гемодинамический	
	Паразитария	Малярия, трипаносомоз, лейшманиоз	

Как указано выше, перечисленные заболевания, расстройства или состояния только иллюстрируют диапазон полезных применений тканезащитных пептидов согласно настоящему изобретению. Соответственно, настоящее изобретение в общем относится к превентивному, терапевтическому или профилактическому лечению последствий механической травмы или заболеваний человека. Предполагается превентивное, или терапевтическое, или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний ЦНС и/или периферической нервной системы. Предлагается превентивное, или терапевтическое, или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний, которые имеют психиатрический компонент. Предлагается превентивное, или терапевтическое, или профилактическое лечение заболеваний, расстройств или состояний, включая без ограничения заболевания, расстройства или состояния, которые имеют офтальмический, сердечно-сосудистый, сердечно-легочный, респираторный, почечный, связанный с мочевой системой, репродуктивный, желудочно-кишечный, эндокринный или метаболический компонент.

В одном варианте такая фармацевтическая композиция, содержащая тканезащитный пептид, может быть введена системно для защиты или усиления клеток, тканей или органов - мишеней. Такое введение может быть парентеральным, посредством ингаляции или через слизистую оболочку, например орально, назально, ректально, внутривагинально, подъязычно, глазным путем, под слизистую оболочку или трансдермально. Предпочтительно введение является парентеральным, например посредством внутривенной или внутривагинальной инъекции, а также, включая без ограничения, внутриаартериальное, внутримышечное, интрадермальное и подкожное введение.

В случае других путей введения, таких как применение перфузата, инъекция в орган или другое локальное введение, будет приготовлена фармацевтическая композиция, которая создает уровни тканезащитного пептида, сходные с описанными выше уровнями. Предпочтителен уровень около 15-30 пМ.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут содержать терапевтически эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте термин "фармацевтически приемлемое" означает одобренное контролирующим органом федерального правительства или правительства штата или указанное в списке Фармакопеи США или других общеизвестных фармакопейных списках других стран для применения на животных, более конкретно - на человеке. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как растворы соли в воде и маслах, включая керосин, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Физиологический раствор соли является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Растворы солей и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов.

Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, обезжиренное сухое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция при необходимости также может содержать небольшие количества увлажняющих средств или эмульгаторов или средств для pH-буферов. Указанные композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов длительного высвобождения и т.п. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория с традиционными связывающими веществами и носителями, такими как триглицериды. Соединения согласно изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм.

Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные со свободными аминогруппами, например соли, полученные из хлористо-водородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные со свободными карбоксильными группами, такие как соли, полученные с использованием гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, так чтобы получить форму для соответствующего введения пациенту. Препарат должен подходить для способа введения.

Препараты для повышения всасывания через слизистую оболочку пептидов, такие как тканезащитные пептиды длительного действия, также предлагаются в настоящем изобретении. Фармацевтические композиции, предназначенные для орального введения, могут быть приготовлены в виде капсул или таблеток; в виде порошков или гранул; в виде растворов, сиропов или суспензий (в водных или неводных жидкостях); в виде съедобной пены или вбитой массы или в виде эмульсий. Таблетки или твердые желатиновые капсулы могут содержать лактозу, крахмал или его производные, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния, стеариновую кислоту или ее соли. Мягкие желатиновые капсулы могут содержать растительные масла, воск, жиры, полутвердые или жидкие полиолы и т.д. Растворы и сиропы могут содержать воду, полиолы и сахара.

Активное средство, предназначенное для орального введения, может быть покрыто или смешано с веществом, которое замедляет распад и/или всасывание активного средства в желудочно-кишечном тракте (например, можно использовать моностеарат глицерина или дистеарат глицерина). Таким образом, можно достичь длительного высвобождения активного средства в течение нескольких часов, и, при необходимости, активное средство может быть защищено от разрушения в желудке. Фармацевтические композиции для орального введения могут быть приготовлены так, чтобы облегчить высвобождение активного средства в конкретном месте желудочно-кишечного тракта благодаря специфичному pH или состоянию ферментов.

Фармацевтические композиции, предназначенные для трансдермального введения, могут быть приготовлены в виде дискретных пластырей, предназначенных для поддержания тесного контакта с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Фармацевтические композиции, предназначенные для местного введения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, примочек, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. Для местного введения на кожу, в ротовую полость, глаза или другие наружные ткани предпочтительно используют местную мазь или крем. В случае приготовления мази активный ингредиент можно использовать либо с парафиновой, либо с водорастворимой основой для мазей. Альтернативно активный ингредиент может быть приготовлен в виде крема с использованием основы типа "масло-в-воде" или основы типа "вода-в-масле". Фармацевтические композиции, предназначенные для местного введения в глаза, включают глазные капли. В таких композициях активный ингредиент может быть растворен или суспендирован в подходящем носителе, например в водном растворителе. Фармацевтические композиции, предназначенные для местного введения в ротовую полость, включают лепешки, пастилки и растворы для полоскания полости рта.



Фармацевтические композиции, предназначенные для назального и легочного введения, могут содержать твердые носители, такие как порошки (предпочтительно имеющие размер частиц в диапазоне от 20 до 500 мкм). Порошки можно вводить способом, при котором порошок нюхают, т.е. посредством быстрой ингаляции через нос из емкости с порошком, который держат близко к носу. Альтернативно, композиции, предназначенные для назального введения, могут содержать жидкие носители, например назальные спреи или назальные капли. Альтернативно, ингаляция соединений непосредственно в легкие может быть осуществлена путем глубокого вдыхания или введением через мундштук в ротовую часть глотки. Такие композиции могут содержать водные или масляные растворы активного ингредиента. Композиции для введения путем ингаляции могут поставляться в специально приспособленных устройствах, включая без ограничения аэрозоли под давлением, распылители или инсуффляторы, которые могут быть сконструированы так, чтобы давать предварительно определяемые дозы активного ингредиента. В предпочтительном варианте фармацевтические композиции согласно изобретению вводят непосредственно в носовую полость или в легкие через носовую полость или ротоглотку.

Фармацевтические композиции, предназначенные для ректального введения, могут быть приготовлены в виде суппозитория или клизм. Фармацевтические композиции, предназначенные для вагинального введения, могут быть приготовлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или препаратов в виде спрея.

Фармацевтические композиции, предназначенные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы или суспензии, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворенные вещества, которые делают композиции, по существу, изотоничными крови реципиента, для которого они предназначены. Другие компоненты, которые могут присутствовать в таких композициях, включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла. Композиции, предназначенные для парентерального введения, могут находиться в емкостях для однократной дозы или содержащими несколько доз, например в герметичных ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном замораживанием (лиофилизованном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например стерильного физиологического раствора для инъекций, непосредственно перед использованием. Приготовленные для немедленного приема инъекционные растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток. В одном варианте может быть предложен автоинжектор, содержащий инъекционный раствор тканезащитного пептида, для использования в крайнем случае в машинах скорой помощи, пунктах неотложной помощи и ситуациях в районе боевых действия и даже для самовведения в домашних условиях, особенно когда может возникать вероятность травматической ампутации, например при неосторожном обращении с газонокосилкой. Вероятность того, что клетки и ткани в отсеченной стопе или пальце будут служить после реплантации, может быть увеличена ведением тканезащитного пептида в несколько участков отсеченной части, как только это возможно, даже до прибытия медицинского персонала на место или доставки пострадавшего пациента с отрезанным пальцем в пункт неотложной помощи.

В предпочтительном варианте композицию готовят обычными способами приготовления фармацевтической композиции, предназначенной для внутривенного введения человеку. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоничном водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солибилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляют либо по отдельности, либо смешанными вместе в стандартной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизованного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула или пакетик, на котором указано количество активного средства. Когда композицию необходимо вводить путем инфузии, она может отпусаться вместе с бутылкой для инфузии, содержащей стерильную фармацевтически чистую воду или физиологический раствор. Когда композицию вводят путем инъекции, может предлагаться ампула со стерильным физиологическим раствором для того, чтобы можно было смешать ингредиенты перед введением.

Суппозитории в общем содержат активный ингредиент в диапазоне от 0,5 до 10 мас.%; оральные препараты предпочтительно содержат от 10 до 95% активного ингредиента.

Перфузионная композиция может быть предоставлена для применения в растворах для кювет с трансплантируемыми органами, для перфузии *in situ* или для введения в сосудистую систему донора органа перед выделением органа. Такие фармацевтические композиции могут содержать уровни тканезащитных пептидов или форму тканезащитных пептидов, не подходящую для острого или хронического, местного или системного введения человеку, но будут служить для указанных в данном описании функций при введении в труп, в кювету с органом, в качестве перфузата органа или перфузата *in situ*, после которых осуществляют удаление или уменьшение уровней содержащегося в композициях тканезащитного пептида перед выделением или возвращением обработанного органа или ткани в условия нормального кровообращения.

Изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему одну или несколько емкостей, наполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций согласно изобретению. Необязательно к такой емкости (емкостям) может прилагаться уведомление в форме, установленной правительственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, и в уведомлении отражено одобрение ведомством по производству, применению или продаже в отношении введения человеку.

В другом варианте, например, тканезащитный пептид может быть доставлен в системе контролируемого высвобождения. Например, пептид может быть введен с использованием внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574, каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). В другом варианте соединение может быть доставлено в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer, Science. 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, p. 353-365 (1989); WO 91/04014; патенте США № 4704355; Lopez-Berestein, там же, p. 317-327; в общем см. там же). В другом варианте можно использовать полимерные материалы (см. *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 and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953; см. также Levy et al., 1985, Science. 228:190; Doring et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105 (каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

В еще одном варианте система контролируемого высвобождения может быть помещена вблизи терапевтической мишени, т.е. клеток-мишеней, тканей-мишеней или органов-мишеней, при этом регуляции подвержена только часть системной дозы (см., например, Goodson, p. 115-138 in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, выше, 1984, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, Science. 249:1527-1533, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме).

В другом варианте тканезащитный пептид, приготовленный соответствующим образом, может быть введен посредством назального, орального, ректального, вагинального, глазного, трансдермального, парентерального или подъязычного введения.

В конкретном варианте может быть желательным введение тканезащитного пептида согласно изобретению местно в область, которую необходимо лечить; это может быть достигнуто, например и без ограничения, локальной инфузией во время хирургической операции, местным нанесением, например вместе с раневой повязкой после операции, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, при этом указанный имплантат состоит из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны из силастика или волокна. Не ограничивающим примером такого варианта может быть коронарный стент, покрытый тканезащитным пептидом согласно настоящему изобретению.

Выбор предпочтительной эффективной дозы легко осуществит специалист в данной области на основании рассмотрения нескольких факторов, которые известны специалисту в данной области. Такие факторы включают конкретную форму тканезащитного пептида и его фармакокинетические параметры, такие как биодоступность, метаболизм, время полужизни и т.д., которые будут установлены во время обычных процедур в ходе разработки, как правило осуществляемых при получении одобрения контролирующего ведомства для фармацевтического соединения.

Дополнительные факторы, учитываемые при выборе дозы, включают состояние или заболевание, подвергаемое лечению, или пользу, которую необходимо достичь для здорового человека, массу тела пациента, путь введения, является ли введение острым или хроническим, сопутствующее лечение медикаментами и другие факторы, которые, как хорошо известно, влияют на эффективность вводимых фармацевтических средств. Таким образом, точная доза определяется решением лечащего врача и в зависимости от обстоятельств для каждого пациента, например в зависимости от состояния и иммунного статуса отдельного пациента, и в соответствии со стандартными клиническими способами.

В другом аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать тканезащитный пептид, приготовленный в виде препарата по меньшей мере с одной малой молекулой, которая проявляет тканезащитную функцию. Подходящие малые молекулы включают без ограничения стероиды (например, лазароиды и глюкокортикоиды), антиоксиданты (например, коэнзим Q<sub>10</sub>, альфа-липоевую кислоту и NADH), антикатаболические ферменты (например, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, синтетические каталитические ловушки, а также миметики), производные индола (например, индоламины, карбазолы и карболины), агенты, нейтрализующие азотную кислоту, аденозин/агонисты аденозина, фитохимические вещества (флавоноиды), растительные экстракты (гинкго билоба и куркума), витамины (витамины А, Е и С), ингибиторы акцепторов электронов оксидаз (например, ингибиторы акцепторов электронов ксантиноксидазы), минералы (например, медь, цинк и магний), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (напри-

мер, аспирин, напроксен и ибупрофен) и их комбинации. Дополнительные средства, включая без ограничения противовоспалительные средства (например, кортикостероиды, преднизон и гидрокортизон), глюкокортикоиды, стероиды, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, аспирин, ибупрофен, диклофенак и ингибиторы COX-2), бета-агонисты, антихолинергические средства и метилксантины, иммуномодулирующие средства (например, малые органические молекулы, модуляторы T-клеточных рецепторов, модуляторы рецепторов цитокинов, средства, истощающие T-клетки, антагонисты цитокинов, антагонисты монокинов, ингибиторы лимфоцитов или противоопухолевые средства), инъекции золота, сульфасалазин, пеницилламин, антиангиогенные средства (например, ангиостатин), антагонисты TNF- $\alpha$  (например, антитела против TNF- $\alpha$ ) и эндостатин, дапсон, псоралены (например, метоксален и триоксален), противомаларийные средства (например, гидроксихлорохин), противовирусные средства и антибиотики (например, эритромицин и пенициллин), могут быть использованы вместе с фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте изобретения предлагается перфузат или перфузионный раствор для перфузии и хранения органов для трансплантации, при этом перфузионный раствор содержит количество тканезащитного пептида, эффективное для защиты чувствительных клеток и ассоциированных клеток, тканей или органов. Трансплантация включает без ограничения аллотрансплантацию, при которой орган (включая клетку, ткани или другую часть тела) берут из одного организма донора и трансплантируют в другой организм реципиента, при этом и донор, и реципиент относятся к одному и тому же виду; аутотрансплантацию, при которой орган берут из одной части тела и помещают в другую, включая хирургические процедуры на столе, при которых орган может быть извлечен и в состоянии *ex vivo* подвергнут резекции, коррекции или другим манипуляциям, таким как удаление опухоли, и затем возвращен в исходное положение или использован для ксенотрансплантации, при этом трансплантацию тканей или органов осуществляют между представителями разных видов. В одном варианте перфузионный раствор представляет собой раствор из университета Висконсин (UW) (патент США № 4798824, включенный в данное описание в виде ссылки в полном объеме), который содержит примерно от 1 до 25 ед./мл (10 нг = 1 ед.) тканезащитного пептида, 5% гидроксипропилкрахмала (имеющего молекулярную массу примерно от 200000 до 300000 и, по существу, не содержащего этиленгликоля, этиленхлоргидрина, хлорида натрия и ацетона); 25 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3 мМ глутатион; 5 мМ аденозин; 10 мМ глюкозу; 10 мМ HEPES-буфер; 5 мМ глюконат магния; 1,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 105 мМ глюконат натрия; 200000 единиц пенициллина; 40 единиц инсулина; 16 мг дексаметазона; 12 мг фенолового красного; и имеет pH 7,4-7,5 и осмолярность примерно 320 мОсм/л. Раствор используют для поддержания трупных почек и поджелудочной железы перед трансплантацией. При использовании раствора сохранение можно продлить свыше 30-часового предела, рекомендуемого для сохранения трупной почки. Указанный конкретный перфузат является только иллюстративным для ряда таких растворов, которые могут быть адаптированы для применения согласно изобретению посредством включения эффективного количества тканезащитного пептида. В следующем варианте перфузионный раствор содержит примерно от 1 до 500 нг/мл тканезащитного пептида или примерно от 40 до 320 нг/мл тканезащитного пептида. Как указано выше, в данном аспекте изобретения можно использовать любую форму тканезащитного пептида.

Хотя предпочтительным реципиентом тканезащитного пептида для описанных целей является человек, предлагаемые способы в равной мере применимы по отношению к другим млекопитающим, особенно домашним животным, сельскохозяйственным животным, комнатным животным и животным в зоопарках. Однако изобретение не ограничено таким образом и может быть полезным для любого млекопитающего.

В следующих аспектах изобретения *ex vivo* можно использовать любой тканезащитный пептид, такой как, без ограничения, описанные выше пептиды.

В другом аспекте изобретения предлагаются способы и композиции для усиления жизнеспособности клеток, тканей или органов, которые не отделены от сосудистой системы барьером из эндотелиальных клеток, при непосредственном воздействии на клетки, ткани или органы фармацевтической композицией, содержащей тканезащитный пептид, или введением или контактированием фармацевтической композиции, содержащей тканезащитный пептид, с сосудистой системой ткани или органа. Повышенная активность чувствительных клеток в обработанной ткани или органе ответственна за оказываемые позитивные эффекты.

Подобно другим тканезащитным соединениям, основанным на эритропоэтине, тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению вероятно могут быть транспортированы с поверхности просвета к поверхности базальной мембраны эндотелиальных клеток капилляров органов с плотными контактами эндотелиальных клеток, включая, например, головной мозг, сетчатку и семенники. Таким образом, отвечающие клетки вдоль барьера могут представлять собой чувствительные мишени для полезных эффектов тканезащитных пептидов, и другие типы клеток или ткани или органы, которые содержат и зависят в целом или частично от отвечающих клеток, могут быть мишенями в случае применения способов согласно изобретению. Не имея намерения быть связанными с какой-либо конкретной теорией, авторы полагают, что после транцитоза тканезащитного пептида он может взаимодействовать с тканезащитным рецептором на отвечающей клетке, например нейроне, клетке глаза (например, сетчатки), жировой клет-

ке соединительной ткани, волос, зубов, слизистой оболочки, поджелудочной железы, эндокринной, уха, эпителиальной, кожи, мышц, сердца, легкого, печени, почек, тонкого кишечника, надпочечника (например, коры надпочечника, мозгового вещества надпочечника), капилляров, эндотелия, семенников, яичника или эндометрия, и связывание рецептора может инициировать каскад сигнальной трансдукции, приводящий к активации программы экспрессии генов в отвечающей клетке или ткани, что приводит к защите клетки, или ткани, или органа от повреждения, такого как повреждение токсинами, химиотерапевтическими средствами, лучевой терапией, гипоксией и т.д. В другом варианте тканезащитный пептид может быть поперечно сшит с соединением, которое может пересекать барьер, таким как карбамиллированный эритропоэтин, чтобы его транспортировать через барьер согласно инструкциям заявки РСТ № РСТ/US01/49479, заявок на выдачу патента США № 10/188905 и 10/185841, включенных в данное описание в виде ссылки. Соответственно способы защиты ткани, содержащей отвечающие клетки, от повреждения или гипоксического стресса и усиления функции такой ткани подробно описаны ниже.

При практическом осуществлении одного варианта изобретения пациента-млекопитающего подвергают системной химиотерапии для лечения злокачественной опухоли, включая лучевую терапию, которая обычно оказывает неблагоприятное действие, например повреждает нервы, легкие, сердце, яичники или семенники. Введение фармацевтической композиции, содержащей тканезащитный пептид, которая описана выше, осуществляют перед или во время химиотерапии и/или лучевой терапии, чтобы защитить различные ткани и органы от повреждения химиотерапевтическим средством, например чтобы защитить семенники. Обработка может продолжаться до тех пор, пока циркулирующие уровни химиотерапевтического средства не упадут ниже уровня потенциально опасного для организма млекопитающего.

При практическом осуществлении другого варианта изобретения предполагают забор различных органов от пострадавшего в автомобильной катастрофе для трансплантации нескольким реципиентам, при этом некоторые органы необходимо транспортировать на большое расстояние и в течение длительного периода времени. Перед забором органов донора инфузируют фармацевтической композицией, содержащей тканезащитные пептиды, охарактеризованные в данном описании. Собранные для отправки органы перфузируют перфузатом, содержащим тканезащитные пептиды, охарактеризованные в данном описании, и хранят в кювете, содержащей тканезащитные пептиды. Некоторые органы перфузируют непрерывно с помощью устройства для пульсирующей перфузии, используя перфузат, содержащий тканезащитные пептиды согласно настоящему изобретению. Происходит минимальное ухудшение функционирования органов во время транспорта и при имплантации и реперфузии органов *in situ*.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения человек, участвующий в опасной деятельности, может принимать дозу фармацевтической композиции, содержащей тканезащитный пептид, достаточную либо для предотвращения повреждения (т.е. замедления проявления, ингибирования или остановки), либо защиты от повреждения, либо уменьшения повреждения, возникающего в результате повреждения отвечающей клетки, ткани или органа. В частности, такой способ лечения может быть применим для людей разных профессий, при которых возможна травма, без ограничения, таких как профессиональные спортсмены (ныряльщики, гонщики, футболисты и т.д.), военные (солдаты, парашютисты-десантники), персонал служб экстренной помощи (полицейские, пожарные, работники неотложной медицинской помощи и работники служб по чрезвычайным ситуациям), каскадеры и рабочие-строители. Кроме того, профилактическое применение тканезащитных пептидов предполагается в таких видах отдыха, как, включая без ограничения, скалолазание, спускание по канату, затыжные прыжки с парашютом, гонки, езда на велосипеде, футбол, регби, бейсбол и дайвинг, при которых существует риск травмы.

В другом варианте осуществления изобретения хирургическая операция по восстановлению клапана сердца требует временной остановки сердца и окклюзии артерий. Перед операцией пациента инфузируют тканезащитным пептидом. Такая обработка предотвращает гипоксическое ишемическое повреждение клеток, особенно после реперфузии. Кроме того, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно использовать профилактически, чтобы подготовить пациента к операции, пытаясь при этом ограничить травму, связанную с хирургической операцией, или помочь пациенту восстановиться после хирургической операции. Хотя данный способ лечения с использованием фармацевтических композиций, содержащих тканезащитные пептиды, имеет профилактическое применение в случае хирургических операций, он может быть особенно применим при операциях, которые вызывают временные ишемические явления, включая без ограничения, процедуры шунтирования (коронарного шунтирования), процедуры ангиопластики, ампутации и трансплантации, а также операции, осуществляемые непосредственно на чувствительных клетках, тканях или органах, таких как операции на головном и спинном мозге, и операции на открытом сердце. Такие операции могут проходить с применением искусственного кровообращения (сердечно-легочного шунта).

В другом варианте осуществления изобретения тканезащитный пептид согласно изобретению можно использовать при любой хирургической операции, такой как операция с сердечно-легочным шунтированием. В одном варианте введение фармацевтической композиции, содержащей тканезащитные пептиды, которые описаны выше, осуществляют до, во время и/или после процедуры шунтирования, чтобы защитить головной мозг, сердце и другие органы.

В упомянутых выше примерах, в которых тканезащитный пептид согласно изобретению используют для применений *ex vivo* или для применений *in vivo*, чтобы обработать чувствительные клетки, такие как клетки нервных тканей, ткани сетчатки, сердца, легкого, печени, почки, тонкого кишечника, коры надпочечников, мозгового вещества надпочечников, эндотелиальных клеток капилляров, клетки или ткани семенников, яичника или эндометрия, изобретение относится к фармацевтической композиции в стандартной лекарственной форме, предназначенной для защиты или усиления чувствительных клеток, тканей или органов, расположенных дистально по отношению к сосудистой системе, которая содержит количество тканезащитного пептида в диапазоне примерно от 0,01 пг до 7,5 мг, от 0,5 пг до 6,5 мг, от 1 пг до 5 мг, от 500 пг до 5 мг, от 1 нг до 5 мг, от 500 нг до 5 мг, от 1 мкг до 5 мг, от 500 мкг до 5 мг или от 1 до 5 мг, и фармацевтически приемлемый носитель. В предпочтительном варианте количество тканезащитного пептида составляет примерно от 0,5 пг до 1 мг. В предпочтительном варианте препарат содержит тканезащитные пептиды, которые не являются эритропоэтическими.

В следующем аспекте изобретения введение тканезащитных пептидов можно применять для восстановления когнитивной функции у млекопитающих, которые были подвергнуты травме головного мозга. Введение тканезащитных пептидов либо с 5-дневной, либо 30-дневной задержкой должно восстанавливать функцию по сравнению с млекопитающими, обработанными плацебо, свидетельствуя о способности тканезащитного пептида регенерировать или восстанавливать активность головного мозга. Таким образом, изобретение также относится к применению тканезащитных пептидов для приготовления фармацевтической композиции для лечения травмы головного мозга и других когнитивных дисфункций, включая лечение значительно позже повреждения (например, через 3 дня, 5 дней, 1 неделю, 1 месяц или дольше). Изобретение также относится к способу лечения когнитивной дисфункции после повреждения посредством введения эффективного количества тканезащитных пептидов. В данном аспекте изобретения можно использовать любой тканезащитный пептид, охарактеризованный в данном описании.

Кроме того, указанный восстановительный аспект изобретения относится к применению любых тканезащитных пептидов, охарактеризованных в данном описании, получения фармацевтической композиции для восстановления дисфункции клеток, тканей или органов, при котором лечение начинают после и значительно позже начального поражения, ответственного за дисфункцию. Кроме того, лечение с использованием тканезащитных пептидов согласно изобретению может продолжаться на протяжении периода заболевания или состояния в острой фазе, а также в хронической фазе.

Тканезащитный пептид согласно изобретению можно вводить системно в дозе примерно от 1 нг до 100 мкг/кг массы тела, предпочтительно примерно 5-50 мкг/кг массы тела, наиболее предпочтительно примерно 10-30 мкг/кг массы тела на одно введение. Указанная эффективная доза должна быть достаточной для достижения уровней тканезащитных пептидов в сыворотке примерно более чем 80, 120 или 160 нг/мл сыворотки после введения. Такие уровни в сыворотке могут быть достигнуты примерно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ч после введения. Указанные дозы при необходимости можно повторять. Например, введение можно повторять ежедневно, пока это клинически необходимо, или через соответствующий интервал, например каждые 1-12 недель, предпочтительно каждые 1-3 недели. В одном варианте, эффективное количество тканезащитного пептида и фармацевтически приемлемого носителя может быть упаковано во флакон для однократной дозы или другую емкость. В другом варианте применяют тканезащитные пептиды, которые способны проявлять активности, охарактеризованные в данном описании, но не вызывающие повышения концентрации гемоглобина или гематокрита. Такие тканезащитные пептиды предпочтительны в случаях, когда способы согласно настоящему изобретению предполагается применять хронически.

#### 5.4. Трансцитоз.

Молекула носителя и тканезащитный пептид.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу облегчения транспорта тканезащитного пептида через барьер эндотелиальных клеток у млекопитающего посредством введения композиции, которая содержит тканезащитный пептид вместе с пептидом-носителем, при этом такой пептид способен преодолевать барьер эндотелиальных клеток, такой как эритропоэтин, как описано выше. Плотный контакт между эндотелиальными клетками в некоторых органах организма создает барьер для проникновения некоторых молекул. В случае лечения различных состояний в органе с таким барьером могут быть желательны средства для облегчения прохождения тканезащитного пептида.

Тканезащитный пептид в качестве молекулы носителя.

Тканезащитные пептиды согласно изобретению могут быть применимы в качестве носителей для доставки других молекул через гематоэнцефалический и другие сходные барьеры, через которые они могут проходить. Готовят композицию, содержащую молекулу, которую нужно перенести через барьер, с тканезащитным пептидом, и периферическое введение композиции приводит к трансцитозу композиции через барьер. Ассоциация между молекулой, которую нужно транспортировать через барьер, и тканезащитным пептидом может быть в виде лабильной ковалентной связи, и в данном случае молекула освобождается от связи с тканезащитным пептидом после пересечения барьера. Если требуемая фармакологическая активность молекулы сохраняется или не подвергается влиянию связывания с тканезащитными пептидами, то такой комплекс может быть введен.

Специалисту в данной области будут известны различные способы связывания молекул с тканезащитными пептидами согласно изобретению и другими средствами, описанными выше, ковалентно, нековалентно и иным образом. Кроме того, оценку эффективности композиции можно легко осуществить в экспериментальной системе. Связывание молекул с тканезащитными пептидами можно осуществить любым способом, включая лабильное ковалентное связывание, поперечные шивки и т.д. Можно использовать взаимодействия биотин/авидин; например, может быть образован комплекс биотинилированных тканезащитных пептидов согласно изобретению с лабильным конъюгатом авидина и молекулой, которую требуется транспортировать. Как указано выше, гибридная молекула может быть получена способами рекомбинации или синтеза, например слитый или химерный полипептид, который содержит и домен молекулы с требуемой фармакологической активностью, и домен, ответственный за модулирование активности тканезащитного рецептора пептидов. В молекулу могут быть включены сайты расщепления протеазами.

Молекула может быть конъюгирована с тканезащитным пептидом согласно изобретению посредством полифункциональной молекулы, т.е. полифункционального поперечно сшивающего агента. В используемом в данном описании смысле термин "полифункциональная молекула" охватывает молекулы, имеющие одну функциональную группу, которая может взаимодействовать более чем один раз подряд, такие как формальдегид, а также молекулы более чем с одной химически активной группой. В используемом в данном описании смысле термин "химически активная группа" относится к функциональной группе поперечно сшивающего агента, которая взаимодействует с функциональной группой на молекуле (например, пептиде, белке, углеводе, нуклеиновой кислоте, в частности гормоне, антибиотике или противоопухолевом средстве, которые необходимо доставить через эндотелиальный клеточный барьер), образуя при этом ковалентную связь между поперечно сшивающим агентом и данной молекулой. Термин "функциональная группа" сохраняет свое стандартное значение в органической химии. Полифункциональными молекулами, которые можно использовать, предпочтительно являются биосовместимые линкеры, т.е. они являются некарциногенными, нетоксичными и, по существу, неиммуногенными *in vivo*. Полифункциональные поперечно сшивающие агенты, такие как агенты, известные в данной области и охарактеризованные в данном описании, легко можно тестировать в моделях на животных, чтобы определить их биосовместимость. Полифункциональная молекула предпочтительно является бифункциональной. В используемом в данном описании смысле термин "бифункциональная молекула" относится к молекуле с двумя химически активными группами. Бифункциональная молекула может быть гетеробифункциональной или гомобифункциональной.

Гетеробифункциональный поперечно сшивающий агент обеспечивает направленное сопряжение. Особенно предпочтительные полифункциональные молекулы в достаточной степени растворимы в воде для того, чтобы реакции поперечного связывания происходили в водных растворах, таких как водные растворы, забуференные при pH 6-8, и для того, чтобы полученный в результате конъюгат сохранял растворимость в воде для более эффективного биораспределения. Обычно полифункциональная молекула ковалентно связывается с аминокислотной или сульфгидрильной функциональной группой. Однако полифункциональные молекулы, взаимодействующие с другими функциональными группами, такими как группы карбоновых кислот или гидроксильные группы, также предполагаются в настоящем изобретении.

Гомобифункциональные молекулы имеют по меньшей мере две химически активные функциональные группы, которые являются одинаковыми. Химически активные функциональные группы гомобифункциональной молекулы включают, например, альдегидные группы и активные группы сложных эфиров. Гомобифункциональные молекулы, имеющие альдегидные группы, включают, например, глутаровый альдегид и пробковый альдегид. Применение глутарового альдегида в качестве поперечно сшивающего агента описано в Poznansky et al., Science. 223, 1304-1306 (1984). Гомобифункциональные молекулы, имеющие по меньшей мере две единицы активного сложного эфира, включают сложные эфиры дикарбоновых кислот и N-гидроксисукцинимидов. Некоторые примеры таких N-сукцинимидных сложных эфиров включают дисукцинимидилсуберат и дитио-бис-(сукцинимидилпропионат) и их растворимые соли бис-сульфоновой кислоты и бис-сульфонатные соли, такие как соли натрия и калия. Указанные гомобифункциональные реагенты доступны из Pierce, Rockford, Illinois.

Гетеробифункциональные молекулы имеют по меньшей мере две разные химически активные группы. Химически активные группы взаимодействуют с разными функциональными группами, например, присутствующими на пептиде и молекуле. Две указанные разные функциональные группы, которые взаимодействуют с химически активной группой гетеробифункционального поперечно сшивающего агента, обычно представляют собой аминокислотную группу, например эпсилон-аминокислотную группу лизина; сульфгидрильную группу, например тиольную группу цистеина; карбоновую кислоту, например карбоксилат на аспарагиновой кислоте; или гидроксильную группу, например гидроксильную группу серина.

Конечно, некоторые из многообразных тканезащитных пептидов согласно изобретению могут не иметь подходящих химически активных групп, доступных для использования с некоторыми поперечно сшивающими агентами; однако специалист в данной области достаточно осведомлен относительно того, как выбрать поперечно сшивающие агенты на основании имеющихся групп для поперечного связывания в тканезащитных пептидах согласно изобретению.

Когда химически активная группа гетеробифункциональной молекулы образует ковалентную связь с аминогруппой, ковалентная связь обычно будет представлять собой амидную или имидную связь. Химически активная группа, которая образует ковалентную связь с аминогруппой, может, например, представлять собой активированную карбоксилатную группу, галогенкарбонильную группу или сложноэфирную группу. Предпочтительной галогенкарбонильной группой является группа хлоркарбонила. Сложноэфирные группы предпочтительно представляют собой химически активные сложноэфирные группы, такие как, например, N-гидроксисукцинимидная сложноэфирная группа.

Другой функциональной группой обычно является либо тиольная группа, группа, которая может быть превращена в тиольную группу, или группа, которая образует ковалентную связь с тиольной группой. Ковалентная связь, как правило, будет представлять собой тиоэфирную связь или дисульфид. Химически активная группа, которая образует ковалентную связь с тиольной группой, может, например, представлять собой двойную связь, которая взаимодействует с тиольными группами или активированным дисульфидом. Химически активной группой, содержащей двойную связь и способной взаимодействовать с тиольной группой, является малеимидогруппа, хотя также возможны другие группы, такие как акрилонитрил. Химически активной дисульфидной группой, например, может быть 2-пиридилтиогруппа или группа 5,5'-дигио-бис-(2-нитробензойной кислоты). Некоторые примеры гетеробифункциональных реагентов, содержащих химически активные дисульфидные связи, включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (Carlsson, et al., 1978, *Biochem J.*, 173:723-737), S-4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метилбензилтиосульфат натрия и 4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-(2-пиридилдитио)толуол. Предпочтительным является N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат. Некоторые примеры гетеробифункциональных реагентов, содержащих химически активные группы, имеющие двойную связь, которые взаимодействуют с тиольной группой, включают сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат и сукцинимидил-м-малеимидобензоат.

Другие гетеробифункциональные молекулы включают сукцинимидил-3-(малеимидо)пропионат, сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират, сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометилциклогексан)-1-карбоксилат, малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный сложный эфир. Предпочтительна натрий-сульфонатная соль сукцинимидил-м-малеимидобензоата. Многие из указанных выше гетеробифункциональных реагентов и их сульфонатных солей доступны от Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA.

Необходимость того, должны ли описанные выше конъюгаты быть обратимыми или лабильными, легко может определить специалист в данной области. Конъюгат может быть проверен *in vitro* в отношении требуемой фармакологической активности. Если конъюгат сохраняет свойства (свойства конъюгированной молекулы и свойства тканезащитного пептида), то может быть проверена его пригодность *in vivo*. Если конъюгированная молекула требует отделения от тканезащитного пептида для своей активности, то предпочтительной будет лабильная связь или обратимое связывание с длительно действующим эритропоезином или длительно действующим тканезащитным цитокином. Характеристики лабильности также можно тестировать, используя стандартные способы *in vitro* перед тестированием *in vivo*.

Дополнительную информацию в отношении того, как получить и как применять указанные, а также другие полифункциональные реагенты, можно найти в следующих публикациях или других публикациях, имеющихся в данной области:

- Carlsson, J. et al., 1978, *Biochem. J.* 173:723-737;
- Cumber, J.A. et al., 1985, *Methods in Enzymology.* 112:207-224;
- Jue, R. et al., 1978, *Biochem.* 17:5399-5405;
- Sun, T.T. et al., 1974, *Biochem.* 13:2334-2340;
- Blattler, W.A. et al., 1985, *Biochem.* 24:1517-152;
- Liu, F.T. et al., 1979, *Biochem.* 18:690-697;
- Youle, R.J. and Neville, D.M. Jr., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5483-5486;
- Lerner, R.A. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3403-3407;
- Jung, S.M. and Moroi, M., 1983, *Biochem. Biophys. Acta.* 761:162;
- Caulfield, M.P. et al., 1984, *Biochem.* 81:7772-7776;
- Staros, J.V., 1982, *Biochem.* 21:3950-3955;
- Yoshitake, S. et al., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399;
- Yoshitake, S. et al., 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424;
- Pilch, P.F. and Czech, M.P., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:3375-3381;
- Novick, D. et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487;
- Lomant, A.J. and Fairbanks, G., 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261;
- Hamada, H. and Tsuruo, T., 1987, *Anal. Biochem.* 160:483-488 или
- Hashida, S. et al., 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63,

каждая публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Кроме того, способы перекрестного сшивания приведены в обзоре Means and Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1:2-12, который включен в данное описание в виде ссылки в полном объеме.

Барьеры, прохождение которых осуществляют описанными выше способами и с применением композиций согласно настоящему изобретению, включают без ограничения гематоэнцефалический барьер, гематоофтальмический барьер, гематотестикулярный барьер, гематоовариальный барьер, барьер кровеносных сосудов, барьер кровь-спинной мозг и гематоплацентарный барьер.

Молекулы-кандидаты для транспорта через барьер эндотелиальных клеток включают, например, гормоны, такие как гормон роста, нейротрофические факторы, антибиотики, противовирусные средства или противогрибковые средства, такие как средства, в норме не входящие в головной мозг и другие органы, имеющие барьеры, пептидные радиофармацевтические средства, антисмысловые лекарственные средства, антибиотики и противовирусные средства против биологически активных агентов, фармацевтические средства и противоопухолевые средства. Не ограничивающие примеры таких молекул включают гормоны, такие как гормон роста, фактор роста нервов (NGF), полученный из головного мозга нейротрофический фактор (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), трансформирующий фактор роста  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ), трансформирующий фактор роста  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ), интерлейкин 1, интерлейкин 2, интерлейкин 3 и интерлейкин 6, AZT, антитела против фактора некроза опухолей, и иммунодепрессанты, такие как циклоспорин. Кроме того, с тканезащитными пептидами согласно настоящему изобретению могут быть связаны красители или маркеры, чтобы визуализировать клетки, ткани или органы в случае головного мозга и других имеющих барьеры органах для диагностических целей. В качестве примера маркер, используемый для визуализации бляшки в головном мозге, может быть связан с тканезащитным пептидом, чтобы определить прогрессирование болезни Альцгеймера у пациента.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей молекулу, которую необходимо транспортировать посредством трансцитоза через барьер, образованный плотным контактом эндотелиальных клеток, и тканезащитный пептид, который описан выше. Изобретение, кроме того, относится к применению конъюгата молекулы и тканезащитного пептида цитокина, который описан выше в связи с получением фармацевтической композиции для доставки молекулы через барьер, который описан выше.

Различные модели на животных и тесты *in vitro* нейрозащиты и трансцитоза предлагаются в заявке PCT/US01/49479 (включенной в данное описание в виде ссылки в полном объеме) для того, чтобы продемонстрировать эффективность тканезащитных пептидов согласно изобретению. Для трансцитоза модельные белки, конъюгированные с длительно действующими эритропоэтинами согласно изобретению, оценивают в отношении транспорта в головной мозг после парентерального введения. Указанные тесты в моделях *in vitro* и в моделях на животных являются прогностическими в отношении эффективности предлагаемых в изобретении соединений у других видов млекопитающих, включая человека.

Настоящее изобретение можно лучше понять при обращении к следующим не ограничивающим примерам, которые предложены для иллюстрации изобретения. Следующие примеры приведены для того, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные варианты осуществления изобретения. Однако их никоим образом не следует считать ограничивающими широкий объем изобретения.

## 6. Примеры

Пример 1. Способ синтеза пептидов.

А. Синтез пептида А (SEQ ID NO:32), соответствующего аминокислотной последовательности EPO 38-57 и пептида В (SEQ ID NO:34), соответствующего аминокислотной последовательности EPO 58-82.

Пептид А (SEQ ID NO:32) и пептид В (SEQ ID NO:34), фрагменты EPO (см. табл. 1) синтезировали, используя ступенчатый твердофазный синтез пептидов с применением Вос-химии и "нейтрализации *in situ*", который описан в Band, D., Chopra, N. and Kent, S., "Total Synthesis of Crambin", J. AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 1377-1383 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Коротко, два фрагмента, соответствующих аминокислотной последовательности EPO 38-57 (пептид С, NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEQ ID NO:29) и аминокислотной последовательности EPO 58-82 (пептид D, QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEQ ID NO:30) синтезировали на -OCH<sub>2</sub>-Pam-смолах (пептиды, содержащие свободный  $\alpha$  карбоксил) или на HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Leu-OCH<sub>2</sub>-Pam-смоле (пептиды, содержащие  $\alpha$  тиоэфир). Во время синтеза боковые цепи различных аминокислот защищали следующим образом: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(4-CH<sub>3</sub>Bzl) или Cys(ACM), Glu(OcHex), Lys(2-Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Br-Z). После сборки пептидной цепи защиту пептидов удаляли и одновременно отщепляли от смолы-носителя обработкой безводным HF, содержащим *p*-крезол (90:10, об./об.) в течение 1 ч при 0°C. После выпаривания HF при пониженном давлении неочищенные продукты осаждали и растирали в охлажденном диэтиловом эфире и пептиды растворяли в 50% водном ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ, и очищали, используя систему препаративной ВЭЖХ. Состав пептидов подтверждали, используя ЖХ-МС.



Пример 2. Подтверждение опосредованной пептидами защиты тканей.

Тканезащитные пептиды тестировали в отношении любой тканезащитной активности, используя анализ седалищного нерва. Крыс Sprague-Dawley (250-300 г) (шесть на группу, включая контроль) анестезировали, используя изофлуран (Baxter NPC 10019-773-60) и настольную лабораторную систему анестезии (флоуметр устанавливали на 2-3 л/мин, 55 фунтов на кв.дюйм), по меньшей мере в течение 3 мин. Затем крысу помещали на гомеотермическое одеяло, чтобы обеспечить поддержание внутренней температуры крысы 35-37°C во время операции. Внутреннюю температуру контролировали посредством ректального зонда. Правый седалищный нерв анестезированной крысы обнажали на середине бедра посредством рассечения четырехглавой мышцы; с помощью скальпеля с лезвием 15 делали разрез размером 2 см через кожу параллельно и над четырехглавой мышцей и четырехглавую мышцу разрезали, чтобы открыть седалищный нерв, используя пару анатомических ножниц. Затем седалищный нерв освобождали от окружающих пленок. Плетеную шелковую нить 2-0 (Ethicon, 685-G) пропускали под нервом и концы нити пропускали через направитель, который поддерживали перпендикулярно к нерву. Затем конец нити привязывали к неэластичному шнуру, который затем накидывали на систему шкивов (шкив NYL, несущий MTD 1/4" В (PO номер 04174-01) со стабилизатором), и груз массой 100, прикрепленный к неэластичному шнуру медленно отпускали. Груз висел в течение 1 мин, затем шелковую нить отрезали, чтобы освободить от груза.

Затем дозу 289 пмоль/кг карбамилированного эритропоэтина, дозу 289 пмоль/кг одного пептида из серии А-Ј (см. табл. 1) или PBS инъецировали в хвостовую вену, используя инсулиновый шприц объемом 1/2 см<sup>3</sup>. 20-мерный фрагмент (соответствующий аминокислотам 102-121) полученного из пигментного эпителия фактора роста (PEDF), который не следует из приведенного выше описания, использовали в качестве контроля.

Мышцу и хирургический разрез затем закрывали и крысам подкожно инъецировали 5 мл лактированного раствора Рингера. Внутреннюю температуру крысы поддерживали при 35-37°C, используя одеяло с подогревом в период восстановления.

В течение следующих 4 дней определяли разведение между пальцами задних конечностей крыс, помещая крысу в акриловую трубку диаметром 30 см на сканирующую поверхность сканера пальцев. После выжидания в течение 5 мин, чтобы прошла акклиматизация сканировали заднюю лапу крысы, на которой четко видны все 5 пальцев. Брали три приемлемых изображения для каждой крысы. На основе полученных при сканировании изображений измеряли расхождение пальцев (расстояние между подушечкой первого пальца и подушечкой пятого пальца) и расхождение между промежуточными пальцами (расстояние между подушечкой второго пальца и подушечкой четвертого пальца). Затем рассчитывали статистический индекс седалищного нерва согласно S. Erbayraktar et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 6741-6746 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме) и проводили статистический анализ.

Все пептиды, за исключением В (SEQ ID NO:34), Н (SEQ ID NO:47) и производного PEDF, в равной мере проявляли защитные свойства, давая статистический индекс седалищного нерва ("SSI") примерно -0,57 по сравнению с SSI примерно от -67 до -68 для PBS/фрагмента PEDF (фиг. 2). На фиг. 2 также показано, что эффективность позитивных пептидов, по меньшей мере, эквивалентна, если не повышена, по сравнению с эффективностью карбамилированного эритропоэтина.

В табл. 1 также представлено примерное расстояние между карбонильными атомами углерода для тестируемых пептидов. Расстояния рассчитывали, используя трехмерные координаты, предложенные в публикации Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5:861-866, включенной в данное описание в виде ссылки. Каждый из пептидов, которые тестировали как позитивные в отношении тканезащитной активности, имел расстояние/разделение одного карбонильного атома углерода от другого карбонильного атома углерода примерно от 3 до 5 Å.

Тканезащитная эффективность типичных пептидов, оцениваемая с использованием биоанализа *in vivo* (модель повреждения седалищного нерва)

Класс пептидов	Пептид	Последовательность ЕРО	Структура	Примерное расстояние между карбонильными атомами углерода (ангстремы)	Доза [нмоль/кг массы тела]	Анализ седалищного нерва
А) Фрагмент ЕРО	A	1-23	APPRLICDS <u>R</u> VLERYLLEAKEAE (SEQ ID NO:32) APPRLICDSRVLERYLLE <u>A</u> KEAE (SEQ ID NO:32)	4,6 4,4	29, 290, 1450	+
	B	24-37	NITGCA <u>E</u> HCSLNE (SEQ ID NO:34)	2,8	290	-
	C	38-57	NITVPD <u>T</u> KVNFYAWKRMEVG (SEQ ID NO:29)	4,6	290	+
	D	58-82	QQAVEVWQGLALLS <u>E</u> AVLRGQALLV (SEQ ID NO:30)	4,8	29, 290, 1450	+
	E	28-47	GCAEHCSLNEITVPD <u>T</u> KVN (SEQ ID NO:31)	4,4	290	+
	F	14-29	RYLLEA <u>K</u> EAEENITTCG (SEQ ID NO:33)	3,6	290	+
В) Наружная поверхность спирали	G	58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84, 85	QEQLER <u>A</u> LNSS (SEQ ID NO:40)	3,6	290	+
	H	71, 72, 75, 76, 77	SE <u>L</u> RGQ (SEQ ID NO:47)	7,2	290	-
С) Химера	I	Пептид G + $\beta$ -складчатый слой (33-39)	CSLNENIQEQLER <u>A</u> LNSS (SEQ ID NO:43)		290	+
	J	Пептид G + спираль панкреатического полипептида	QEQLER <u>A</u> LNSSLRRYINMLTRTR (SEQ ID NO:41)		290	+
D) Мотив цитокина типа I	K	Спираль A GM-CSF (13-26)	WEHVNAIQE <u>A</u> RBLL (SEQ ID NO:35) WEHVNAIQE <u>A</u> RRLL (SEQ ID NO:35) WEHVNAIQE <u>A</u> RRLL (SEQ ID NO:35)	3,6 4,6 4,6	290	+
	L	Спираль A CNTF (26-41)	K <u>R</u> SDLTALTESYVKH (SEQ ID NO:37)	4,7	290	+

Пример 3. Тканезащитные пептиды не являются эритропоэтическими.

А. Оценка. *in vitro*.

UT-7еро, зависимую от эритропоэтина линию лейкозных клеток человека, использовали для определения эритропоэтической активности пептидов. Клетки UT-7еро клетки (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), каталожный номер ACC 363) выращивали в полной среде RPMI-1640 с 10% FBS и 5 нг/мл эритропоэтина. Ответ в виде пролиферации/жизнеспособности (= увеличения жизнеспособности) клеток на воздействие эритропоэтина опосредован классическим рецептором эритропоэтина эритроцитарного типа и является количественной мерой способности вариантов эритропоэтина стимулировать классический рецептор эритропоэтина.

Клетки UT-7еро переносили в свежую полную среду RPMI-1640, содержащую 10% донорской сыворотки теленка, 4 мМ L-глутамин, с добавлением 5 нг/мл рекомбинантного эритропоэтина человека. Клетки поддерживали во флаконах объемом 75 см<sup>2</sup> с 20 мл среды/флакон в инкубаторе с увлажнением и 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 48 ч. На второй день анализа, т.е. через 48 ч, клетки переносили из флакона в коническую пробирку объемом 50 мл и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Надсадок отбрасывали и клетки два раза промывали 10 мл обедненной среды (3% донорской сыворотки теленка, 4 мМ L-глутамин). Затем клетки ресуспендировали в обедненной среде, используя пипетирование вверх и вниз, чтобы получить суспензию отдельных клеток. Ресуспендированные клетки разбавляли обедненной средой до получения плотности 4×10<sup>5</sup> клеток/мл и высевали в общий объем культуры 10 мл во флакон объемом 25 см<sup>2</sup>. После 4-часовой инкубации клетки снова переносили в коническую пробирку объемом 50 мл. Контрольные клетки все время поддерживали с 5 нг/мл  $\theta$ u-эритропоэтина.

Клетки разбавляли до концентрации 200000 клеток/мл в обедненной среде, высевали по 100 мкл/лунку в 96-луночный планшет и воздействовали различными концентрациями эритропоэтина, карбамилированного эритропоэтина и пептида D (SEQ ID NO:30). Серию 10-кратных разбавлений в среде RPMI-1640, содержащей 3% сыворотку, использовали для получения концентраций тестируемых соединений от 0,2 пМ до 20 нМ. После дополнительной 48-часовой инкубации в каждую лунку добавляли 15 мл раствора реагента для выявления пролиферации клеток WST-1 (Roche) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>. После перемешивания в течение 1 мин планшет регистрировали в устройстве для считывания планшетов (поглощение при 450 нм, вычитенное из фонового поглощения при 650 нм).

Пептид D не проявлял эритропоэтической активности в таких высоких дозах, как 10000 пМ (фиг. 3). Предпочтительно пептид не будет обладать эритропоэтической активностью в дозах ниже 1 мкг/мл и более предпочтительно в дозах ниже 10 мкг/мл.

В. Оценка *in vivo*.

Чтобы оценить эритропоэтическую активность тканезащитного пептида F (SEQ ID NO:33) или пептида G (SEQ ID NO:40, как обсуждается выше, сконструированный пептид, представляющий остатки спирали В), пептиды вводили в дозе 0,8 мкг/кг подкожно три раза в неделю самцам крыс Sprague-Dawley. Схема дозирования соответствовала схеме введения эквивалентной дозы (в молях) ЕРО, которая, как определено ранее, вызывает максимальный эритропоэз. Концентрацию гемоглобина определяли периодически, используя автоматизированный анализатор (Keska Corporation).

Ни пептид В, ни пептид С не давали повышения гематокрита в ходе исследования (фиг. 4; для сравнения представлен ответ на эквивалентную дозу ЕРО). Уменьшение уровня гемоглобина, отмеченное для ЕРО через 3 недели, является следствием продуцирования нейтрализующих анти-ЕРО-антител, которые вызывают истинную эритроцитарную аплазию. В отличие от этого не наблюдали ответа в виде образования нейтрализующих антител в случае пептида G или пептида F.

Пример 4. Пептид является тканезащитным в анализе *in vitro*.

Пептиды можно легко оценить в отношении защиты тканей, используя любое количество анализов *in vitro*. Например, защиту от эксайтотоксичности можно определить, используя индуцированную каинитом гибель мотонейронов мышцы. Спинальный мозг получали из 15-дневных эмбрионов крыс Sprague-Dawley, как описано ранее (Siren et al., 2001, PNAS. 98:4044, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Вентральный рог обрабатывали трипсином и центрифугировали через подушку 4% БСА в течение 10 мин при 300×g. Клетки (представляющие собой смешанную культуру нейронов-глии) высевали при плотности 2000 клеток/см<sup>2</sup> в планшеты с лунками 24 мм, предварительно покрытые поли-DL-орнитином и ламинином. Затем мотонейроны очищали посредством иммунного пэннинга и клетки высевали при низкой плотности (20000 клеток/см<sup>2</sup>) на планшеты с лунками 24 мм, предварительно покрытые поли-DL-орнитином и ламинином и содержащие полную культуральную среду [Neurobasal/B27 (2%); 0,5 мМ L-глутамин; 2% сыворотка лошади; 25 мМ 2-меркаптоэтанол; 25 мМ глутамат; 1% пенициллин и стрептомицин; 1 нг/мл BDNF]. Среду (без глутамата) повторно добавляли к культурам на 4 и 6 день.

Гибель клеток в культуре индуцировали на 6 день посредством инкубации в течение 48 ч с каиновой кислотой (5 мМ для смешанных культур нейроны-глии; 50 мМ для очищенных культур). Пептид D (5 нг/мл) или наполнитель добавляли к культурам за 72 ч до индукции гибели клеток и обработку продолжали в течение 48 ч. Затем среду удаляли и клетки фиксировали 4% (об./об.) параформальдегидом в PBS в течение 40 мин, делали их проницаемыми с использованием 0,2% тритона X-100, блокировали 10% (об./об.) FCS в PBS, инкубировали с антителами против нефосфорилированных нейрофиламентов (SMI-32; 1:9000) в течение ночи и визуализировали, используя способ на основе авидина-биотина с помощью диаминобензидина. Жизнеспособность мотонейронов оценивали морфологически, подсчитывая SMI-32-позитивные клетки по всей площади покровного стекла и осуществляли окраску апоптотных тел, используя H33258.

Пептид D (SEQ ID NO:30), соответствующий аминокислотам 58-82 последовательности SEQ ID NO:1, полностью защищал мотонейроны от повреждения, вызываемого каинатом (фиг. 5).

Альтернативно защиту ткани, которую обеспечивают пептиды, можно определить, используя анализ, основанный на клетках P19 мышей, которые являются нейроноподобными клетками и погибают вследствие апоптоза при удалении сыворотки. Защиту ткани пептидом D (SEQ ID NO:30) сравнивали с защитой ЕРО, используя P19-клон P19S1801A1, как опубликовано ранее (Siren et al., 2001, PNAS. 98:4044, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Клетки поддерживали в недифференцированном состоянии в среде DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамин; 100 единиц/мл пенициллина G; 100 мг/мл сульфата стрептомицина (GIBCO); 10% (об./об.) FBS (HyClone), содержащей 1,2 г/л NaHCO<sub>3</sub> и 10 мМ буфер HEPES, далее называемой полной средой. Бессывороточная среда содержала такие же компоненты, как указано выше, но без сыворотки и с добавлением 5 мг/мл инсулина; 100 мг/мл трансферрина; 20 нМ прогестерона; 100 мМ путресцина; 30 нМ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma). Для экспериментов слитые в слой на 50% клетки предварительно обрабатывали в течение ночи ЕРО или наполнителем, диссоциировали обработкой трипсином, промывали в бессывороточной среде и высевали во флаконы для культуры ткани объемом 25 см<sup>2</sup> с конечной плотностью 10<sup>4</sup> клеток/см<sup>2</sup> в бессывороточной среде без добавки или с добавлением ЕРО. Жизнеспособность клеток определяли посредством исключения при окраске трипановым синим и с использованием гемоцитометра.

Пептид С (SEQ ID NO:29), соответствующий аминокислотам 38-57 последовательности SEQ ID NO:1, по меньшей мере в 10 раз более эффективен в расчете на массу, чем ЕРО, в предотвращении апоптоза клеток p19 (фиг. 6).

Пример 5. Модель окклюзии средней мозговой артерии.

(а) Самцов крыс Crl:CD(SD)BR массой 250-280 г получали от Charles River, Calco, Italy. Операцию проводили согласно руководству Brines et al., 2000, PNAS USA. 97:10526-10531 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Коротко, крыс анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг массы тела, в/б), визуализировали сонные артерии и правую сонную артерию перевязывали двумя лигатурами и перерезали. Трепанационное отверстие вблизи и в роstralном направлении по отношению к правой глазнице позволяло увидеть среднюю мозговую артерию ("MCA"), в которую вводили катетер дистально от носовой артерии. Чтобы получить зону пенумбры (переходную зону), окружающую указанное фиксированное повреждение MCA, контралатеральную сонную артерию также подвергали окклюзии в течение 1 ч, используя пережатие атравматическим пинцетом, и затем снова открывали.

Крыс Sprague-Dawley (8 на группу) подвергали операции согласно указанному выше протоколу MCAO. Крысам вводили PBS, карбамилированный эритропоэтин (44 мкг/кг) или пептид D (аминокислоты 58-82; 4,4 мкг/кг) после снятия окклюзии. Кроме того, отдельной группе вводили четыре дозы пептида D (аминокислоты 58-82; 4,4 мкг/кг) с 2-часовыми интервалами после окклюзии. Для оценки повреждения тестировали поведение крыс или объем повреждения определяли при окрашивании тетразолием срезов головного мозга, полученных через 24 ч после операции согласно ранее указанному протоколу.

На фиг. 7A представлен график, демонстрирующий объем повреждений в результате осуществления протокола MCAO. Обработка пептидом D (SEQ ID NO:30) либо в виде однократной дозы, либо многократными дозами уменьшала объем повреждения в результате операции MCAO примерно на 2/3: статистически эквивалентно тканезащитному действию карбамилированного эритропоэтина.

(b) Терапевтическое окно тканезащитных цитокинов.

Протокол MCAO, который описан выше, повторяли для данного примера. После процедуры окклюзии крысам вводили PBS, карбамилированный эритропоэтин (44 мкг/кг, в/в) или пептид D (SEQ ID NO:30) (4,4 мкг/кг) сразу после установления рециркуляции в сонной артерии (т.е. спустя 1 ч после начала ишемии). Кроме того, пептид D (SEQ ID NO:30) вводили в четырех дозах (каждая по 4,4 мкг/кг массы тела) с 2-часовыми интервалами после окклюзии (8 крыс на группу).

(c) Тестирование поведения.

Отдельную группу крыс также тестировали, используя протокол анализа поведения на основании промахов стопы. Крыс тестировали на приподнятом решетчатом полу из нержавеющей стали 30×30 см с размером решетки 30 мм согласно протоколу Markgraf et al., 1992, Brain Research. 575:238-246 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). При помещении на решетку крыса попытается двигаться повсюду и иногда помещает стопу не на решетку, а сквозь отверстия решетки ("промах стопы"). Количество промахов стопы измеряли в течение 1 мин.

Крысы, обработанные пептидом D (SEQ ID NO:30), после реперфузии имели меньше промахов стопы, чем крысы, обработанные PBS (фиг. 7B). Не наблюдали значимого дополнительного преимущества после введения многократных доз пептида D (SEQ ID NO:30). Хотя среднее количество промахов стопы было меньше в группе, получавшей многократные дозы пептида, наблюдаемое отличие не было статистически значимым по сравнению с группой, получавшей однократную дозу.

Пример 6. Диабетическая невропатия.

Диабет индуцировали у самцов крыс Sprague-Dawley (Charles River, Calco, IT), используя стрептозоцин, вводимый в однократной дозе 60 мг/кг в/б голодным крысам, как описано ранее (Bianchi et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 823-828, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Диабет подтверждали по увеличению уровней глюкозы в сыворотке выше 300 мг/дл (мг %) (нормальные уровни <100 мг %). Затем животных с диабетом обрабатывали пептидом D (SEQ ID NO:30; 4 мкг/кг) или наполнителем 5 раз в неделю внутрибрюшинно. Через 2 недели после индукции диабетического состояния определяли скорость проводимости нерва, используя хвостовой нерв.

Как показано на фиг. 8A, у диабетических животных наблюдали уменьшение скорости проводимости хвостового нерва примерно с 22 м/с (нормальная скорость) до примерно 19 м/с. Введение пептида D (SEQ ID NO:30) было связано с увеличением скорости проводимости примерно до 23 м/с.

Кроме того, количественно оценивали болевой порог при термическом воздействии посредством измерения времени отдергивания лапы в тесте с "горячей пластиной". Задержку отдергивания определяли как период времени между помещением на горячую пластину и временем отдергивания и облизывания задней лапы. Каждое животное тестировали дважды с 30-минутным интервалом покоя. Термический порог для задней лапы измеряли через 4 недели после индукции диабета. Пептид D (SEQ ID NO:30) уменьшал время задержки на горячей пластине у диабетического животного (фиг. 8B).

Пример 7. Защита седалищного нерва и почек от индуцированного цисплатиной повреждения.

Цисплатину (CDDT) вводили внутривентриально самцам крыс Sprague-Dawley в дозе 2 мг/кг дважды в неделю в течение 5 недель, как описано в публикации Bianchi et al., 2006, Clin. Cancer Res. 12:2607-2612, которая включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. Животных делили на группы по 6 в каждой. В течение 5-недельного введения CDDT животные также получали либо пептид G (SEQ ID NO:40) в дозе 0,4 мг/кг массы тела, либо PBS внутривентриально три раза в неделю. Контрольная группа получала PBS вместо CDDT. Задержку на горячей пластине определяли, как описано в примере 6 выше.

У животных, которые получали CDDT и только PBS, не наблюдали увеличения задержки по сравнению с контролями: т.е. CDDT связан с нарушенной тепловой чувствительностью. Напротив, у животных, которые получали пептид, наблюдали нормальную задержку на горячей пластине (фиг. 9А).

Обработка пептидом также предотвращала CDDT-индуцированную полиурию (фиг. 9В). В частности, у животных, которые получали PBS, наблюдали значимое увеличение суточной продукции мочи примерно от 30 до 47 мл/сутки. Напротив, животные, получавшие тканезащитный пептид, значимо не отличались от контрольных животных, которые получали PBS вместо CDDT.

Пример 8. Защита от индуцированного диабетом просачивания сосудов сетчатки.

Полезное влияние тканезащитных пептидов на индуцированное гипергликемией просачивание сосудов сетчатки можно определить, используя модель диабетической ретинопатии у крыс. В данной модели используют синий краситель Эванса, чтобы определить просачивание из кровеносного сосуда в ткани, как описано в Xu et al., 2001, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42:789-794 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Синий краситель Эванса прочно связывается с альбумином и поэтому удерживается в кровообращении, если не происходит просачивание через стенки сосудов, например, вызванное неконтролируемым сахарным диабетом.

В данной модели голодные самцы крыс Sprague-Dawley получают однократную дозу стрептозотоцина (60 мг/кг, в/б). Через 2 дня после подтверждения развития сахарного диабета (уровень глюкозы в сыворотке натощак больше 300 мг %) животных делили на группы по 6 животных в каждой, а также использовали контрольную группу, которая не получала стрептозотоцина. В двух диабетических группах вводили либо пептид D (SEQ ID NO:30) в дозе 4 мг/кг внутривентриально 5 дней в неделю, либо PBS по такой же схеме. После 3 недель неконтролируемого диабета животных анестезировали и внутривенно вводили синий краситель Эванса (30 мг/кг), которому давали возможность циркулировать в течение 2 ч. Затем, используя транскардиальную пункцию, животных перфузировали PBS вплоть до тех пор, пока эфлюент не становился прозрачным, затем 4% параформальдегидом. Затем извлекали глаза и осторожно отсекали сетчатку от глазного яблока. Содержание в сетчатке синего красителя Эванса определяли посредством инкубации сетчатки в формамиде при 80°C в течение 18 ч. Затем надсадок извлекали и сохраняли для анализа и сетчатки полностью сушили и взвешивали. Концентрацию синего красителя Эванса в надсадке определяли с помощью спектрофотометра и полученной стандартной кривой для синего красителя Эванса, растворенного в формамиде.

Как показано на фиг. 10, животные, которым вводили пептид D (SEQ ID NO:30), не имели повышения синего красителя Эванса в сетчатке по сравнению с контролем. В отличие от этого, у диабетических животных, которые получали только PBS, наблюдали увеличение содержания синего красителя Эванса в сетчатке, что свидетельствует о том, что произошло просачивание из сосудов.

Пример 9. Защита от острой почечной недостаточности.

Тканезащитные пептиды также эффективны для профилактики повреждения почек в условиях ишемии. Взрослых самцов крыс Wistar анестезировали и делали разрез брюшной стенки, чтобы открыть обе почечные артерии. Используя атравматический зажим для сосудов, обе артерии сжимали в течение 60 мин, полностью задерживая поток крови в почки. Затем зажимы удаляли, восстанавливая кровообращение, и внутривенно вводили пептид F (SEQ ID NO:33) или пептид G (SEQ ID NO:40) в дозе 290 пмоль/кг массы тела. Дополнительная группа, которую подвергали ишемии, получала только PBS внутривенно.

Через 72 ч после реперфузии животных анестезировали и подвергали перфузионной фиксации, используя параформальдегид. После фиксации животных рассекали сагитально на половины и дополнительно фиксировали погружением в 10% формальдегид при комнатной температуре в течение 1 дня. Гистологическую оценку почек осуществляли согласно протоколу Sharples et al., 2005, J. Mer. Soc. Nephrol. 15:2115 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Коротко, после обезвоживания с использованием возрастающих концентраций этанола кусочки почки заливали в парафин, делали срезы толщиной 5 мкм и закрепляли на предметных стеклах. Парафин со срезов на стеклах удаляли, используя ксилен, контрастно красили гематоксилином и эозином и анализировали в световом микроскопе. Исследовали 100 полей для каждой почки и оценивали в баллах от 0 до 3 для каждого профиля канальцев: 0, нормальная гистология; 1, набухание клеток канальцев, утрата щеточной каемки и конденсация ядер с утратой ядер на 1/3; 2, как в случае оценки 1, но более чем в 1/3 части и менее чем в 2/3 частях профиля канальцев наблюдается утрата ядер; и 3, более чем в 1/3 профиля канальцев наблюдается утрата ядер. Гистологическую оценку для каждой почки вычисляли суммированием всех

баллов, при этом максимальная оценка составляла 300.

Введение либо пептида F (SEQ ID NO:33), либо пептида G (SEQ ID NO:40) было связано со значимым уменьшением оценки повреждения ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролями.

Пример 10. Эффективность тканезащитных пептидов при церебральной малярии.

Модель церебральной малярии у грызунов создавали согласно Kaiser et al., 2006, J. Infect. Dis. 193:987-995 (публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме). Самок мышей CBA/J 7-недельного возраста делили на группы по 20 животных. Каждую группу инфицировали *Plasmodium berghei* Anka (PbA), вводимым внутрибрюшинно в дозе  $10^6$  PbA-инфицированных эритроцитов. Мыши получали либо PBS, либо пептид F (SEQ ID NO:33) на 4, 5 и 6 день в виде внутрибрюшинной инъекции в дозе 2,6 мкг/кг. Данные о клиническом состоянии и данные мазков крови собирали во время последующего наблюдения (конечная точка D30). Кумулятивную долговременную выживаемость рассчитывали способом Каплана-Мейера и группы сравнивали с помощью логарифмического рангового критерия. Время выживания являлось зависимой переменной. Значение  $p < 0,05$  считали значимым.

Как показано на фиг. 12, все мыши в контрольной группе (физиологический раствор) погибли на 8 день. В отличие от этого, у мышей, которые получали пептид F (SEQ ID NO:33), наблюдали более длительную выживаемость, значимо отличающуюся от выживаемости в контрольной группе ( $p < 0,005$ ) на основании логарифмического рангового критерия.

Пример 11. Эффективность тканезащитных пептидов в модели ЕАЕ у мышей.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит ("ЕАЕ") индуцировали у самок мышей C57BL/6 (6-8-недельного возраста) согласно Savino et al., 2006, J. Neuroimmunol. 172:27-37, публикация включена в данное описание в виде ссылки в полном объеме. ЕАЕ индуцировали подкожной иммунизацией в бок, используя всего 200 мкг MOG35-55 (система нескольких пептидов, San Diego, CA, USA) в неполном адьюванте Фрейнда (Sigma, St. Louis, MO, USA) с добавлением 8 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* (штамм H37RA; Difco, Detroit, MI, USA). Животных содержали в специальных, не содержащих патогенов условиях, обеспечивая доступ к корму и воде ad libitum. Мыши получали 500 нг коклюшного токсина (Sigma) внутривенно во время иммунизации и через 48 ч. Массу и клиническую оценку регистрировали ежедневно (0 = здоровые, 1 = поникший хвост, 2 = атаксия и/или паралич задних конечностей или медленный рефлекс выпрямления, 28 С. 3 = паралич задних конечностей и/или паралич передних конечностей; 4 = парапарез передних конечностей; 5 = агония или гибель). Гранулы корма и питьевую воду помещали в чашки Петри на пол клетки, чтобы больные мыши могли есть и пить. Пептид E (SEQ ID NO:31) вводили ежедневно подкожно в дозе 4,4 мкг/кг массы тела начиная с 4 дня после иммунизации.

Введение пептида E (SEQ ID NO:31) значимо уменьшало как продолжительность, так и тяжесть клинической картины ЕАЕ у обработанных животных ( $p < 0,01$ ) (фиг. 13).

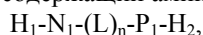
Изобретение не следует ограничивать объемом конкретных описанных вариантов, которые предназначены в качестве иллюстраций отдельных аспектов изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты входят в объем изобретения. Несомненно различные модификации изобретения, кроме тех, которые показаны и описаны в данной публикации, будут очевидны для специалистов в данной области из приведенного выше описания и прилагаемых чертежей. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Все цитированные публикации включены в данное описание в виде ссылки в полном объеме для всех целей.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированный полипептид, состоящий не более чем из 30 аминокислотных остатков, содержащий 11 направленных наружу аминокислотных остатков спирали В эритропоэтина, где в одном из указанных аминокислотных остатков может быть осуществлена консервативная или неконсервативная замена, или его обратный инверсный аналог.

2. Изолированный полипептид по п.1, содержащий аминокислотный мотив:



где n равно 0-1;

$H_1$  и  $H_2$  означают гидрофобные аминокислоты;

$N_1$  означает отрицательно заряженную аминокислоту;

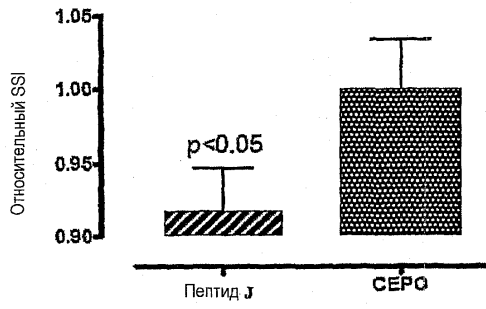
$L_1$  означает полярную аминокислоту и

$P_1$  означает положительно заряженную аминокислоту.

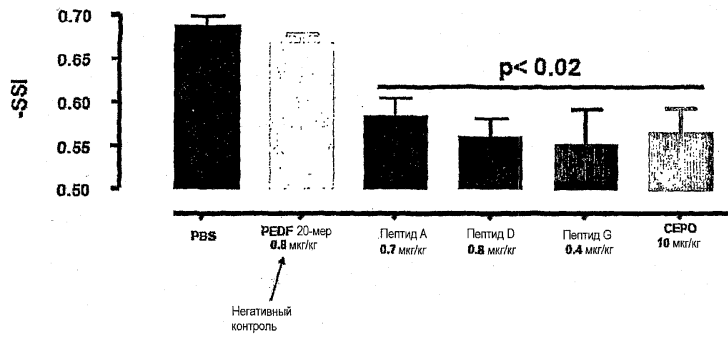
3. Изолированный полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность QEQLER-ALNSS (SEQ ID NO:40), где в одном из указанных аминокислотных остатков может быть осуществлена консервативная или неконсервативная замена, или его обратный инверсный аналог.

4. Изолированный полипептид по п.3, состоящий из аминокислотной последовательности QEQLER-ALNSS (SEQ ID NO:40), где в одном из указанных аминокислотных остатков может быть осуществлена консервативная или неконсервативная замена, или его обратный инверсный аналог.

5. Изолированный полипептид по п.3, состоящий из аминокислотной последовательности QEQLER-ALNSS (SEQ ID NO:40), или его обратный инверсный аналог.
6. Обратный инверсный аналог изолированного полипептида по любому из пп.1-5.
7. Изолированный полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность QEQLER-ALNSSLRRYINMLTRTR (SEQ ID NO:41), где в одном из указанных аминокислотных остатков может быть осуществлена консервативная или неконсервативная замена.
8. Изолированный полипептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность CSLNENIQEQLERALNSS (SEQ ID NO:43), где в одном из указанных аминокислотных остатков может быть осуществлена консервативная или неконсервативная замена.
9. Изолированный полипептид по любому из пп.1-4, 6 или 7, содержащий консервативную или неконсервативную замену аминокислотой или эквивалентом аминокислоты.
10. Изолированный полипептид по любому из пп.1-8, где указанный полипептид модифицирован добавлением полиэтиленгликоля.
11. Изолированный полипептид по любому из пп.1-10, где указанный полипептид не увеличивает уровень гемоглобина у реципиента.
12. Изолированный полипептид по любому из пп.1-10, который обладает защитной в отношении клеток активностью, такой как защита, сохранение, усиление или восстановление функции и/или жизнеспособности указанной клетки, ткани или органа, таких как клетки или ткани нервов, костей, глаза, жировой ткани, соединительной ткани, волос, зубов, слизистой оболочки, поджелудочной железы, эндокринных органов, уха, эпителия, кожи, мышц, сердца, легкого, печени, почки, кишечника, надпочечников, капилляров, эндотелия, семенников, яичника или эндометрия или стволовые клетки.
13. Изолированный полипептид по любому из пп.1-10, где указанный полипептид обладает защищающей клетки активностью в отношении возбудимой ткани, такой как ткань центральной нервной системы, ткань периферической нервной системы, ткань сердца или ткань сетчатки.
14. Изолированный пептид по любому из пп.1-10, где указанный пептид способен проходить через барьер эндотелиальных клеток, такой как гематоэнцефалический барьер, гематоофтальмический барьер, гематотестикулярный барьер, гематоовариальный барьер, барьер кровь-нервы или кровь-спинной мозг.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая изолированный полипептид по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанная композиция приготовлена для орального, интраназального, глазного, ингаляционного, трансдермального, ректального, подъязычного или парентерального введения.
17. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанная композиция приготовлена в виде перфузионного раствора.
18. Способ защиты, сохранения или усиления жизнеспособности чувствительной клетки, ткани или органа, выделенных из организма млекопитающего, включающий воздействие на указанную клетку, ткань или орган изолированным полипептидом по любому из пп.1-10 или фармацевтической композицией по любому из пп.15-17.
19. Способ по п.18, где организм млекопитающего представляет собой организм человека.
20. Применение изолированного пептида по любому из пп.1-10 для получения фармацевтической композиции для профилактики, терапевтического лечения или профилактического лечения сердечно-сосудистого заболевания, сердечно-легочного заболевания, респираторного заболевания, болезни почек, болезни мочевой системы, заболевания репродуктивной системы, заболевания костей, кожной болезни, желудочно-кишечного заболевания, эндокринного нарушения, метаболического нарушения, когнитивной дисфункции или заболевания или расстройства центральной или периферической нервной системы у нуждающегося в этом субъекта.
21. Применение по п.20, в котором субъект представляет собой человека.
22. Изолированная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую изолированный пептид по любому из пп.1-10.
23. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.22.
24. Вектор по п.23, который является экспрессирующим вектором.
25. Клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.24.
26. Способ рекомбинантного получения изолированного пептида, включающий в себя а) культивирование в среде клетки-хозяина по п.25 в условиях, подходящих для экспрессии указанного пептида, и б) извлечение и выделение указанного пептида из указанной среды.

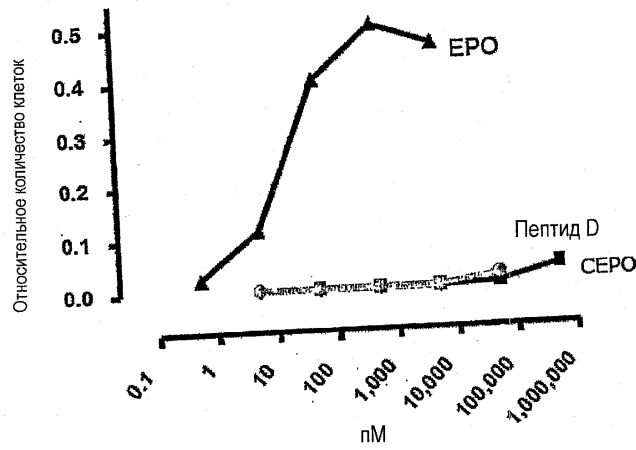


Фиг. 1



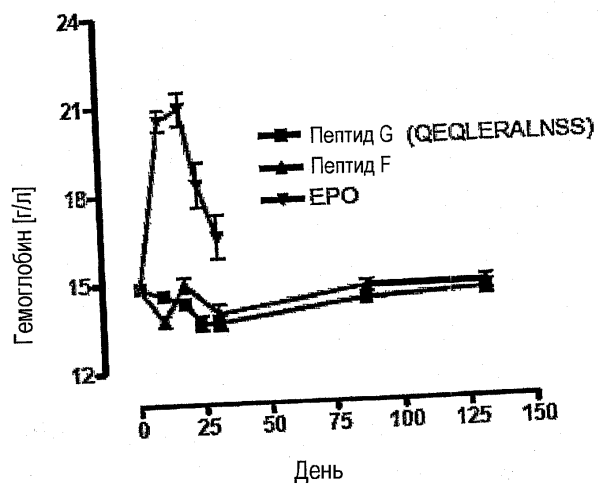
Фиг. 2

Эритролейкозные клетки UT-7еро

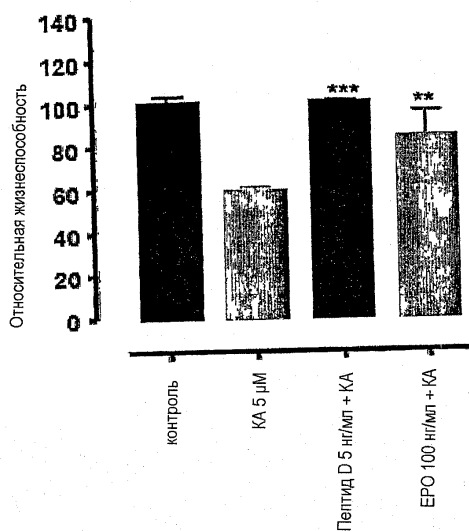


Фиг. 3

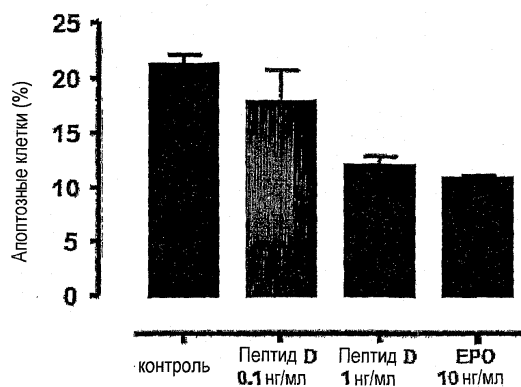




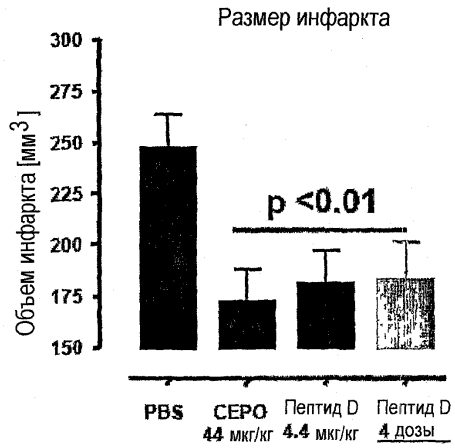
Фиг. 4



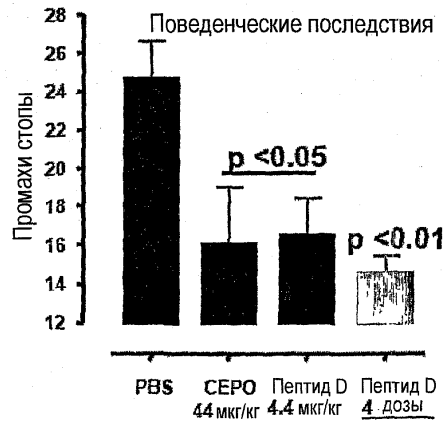
Фиг. 5



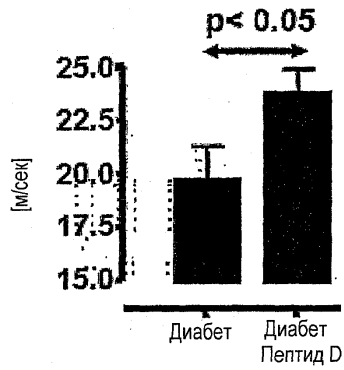
Фиг. 6



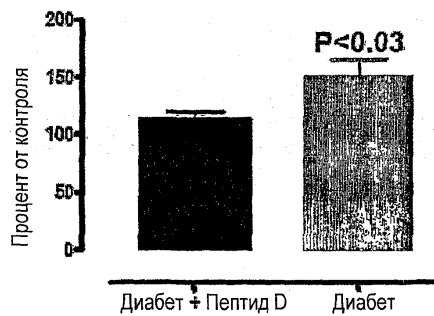
Фиг. 7А



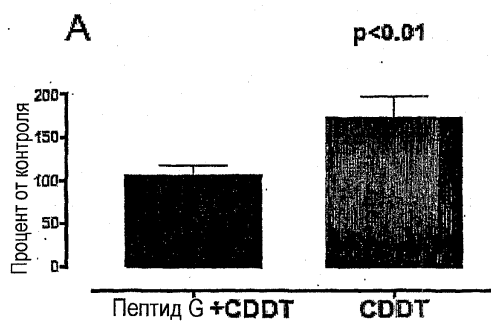
Фиг. 7В



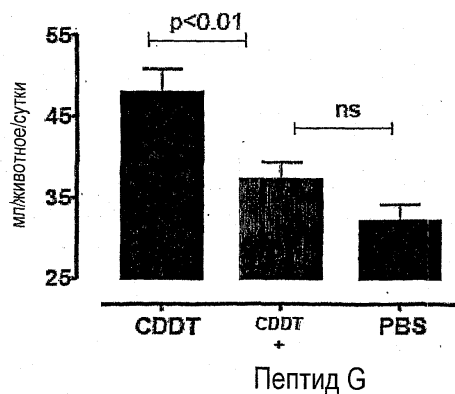
Фиг. 8А



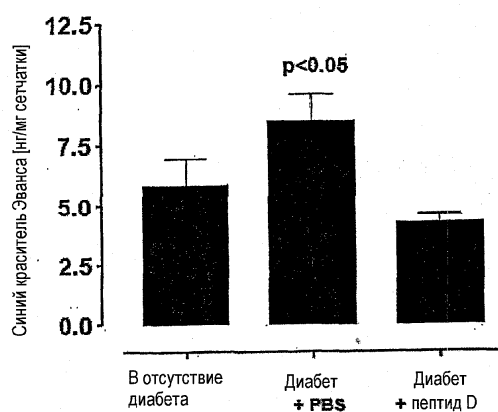
Фиг. 8В



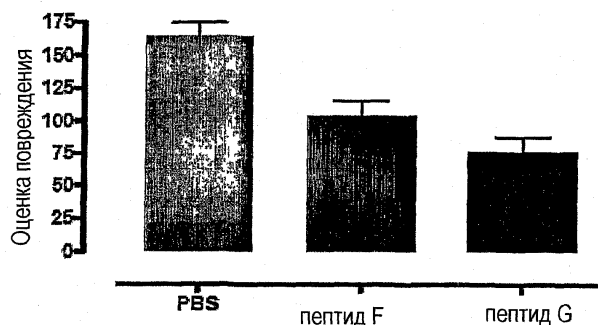
Фиг. 9А



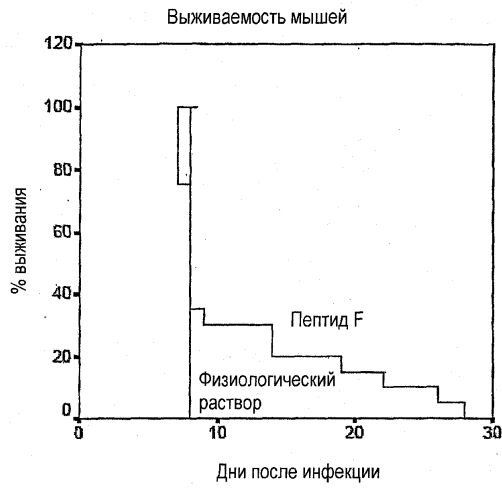
Фиг. 9В



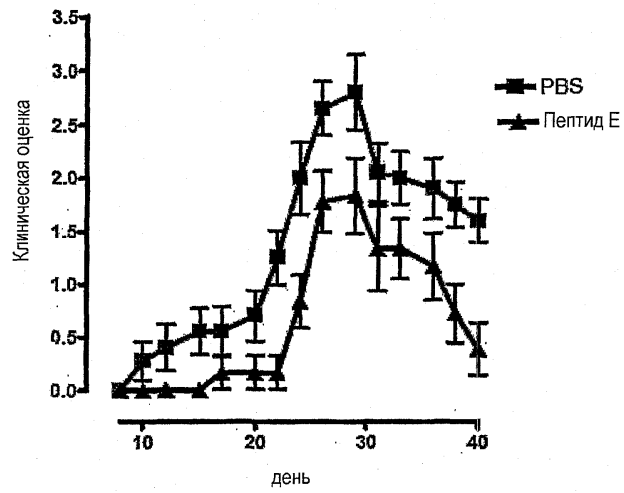
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

## Список последовательностей

- <110> Brines, Michael  
Cerami, Anthony  
Coleman, Thomas
- <120> Тканезащитные пептиды и их применения
- <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> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность
- <220>  
<223> Пептид эритропоэтина
- <400> 1  
Ala 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> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность
- <220>  
<223> Аминокислоты 44-49 ЕРО, связываемые с высоко аффинными сайтом 1  
связывания рецептора

<400> 2  
 Thr Lys Val Asn Phe Tyr  
 1 5

<210> 3  
 <211> 6  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислоты 146-151 ЕРО, связываемые с высоко аффинными сайтом 1  
 связывания рецептора

<400> 3  
 Ser Asn Phe Leu Arg Gly  
 1 5

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислоты 11-15 ЕРО, взаимодействующие с низко аффинным сайтом 2  
 связывания рецептора

<400> 4  
 Val Leu Glu Arg Tyr  
 1 5

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислоты 100-104 ЕРО, взаимодействующие с низко аффинным сайтом 2  
 связывания рецептора

<400> 5  
 Ser Gly Leu Arg Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 4  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Изолированные полипептиды, содержащие аминокислотный структурный мотив А

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1, 4  
 <223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 2, 3

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<400> 6

Хаа Хаа Хаа Хаа

1

<210> 7

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1, 5

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 4

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Хаа=любая аминокислота

<400> 7

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 8

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1, 6

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 5

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3, 4

<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<400> 8

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 9  
 <211> 7  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1, 7  
 <223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 2, 6  
 <223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 3, 4, 5  
 <223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<400> 9  
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1 5

<210> 10  
 <211> 8  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1, 8  
 <223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 2, 7  
 <223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 3, 4, 5, 6  
 <223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<400> 10  
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность



<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1, 9  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 8  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4, 5, 6, 7  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<400> 11  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 12  
<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 3  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 4  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 12  
Хаа Хаа Хаа Хаа  
1

<210> 13  
<211> 5  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 4  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3  
<223> Хаа=любая аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 5  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 13  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 14  
<211> 6  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих  
аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 5  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 6  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 14  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 15  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 6

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3, 4, 5

<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 7

<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 15

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 16

<211> 8

<212> БЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 7

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3, 4, 5, 6

<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 8

<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 16

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 8  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4, 5, 6, 7  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 9  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<400> 17  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 18  
<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 3  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 4  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 18  
Хаа Хаа Хаа Хаа  
1

<210> 19  
<211> 5  
<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 4

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Хаа=любая аминокислота

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 5

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 19

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 20

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2, 5

<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3, 4

<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 6

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 20

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1

5

<210> 21  
<211> 7  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов EPO, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 6  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4, 5  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 7  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 21  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 22  
<211> 8  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов EPO, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 7  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4, 5, 6  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 8

<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 22  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ

<222> 1  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2, 8  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3, 4, 5, 6, 7  
<223> Хаа=любая аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 9  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<400> 23  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 24  
<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1, 4  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота (одинаковые или разные)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3

<223> Хаа=любая положительно заряженная аминокислота

<400> 24  
Хаа Хаа Хаа Хаа  
1

<210> 25  
<211> 5  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих  
аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1, 5  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3  
<223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 4  
<223> Хаа=любая положительно заряженная аминокислота

<400> 25  
Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
1 5

<210> 26  
<211> 4  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих  
аминокислотный структурный мотив А

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 1, 4  
<223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 2  
<223> Хаа=любая положительно заряженная аминокислота

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3  
<223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота



<400> 26  
 Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Вариант изолированных полипептидов ЕРО, содержащих  
 аминокислотный структурный мотив А

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1, 5  
 <223> Хаа=любая гидрофобная аминокислота

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 2  
 <223> Хаа=любая положительно заряженная аминокислота

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 3  
 <223> Хаа=любая полярная аминокислота

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 4  
 <223> Хаа=любая отрицательно заряженная аминокислота

<400> 27  
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1 5

<210> 28  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Амфипатическая спираль из панкреатического полипептида

<400> 28  
 Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид С - петля АВ и N-концевая часть спирали В,  
 соответствующие аминокислотам ЕРО 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид D - С-концевая часть спирали B,  
 соответствующая аминокислотам ЕРО 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид E - часть петли A-B, состоящая из  
 небольшой цистеиновой петли и бета-складчатого слоя,  
 соответствующая аминокислотам ЕРО 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид A - состоит из N-концевой части спирали A,  
 соответствующей аминокислотам ЕРО 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид F - состоит из аминокислот ЕРО 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид В - состоит из аминокислот EPO 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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент спирали А GM-CSF

<400> 35  
 Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 12  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент спирали А TPO

<400> 36  
 Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 16  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент спирали А CNTF

<400> 37  
 Lys Ile Arg Ser Asp Leu Thr Ala Leu Thr Glu Ser Tyr Val Lys His  
 1 5 10 15

<210> 38  
 <211> 17  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент спирали В LIF

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Фрагмент спирали А интерлейкина 3 (IL-3)

<400> 39  
 Ser Ile Met Ile Asp Glu Ile Ile His His Leu Lys Arg Pro Pro Asn  
 1                         5                         10                         15  
 Pro Leu

<210> 40  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид G - все направленные в наружную сторону аминокислоты  
 спирали В ЕРО

<400> 40  
 Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn Ser Ser  
 1                         5                         10

<210> 41  
 <211> 23  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид J - химерный пептид из пептида G,  
 связанного со спиралью панкреатического полипептида

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Бета-складчатый слой, обнаруженный в петле АВ ЕРО

<400> 42  
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile  
 1                         5

<210> 43  
 <211> 18  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Пептид I - химерный пептид, связывающий направленные в наружную сторону аминокислоты спирали В с бета-складчатым слоем, обнаруженным в петле АВ ЕРО

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Концевая часть спирали С, соответствующая аминокислотам 111, 112, 113, 116 и 118 ЕРО

<400> 44  
 Ala Leu Gly Lys Ala  
 1 5

<210> 45  
 <211> 22  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Часть петли CD, соответствующая аминокислотам 112-133 ЕРО

<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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотный фрагмент пептида F

<400> 46  
 Glu Ala Lys Glu  
 1

<210> 47  
 <211> 6  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Пептид Н - состоит из аминокислот ЕРО 61, 72, 75, 76, 77

&lt;400&gt; 47

Ser Glu Leu Arg Gly Gln

1 5

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кальцитонин

&lt;400&gt; 48

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

1 5 10

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Кортиколиберин

&lt;400&gt; 49

Val Ala Leu Leu Pro Cys Pro Pro Cys Arg Ala

1 5 10

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Бета-эндорфин

&lt;400&gt; 50

Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Глюкагон

&lt;400&gt; 51

Gly Ser Trp Gln Arg Ser Leu Gln Asp Thr Glu

1 5 10

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 10

<212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Секретин  
  
 <400> 52  
 Gly Gly Ser Ala Ala Arg Pro Ala Pro Pro  
 1 5 10  
  
 <210> 53  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> VIP  
  
 <400> 53  
 Asn Ala Leu Ala Glu Asn Asp Thr Pro Tyr Tyr  
 1 5 10  
  
 <210> 54  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <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> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> GNRH  
  
 <400> 55  
 Gly Cys Ser Ser Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu  
 1 5 10  
  
 <210> 56  
 <211> 11  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Паратиреоидный гормон  
  
 <400> 56  
 Val Met Ile Val Met Leu Ala Ile Cys Phe Leu  
 1 5 10  
  
 <210> 57

<211> 11  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> CGRP

<400> 57  
Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Tyr Gln Ala  
1 5 10

<210> 58  
<211> 5  
<212> БЕЛОК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Мотив, локализованный проксимально по отношению  
к трансмембранному домену белка рецептора  
эритропоэтина («EPOR»)

<220>  
<221> ВАРИАНТ  
<222> 3  
<223> Xaa=любая аминокислота

<400> 58  
Trp Ser Xaa Trp Ser  
1 5

