

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 124**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/505** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009 E 09703197 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 2245056**

54 Título: **Péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido para la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con daño tisular**

30 Prioridad:

**22.01.2008 US 62012 P**  
**22.01.2008 US 62022 P**  
**22.01.2008 US 62045 P**  
**03.07.2008 US 133912 P**  
**30.12.2008 US 203890 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2015**

73 Titular/es:

**ARAIM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**580 White Plains Road, Suite 210**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**CERAMI, ANTHONY y**  
**BRINES, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 539 124 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido para la prevención y el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con daño tisular

**1. Introducción**

5 La invención proporciona péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular y/o con un daño, un efecto o un síntoma de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, inflamación y exposición a un agente tóxico. En particular, la invención proporciona péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido que comparten secuencias consenso con fragmentos de ligandos del receptor de citocina de Tipo I que tienen pocos o ningún efecto hematopoyético posiblemente indeseable de los ligandos de longitud completa.

10 Estos péptidos también incluyen fragmentos, quimeras, así como péptidos diseñados para imitar la localización espacial de restos aminoacídicos clave dentro de los ligandos de receptores protectores de tejido, por ejemplo EPO. Esta invención proporciona adicionalmente métodos y usos de estos péptidos para modular una respuesta y/o un síntoma del sujeto resultante de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular con la finalidad de tratar, prevenir o mejorar la enfermedad o trastorno.

15 Adicionalmente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular; o daño, con un efecto o un síntoma de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, inflamación y exposición a un agente tóxico, en un sujeto que lo necesite.

**2. Antecedentes de la invención.**

20 El daño tisular puede producirse por una pérdida considerable de tejido debido a lesiones isquémicas, traumáticas, tóxicas o inflamatorias en las que las células del tejido se destruyen por apoptosis o necrosis. El daño tisular puede producirse en diversas enfermedades y afecciones agudas o crónicas. El grado al cual se produce el daño tisular está mediado por muchos factores, incluyendo el tipo de enfermedad o lesión, el nivel de, o la gravedad de, la inflamación o traumatismo asociado con la enfermedad o lesión, la localización del daño tisular y la suficiencia del tejido vascular.

25 Recientes pruebas sugieren que la eritropoyetina (EPO), un miembro de la familia de citocinas de Tipo 1, comúnmente asociado con el mantenimiento del hematocrito, también puede desempeñar una función importante en la atenuación del daño tisular a través de la interacción con su receptor, EPOR (Brines et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(41): 14907-12). Aunque se tiene la hipótesis que la EPO puede proporcionar respuestas compensatorias que sirven para mejorar el medio celular hipóxico y modular la muerte celular programada causada por estrés metabólico, el mecanismo molecular subyacente aún no se ha entendido claramente

30 Basándose en esta observación, los investigadores han explorado el uso de la EPO en diversas indicaciones. Como ejemplo, los investigadores han explorado el uso de la EPO como un posible tratamiento para cánceres basándose en la observación de que la EPO usada para tratar la anemia en pacientes oncológicos no solo corregía la anemia sino que también producía una mejora del bienestar del paciente oncológico (véase la Patente de Estados Unidos N° 6.579.525 y Blau C.A., 2007, *Stem Cells* 25(8): 2094-7). La Patente de Estados Unidos N° 6.579.525 de Haran-Ghera *et al.* se refiere al uso de EPO recombinante para el tratamiento de mieloma múltiple y crea la hipótesis de que la EPO induce una respuesta inmunitaria contra el tumor. Adicionalmente, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11/093.177, publicación n° US 2005/0267027, desvela el uso de EPO para inhibir la angiogénesis en tumores reduciendo la expresión de HIF-1 $\alpha$  y/o VEGF en los tumores.

35 Sin embargo, la EPO como un posible agente protector de tejido adolece de serias desventajas debido a su efecto eritropoyético. En particular con dosificación crónica, tal como se contemplaría en indicaciones tales como cáncer e inflamación, las aplicaciones frecuentes de dosis terapéuticas de EPO pueden aumentar significativamente el hematocrito de un sujeto, lo que puede conducir a hipertensión, convulsiones y trombosis vascular.

40 Además, en relación al cáncer, el potencial de la EPO como un agente terapéutico no se ha demostrado. Se ha determinado que varios tipos de cánceres, tales como los cánceres de mama, expresan y tienden a sobreexpresar, receptores de eritropoyetina. Esto ha llevado a considerar de que el uso terapéutico de la EPO para tratar el cáncer conduciría a un crecimiento adicional del tumor en contra de una regresión del desarrollo del tumor (véase Blau, 2007, citado anteriormente, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/432.899, publicada como US 2005/0260580). Esta consideración se ha confirmado clínicamente con varios ensayos de EPO en varias indicaciones de cáncer que se han detenido debido a un aumento de la mortalidad debido al crecimiento del tumor (Blau). A la luz de estos resultados clínicos adversos la FDA ha incorporado una advertencia de Caja Negra en productos aprobados por la EPO alertando contra su uso en indicaciones no autorizadas para el cáncer.

45 Adicionalmente, la proteína EPO humana madura es una proteína de 165 aminoácidos que tiene un peso molecular de aproximadamente 30,4 kDa medido por espectrometría de masas. La proteína recombinante puede producirse en

células de ovario de hámster Chino en un proceso costoso y laborioso que está muy regulado. Además, la EPO debe conservarse en condiciones rigurosas para mantener su actividad. Dadas estas limitaciones, la EPO no es un candidato ideal para abordar emergencias públicas, tales como liberación de un agente tóxico como radiación o un agente químico, ya sea un accidente industrial o un acto de terrorismo o guerra que requeriría la producción masiva rápida del agente terapéutico de amplia distribución.

Por consiguiente, hay una necesidad de tratamientos protectores de tejido que tengan poco o ningún efecto posiblemente perjudicial y que puedan estar fácilmente disponibles para el público.

### 3. Sumario

La invención se refiere en general a péptidos y a análogos peptídicos aislados que tienen actividad protectora tisular en una célula, tejido u órgano sensible. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido purificado y un transportador farmacéuticamente aceptable, en el que el péptido purificado consta de la secuencia de aminoácidos UEQLERALNSS, en la que U es piroglutamato. El péptido no tiene actividad hematopoyética significativa. El péptido se produce por síntesis química y tiene menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos de los del péptido purificado. La composición farmacéutica tiene actividad protectora tisular en una célula, tejido u órgano sensible, en el que la actividad protectora tisular es proteger, mantener, potenciar o restablecer la función o viabilidad de dicha célula, tejido u órgano.

En otro aspecto, la invención proporciona dicha composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad asociada con daño tisular. En una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular es causada por cáncer, lesiones isquémicas, hipóxicas, traumáticas, tóxicas o inflamatorias. En determinadas realizaciones, la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad cardiovascular, cardiopulmonar, respiratoria, renal, una enfermedad del sistema urinario, del sistema reproductor, una enfermedad ósea, una enfermedad de la piel, gastrointestinal, una anomalía endocrina, metabólica, una disfunción cognitiva o una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central o periférico. En una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central. En otra realización preferida la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso periférico. En otra realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular es disfunción cognitiva. En otra realización adicional preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones inflamatorias. Las lesiones inflamatorias pueden ser por sarcoidosis o las lesiones inflamatorias pueden ser por artritis reumatoide. En una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones isquémicas. En otra realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones hipóxicas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dicha composición farmacéutica para su uso en un método de prevención, tratamiento, mejora o control del cáncer, un trastorno neoplásico, inflamación o exposición a un agente tóxico en un sujeto que lo necesite.

La solicitud desvela adicionalmente péptidos y análogos peptídicos que tienen poco o ningún efecto hematopoyético posiblemente indeseable. En particular, la solicitud describe péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido que comparten secuencias consenso con partes de EPO y ligandos del receptor de citocina de Tipo I. En particular, un péptido o análogo peptídico aislado comprende una secuencia de 9 a 29 restos aminoácídicos que se caracteriza por un motivo estructural núcleo seleccionado de (1) dos aminoácidos con carga negativa y (2) un aminoácido con carga positiva y un aminoácido con carga negativa. Los aminoácidos con carga del núcleo están flanqueados por 7 a 27 aminoácidos como se describe en el presente documento. En algunos casos, los aminoácidos con carga del núcleo están inmediatamente adyacentes entre sí. En algunos casos, los aminoácidos con carga están separados por 1 a 5 aminoácidos o por un solo aminoácido polar.

Los péptidos y análogos peptídicos aislados descritos y reivindicados en el presente documento tienen al menos una actividad protectora tisular. Las actividades protectoras tisulares ejemplares incluyen, pero sin limitación, protección, mantenimiento, potenciación y restablecimiento de la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano sensible de mamífero. Por consiguiente, los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden usarse para la preparación de composiciones farmacéuticas para proteger, mantener, potenciar o restablecer la función o viabilidad de células sensibles de mamífero y sus células, tejidos y órganos asociados. Las composiciones son para administración a un sujeto que lo necesite.

Los péptidos y análogos peptídicos aislados descritos y reivindicados en el presente documento también tiene poca o ninguna actividad eritropoyética, por ejemplo no aumentan significativamente la hemoglobina o hematocrito en un sujeto, o más generalmente tienen poca o ninguna actividad hematopoyética, por ejemplo, no aumentan significativamente los componentes celulares de la sangre tales como células eritroides, linfoides y mieloides. En particular, los péptidos y análogos peptídicos aislados tienen poca o ninguna actividad seleccionada de acción vasoactiva (por ejemplo vasoconstricción); plaquetas hiperactivantes, actividades procoagulantes y estimulación de proliferación o producción de trombocitos o células dependientes eritropoyéticas (véase, Coleman *et al.*, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5965-5970).

- La solicitud también describe composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido y un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, así como métodos para la preparación de dichas composiciones y su uso para tratar enfermedades y trastornos asociados con daño tisular. En particular, la presente solicitud describe métodos de uso de un péptido o análogo peptídico aislado descrito en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la protección contra o la prevención de una lesión tisular sensible, para el reestablecimiento de, o para el rejuvenecimiento de tejido sensible o función tisular sensible en un sujeto que lo necesite. De acuerdo con la solicitud, las células de mamífero sensibles y sus células, tejidos u órganos asociados son distales a la vasculatura en virtud de una barrera celular endotelial hermética. En otro aspecto particular, las células, los tejidos, los órganos u otras partes corporales, tales como los destinados para el trasplante, se aíslan del cuerpo del mamífero. En determinados aspectos de la invención, el tejido excitable es tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, tejido cardiaco o tejido retinal. En otro aspecto, la célula sensible o sus células, tejidos u órganos asociados no son células, tejidos u órganos excitables, ni comprenden células o tejidos predominantemente excitables.
- La solicitud describe adicionalmente un método para la prevención, tratamiento, mejor o control de inflamación, cáncer o trastornos neoplásicos, o exposición a un agente tóxico en un paciente que lo necesite administrando una cantidad eficaz de un péptido.
- También se describen métodos de modulación de la actividad de un mediador de cáncer, de la respuesta corporal contra agentes tóxicos e inflamación. En particular la invención se refiere a la modulación de la actividad de un mediador inflamatorio. Preferentemente, los péptidos descritos y reivindicados en el presente documento pueden modular los efectos de uno o más mediadores inflamatorios.
- La solicitud describe adicionalmente métodos para detener el crecimiento de una célula que comprenden poner en contacto una célula que necesite detener el crecimiento con una cantidad eficaz de un péptido.
- La solicitud describe adicionalmente métodos para producir la muerte de una célula cancerosa neoplásica que comprenden poner en contacto una célula cancerosa o neoplásica con una cantidad eficaz de un péptido.
- La solicitud describe adicionalmente métodos para inhibir la generación de vasos sanguíneos en las células cancerosas o neoplásicas o reducir la producción de moléculas que producen mitosis o angiogénesis.
- La solicitud describe adicionalmente métodos para el tratamiento o prevención de los efectos secundarios asociados con quimioterapia o radioterapia, que comprenden administrar a un paciente, que necesite dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz de un péptido. Los efectos secundarios asociados con la quimioterapia o radioterapia incluyen caquexia, recuento sanguíneo bajo, náuseas, diarrea, lesiones orales y alopecia.
- La solicitud describe adicionalmente métodos para el tratamiento o prevención del cáncer o enfermedad neoplásica en un paciente que comprenden poner en contacto una célula cancerosa o neoplásica con una cantidad eficaz de un péptido.
- La solicitud describe adicionalmente métodos de tratamiento o prevención del cáncer o enfermedad neoplásica en un paciente que comprenden administrar, a un paciente que necesite dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz de un péptido.
- Los péptidos descritos y reivindicados en el presente documento pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento, mejora, o control del cáncer o trastorno neoplásico en un sujeto que lo necesite.
- Los péptidos pueden usarse para el tratamiento o la prevención de los síntomas asociados con inflamación o una afección inflamatoria. Entre las afecciones inflamatorias tratables por el método actual se encuentran las alergias y las enfermedades alérgicas, las enfermedades reumáticas y las lesiones relacionadas con el deporte.
- Los péptidos pueden usarse adicionalmente para el tratamiento, prevención, mejora o control de los efectos de la exposición a un agente tóxico en una persona que necesita el tratamiento. Entre los agentes tóxicos considerados están los agentes biológicos, químicos y radioactivos.
- La solicitud también describe composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos aislados anteriormente mencionados para la administración a un sujeto que lo necesite. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración oral, intranasal, ocular, por inhalación, transdérmica, rectal, sublingual, vaginal o parental, o en forma de una solución perfundida para mantener la viabilidad de células, tejidos u órganos *ex vivo*. El sujeto puede ser un animal mamífero, preferentemente un ser humano.

#### 4. Abreviaturas y terminología

##### 4.1 Abreviaturas

Como se usa en el presente documento, las abreviaturas para los L-aminoácidos enantioméricos codificados genéticamente son convencionales y son las siguientes:

Aminoácido	Símbolo de Una Letra	Abreviatura Común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val
Piroglutamato	U	pGlu(Glp)

5

##### 4.2 Terminología.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el significado normalmente entendido por una persona experta en la materia a la cual pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a los mismos a menos que se especifique de otra manera.

10

(i) Como se usa en el presente documento, cuando los términos “alrededor” o “aproximadamente” se usan junto con un número, se refieren a cualquier número dentro del 1, 5, 10, 15 o 20 % del número al que se hace referencia.

(ii) La expresión “administrado junto con” en el contexto de los métodos de la invención significa administrar un compuesto antes de, al mismo tiempo que, y/o después de, la aparición de una enfermedad, trastorno o afección.

15

(iii) El término “alérgeno” se refiere a una sustancia antigénica capaz de producir una hipersensibilidad de tipo inmediato (alergia). Los alérgenos comunes incluyen, pero sin limitación, bacterias, virus, parásitos animales,

insectos y picaduras de insecto, productos químicos (látex), polvo, ácaros del polvo, mohos, caspa de animales, fármacos (tales como antibióticos, sueros, fármacos basados en sulfamida, anticonvulsivos, preparaciones de insulina, anestésicos locales, yodo y aspirina), alimentos (tales como leche, chocolate, fresas, huevos, soja, nueces, pescado, mariscos, trigo), perfumes, plantas, polen y humo.

5 (iv) La expresión “enfermedad alérgica” se refiere a una afección o enfermedad causada por o relacionada con una alergia. Las enfermedades alérgicas incluyen, pero sin limitación, asma, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, rinitis, rinosinusitis, eccema atópico, dermatitis de contacto, conjuntivitis alérgica (intermitente y persistente), conjuntivitis vernal (fiebre del heno), queratoconjuntivitis atópica, conjuntivitis papilar gigante, urticaria (habones), angioedema, neumonitis por hipersensibilidad, bronquitis eosinófila, vasculitis, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis asociada a anticuerpos contra el citoplasma de neutrófilos (ANCA, por las siglas *antineutrophil cytoplasmic antibody*), granulomatosis de Wegner, vasculitis de Churg Strauss, poliangeítis microscópica, arteritis temporal, enfermedad celiaca, mastocitosis y anafilaxis.

15 (v) La expresión “síntoma alérgico” o “reacción alérgica” se refiere a la respuesta corporal frente a un alérgeno. La reacción alérgica puede localizarse en una zona (piel que se pone en contacto con el alérgeno) o puede ser generalizada. Las reacciones alérgicas pueden incluir, pero sin limitación, erupción cutánea, prurito, habones, hinchazón, dificultad para respirar, sibilancia, angioedema, deglución dificultosa, congestión nasal, moqueo, falta de aliento, náuseas, calambres estomacales, dolor abdominal, vómito y/o presión arterial baja.

(vi) El término “alergia” se refiere a un estado de hipersensibilidad inducido por exposición a un antígeno (alérgeno) particular dando como resultado reacciones inmunológicas nocivas en exposiciones posteriores.

20 (vii) La expresión “aminoácido” o cualquier referencia a un aminoácido específico significa que incluye aminoácidos proteogénicos de origen natural así como aminoácidos de origen no natural tales como análogos de aminoácidos. Los expertos en la técnica sabrán que esta definición incluye, a menos que se especifique de otra manera, (L)-aminoácidos proteogénicos de origen natural, sus (D)-isómeros ópticos, aminoácidos químicamente modificados, incluyendo análogos de aminoácidos tales como penicilamina (3-mercapto-D-valina), aminoácidos no proteogénicos de origen no natural tales como norleucina y aminoácidos químicamente sintetizados que tienen propiedades conocidas en la técnica que son características de un aminoácido. Adicionalmente, la expresión “equivalente de aminoácido” se refiere a compuestos que se apartan de la estructura de los aminoácidos de origen natural, pero que tienen sustancialmente la estructura de un aminoácido, de tal manera que pueden sustituirse en un péptido, que a pesar de la sustitución conserva su actividad biológica. Por tanto, por ejemplo, los equivalentes de aminoácidos pueden incluir aminoácidos que tienen modificaciones o sustituciones en la cadena lateral, y también incluyen ácidos orgánicos relacionados, amidas o similares. La expresión “aminoácido” pretende incluir equivalentes de aminoácidos. El término “restos” se refiere tanto a aminoácidos como a equivalentes de aminoácidos. Los aminoácidos también pueden clasificarse en los siguientes grupos como se sabe normalmente en la técnica: (1) ácidos = Asp, Glu; (2) básicos = Lys, Arg, His; (3) no polares (hidrófobos) = Cys, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp, Gly, Tyr; y (4) polares sin carga = Asn, Gln, Ser, Thr. Los no polares pueden subdividirse en: fuertemente hidrófobos = Ala, Val, Leu, He, Met, Phe; y moderadamente hidrófobos = Gly, Pro, Cys, Tyr, Trp. De manera alternativa, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos = Asp, Glu; (2) básicos = Lys, Arg, His, (3) alifáticos = Gly, Ala, Val, Leu, He, Ser, Thr, opcionalmente con Ser y Thr agrupados por separado como hidroxilo alifáticos; (4) aromáticos = Phe, Tyr, Trp; (5) amida = Asp, Glu; y (6) que contienen azufre = Cys y Met. (Véase, por ejemplo *Biochemistry*, 4ª ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman y Co., 1995.

(viii) La expresión “agente biológico” como se usa en el presente documento se refiere a organismos vivos o a los materiales derivados de los mismos (tales como bacterias, virus, hongos y toxinas) que producen enfermedades en, o que son nocivos para, seres humanos, animales o plantas, o causan deterioro de materiales. Estos agentes biológicos son ubicuos por naturaleza y pueden diseñarse u optimizarse para su uso en armamento o terrorismo (bioterrorismo). Estos agentes biológicos pueden consistir en priones, virus, microorganismos (bacterias y hongos) y algunos eucariotas unicelulares y multicelulares (es decir, parásitos). En particular, los agentes biológicos (identificados por su nombre común, nombre biológico y el código de letras de Referencia Estándar de la OTAN, donde estén disponibles) pueden incluir, pero sin limitación, agentes micóticos (*Coccidioides mycosis*, OC, *Coccidioides posadasii*, *Coccidioides immitis*), agentes bacterianos (ántrax (cutáneo, inhalación, gastrointestinal) (*Bacillus anthracis*, N y TR), peste (bubónica, neumónica) (*Yersinia pestis*, LE), tularemia (*Francisella tularensis*, UL (schu S4), TT (de tipo húmedo), ZZ (de tipo seco) y SR y JT (425)), cólera (*Vibrio cholerae*, HO), brucelosis bovina (AB), brucelosis porcina (US y NX), brucelosis caprina (AM y BX), *Brucella abortus*, *Brucella melitenis*, *Brucella suis*, disentería bacteriana (sigelosis, campilobacteriosis, salmonelosis) (Y), muermo (*Burkholderia mallei*, LA), melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*, HI), difteria (*Corynebacterium diphtheriae*, DK), listeriosis (*Listeria monocytogenes*, TQ)), agentes clamidiales (sitacosis “Fiebre del Loro” (*Chlamydothilla psittici*, SI), agentes rickettsiales (fiebre maculosa de las montañas rocosas (*Rickettsia rickettsii*, RI y UY), fiebre Q (*Coxiella burnetti*, OU, MN (de tipo húmedo) y NT (de tipo seco)), tifus humano (*Rickettsia prowazekii*, YE), tifus murino (*Rickettsia typhi*, AV)), agentes virales (fiebre amarilla (*Arbovirus flaviviridae*, OJ, UT y LU), fiebre del valle de Rift (RVF *Phlebovirus bunyaviridae*, FA), alfavirus (por ejemplo: encefalitis equina oriental (ZX), encefalitis equina occidental, encefalitis equina Venezolana (NU, TD y FX)), viruela (ZL), Encefalitis B Japonesa (AN), herpes virus Cercopitecino 1 (virus del Herpes B), virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, fiebre hemorrágica viral (*Filoviridae* (virus del ébola y de Marburg) y *Arenaviridae* (Lassa y Machupo)), poxvirus de mono, virus gripal Reconstruido en 1918, virus de Fiebre Hemorrágica

- Sudamericana (Flexal, Guanarito, Junin, Machupo, Sabia), virus de la meningoencefalitis transmitida por garrapata (TEBV) (encefalitis Transmitida por Garrapata Central Europea, encefalitis Transmitida por Garrapata de Extremo Oriente, enfermedad de Forest Kyasanur, fiebre Hemorrágica de Omsk, virus Ruso de Primavera y Verano), virus Hendra, virus Nipah, hantavirus (fiebre hemorrágica Coreana), virus de la peste equina Africana, virus optimizado de la fiebre porcina, virus de Akabane, virus de la gripe aviar, virus de lengua azul, poxvirus de camello, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la enfermedad de pie y boca, poxvirus caprino, virus de la dermatosis nodular, virus de la fiebre catarral maligna (herpesvirus Alcelafine de tipo 1), virus de Menangle, virus de la enfermedad de New Castle, virus de la Peste de pequeños rumiantes, virus de la rabia, virus de la peste bovina, poxvirus ovino, virus de la enfermedad vesicular porcina, virus de la somatitis vesicular), toxinas (toxina botulínica (*Clostridium*, X y XR), ricino (*Ricinus communis*, Wy WA), enterotoxina B Estafilocócica (UC y PG), Saxitoxina (envenenamiento paralizante por marisco) (TZ y SS), tetrodotoxina (PP), conotoxinas, toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, micotoxinas de tricoteceno (toxinas T-2), sigatoxina), y simulantes (molasis residuo (MR), *Bacillus globigii* (BG, BS, y U), *Serratia marescens* (SM y P), *Aspergillus fumigatus* mutante C-2 (AF), *E. Coli* (EC), *Bacillus thursidius* (BT), *Erwinia herbicola* (EH), partícula fluorescente (PF)), cornezuelo del arroz, lepra, rabia, fiebre tifoidea intestinal, *Clostridium perfringens* (gangrena gaseosa), aflatoxinas, *Salmonella typhimurium*, enterotoxinas, fiebre hemorrágica Argentina, Tuberculosis resistente a fármacos múltiples (MTB), fiebre hemorrágica Boliviana, legionela neumofilia, toxinas marinas, beriberi, malaria, pelagra, fiebre del dengue, *Sclerotium rolfoi*, encefalitis neurotrófica, Shigella (Y), SEB (UC), y micotoxinas, Diacetoxiscirpenol, *Cowdria ruminantium*, *Mycoplasma capricolum* M.F38/M. *Mycoides capri*, *Mycoplasma mycoides* micoides, abrina. Los agentes biológicos pueden dirigirse contra seres humanos (por ejemplo, viruela, virus del Ébola, virus gripal Reconstruido en 1918, ricino, etc.), contra animales tales como ganado (por ejemplo virus de la peste equina Africana, virus de la fiebre porcina Africana, enfermedad de pie y boca, etc.) o contra ambos (virus de la encefalitis equina Oriental, etc.). Además, incluso los agentes biológicos no letales pueden plantear una amenaza dado que pueden volver a modificarse por ingeniería genética para aumentar la letalidad para su uso como arma biológica. Por tanto incluso los virus responsables del resfriado común pueden plantear un riesgo.
- (ix) El término “cáncer” como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera crecimiento anómalo que presente propiedades cancerosas: la capacidad (1) de crecer y dividirse sin respetar los límites normales, invadir y destruir tejidos adyacentes y (3) en algunos casos, propagarse a otros lugares del organismo. El cáncer incluye cánceres o trastornos neoplásicos del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, sistema gastrointestinal/digestivo, sistema genitourinario, ginecológico, cabeza y cuello, hematológico/sangre, músculo esquelético/tejido blando, respiratorio y mama. Como ejemplos adicionales de cánceres o trastornos neoplásicos se incluyen, pero sin limitación, los del cerebro (astrocitoma, glioblastoma, glioma), médula espinal, glándula pituitaria, mama (cánceres infiltrantes, preinvasivos inflamatorios, enfermedad de Paget, cáncer de mama metastásico y recurrente), sangre (Enfermedad de Hodgkin, Leucemia, Mieloma Múltiple, Linfoma), cáncer de ganglios Linfáticos, Pulmón (Adenocarcinoma, Células de Avena, Celular no microcítico, microcítico, de Células Escamosas, Mesotelioma), piel (melanoma, células basales, células escamosas, Sarcoma de Kaposi), Cáncer Óseo (Sarcoma de Ewings, Osteosarcoma, Condrosarcoma), cabeza y cuello (laríngeo, faríngeo (cavidad nasal y cavidad sinusal) y cánceres esofágicos), oral (cánceres de mandíbula, de glándulas salivares, de garganta, de tiroides, de lengua y de amígdala) ocular, ginecológico (de cuello uterino, Endometrial, Falopiano, de Ovario, Uterino, Vaginal y Vulvar), genitourinario (cánceres de vejiga, riñón, pene, próstata, testicular y urinario), adrenal (adenoma cortical, carcinoma cortical, feocromocitoma) y gastrointestinal (apéndice, conducto biliar (conducto biliar extrahepático), cánceres de colon, vesícula biliar, gástrico, intestinal, hepático, pancreático, rectal, y de estómago) así como los indicados más adelante: (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia); leucemia: leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, eritroleucemia monocítica, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, Policitemia vera, carcinoma Gástrico, Linfoma (maligno y no maligno): enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma Múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada; tumores sólidos, sarcomas y carcinomas: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, Infangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rbdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma oral de células escamosas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares: cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, adenocarcinoma de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, adenocarcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioma maligno, glioblastoma, gliomas astrocíticos multiformes, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma o retinoblastoma.
- (x) La expresión “agente químico”, como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias químicas que causan la muerte o daños graves a personas o animales. En la medida en que el agente químico ha sido optimizado para administrarse utilizando municiones o un dispositivo de dispersión, el agente es un arma química. En general, los agentes químicos usados como armas pueden clasificarse por su método de acción tales como: agentes hematotóxicos, agentes vesicantes, agentes neurotóxicos, agentes pulmonares y agentes incapacitantes. Cada uno

de los agentes químicos a continuación se identifica por su código de letra de Referencia convencional de la OTAN donde esté disponible.

(xi) "Agentes hematotóxicos" se refieren a los agentes químicos que impiden que las células usen el oxígeno. Los agentes químicos dentro de esta categoría incluyen, sin limitación, compuesto de Arsina (adamsite (difencilamincloroarsina), Clark I (difencilcloroarsina), Clark II (difencilcianoarsina)) y Cianuro (cloruro de cianógeno (CK), cianuro de hidrógeno (AC), etc.). Los compuestos de Arsina causan hemólisis intravascular que conduce a disfunción renal. Los compuestos de cianuro impiden a las células usar oxígeno y por tanto las células recurren a la respiración anaerobia creando un exceso de ácido láctico que conduce a la acidosis metabólica. Las víctimas de los agentes hematotóxicos pueden presentar síntomas que incluyen, sin limitación, cefaleas, mareos, náuseas, vómitos, irritación mucosa, disnea, consciencia alterada, coma, convulsiones, taqui- y braqui-disrtrmias, hipotensión, colapso cardiovascular y acianosis.

(A) "Agentes neurotóxicos" se refieren a los agentes químicos que inactivan la enzima acetilcolinesterasa. La acumulación resultante del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis de la víctima conduce a efectos muscarínicos y nicotínicos. Los compuestos dentro de esta categoría incluyen, pero sin limitación, ciclosarina (ciclohexilmetilfosfofluoridato, GF), sarina (isopropil metilfosfanofluoridato, GB), tiosarina, soman (pinacolilmetilfosfanofluoridato, GC), tabún (etil *N,N*-dimetilfosforamidocianidato, GA), VX (O-etil-[s]-[2-diisopropilaminoetil-metilfosfonotiolato), VR (*N,N*-dietil-2-(metil-(2-metilpropoxi)fosforil)sulfaniletanamina), VE (O-etil-S-[2-(dietilamino)etil]fosfonotioato), VG (O,O-dietil-S-[2-(dietilamino)etil]fosforotioato), VM (O-etil-S-[2-(dietilamino)etil]metilfosfonotioato), etil sarina (isopropiletilfosfonofluoridato, GE), EDMP (etil-2-diisopropilaminoetilmetilfosfonato), DF (metilfosfonil difluoruro), Agentes Novichok, fluoruro de GV (*P*-[2-(dimetilamino)etil]-*N,N*-dimetilfosfonamídico), Gd42, Gd83, Ésteres de Tammelin, fluorofosfocolinas, fosfotiocolatos, DFP, e insecticidas (fenotiocinas, órganofosfatos (dichorous, malatión, paratión, fentiión, amidón, paraoxón, cloropirifos, sistox, pirofosfato, TOCP)). Las víctimas de agentes neurotóxicos pueden presentar síntomas que incluyen, pero sin limitación, braquicardia, miosis, exceso de salivación, vómitos, diarrea, micción involuntaria, fasciculación muscular, parálisis flácida desparalizante inicial, descargas y convulsiones repentinas, síndrome intermedio, inhibición de estearasa neurotóxica y neuropatía retardada inducida por órganofosfatos.

(B) "Agentes Vesicantes" se refieren a agentes que son compuestos formadores de ácido que producen daños en el sistema respiratorio y en la piel de la víctima dando produciendo quemaduras y problemas respiratorios. Los agentes químicos dentro de esta categoría incluyen, sin limitación, mostazas de azufre (1,2 bis(2-cloroetil)etano (Sesquimostaza, Q), 1,3 bis(2-cloroetil)-*n*-propano, 1,4-bis(2-cloroetil)-*n*-butano, 1,5-bis(2-cloroetil)-*n*-pentano, 2-cloroetilclorometilsulfida, Bis(2-cloroetil)sulfida (HD), Bis(2-cloroetil)metano, Bis(2-cloroetil)éter, Bis(2-cloroetil)éter, di-2'-cloroetilsulfida y combinaciones de los mismos (HT, HL, HQ)), mostazas de nitrógeno (Bis(2-cloroetil)etilamina (HN1), Bis(2-cloroetil)etilamina (HN2), Tris(2-cloroetil)amina (HN3), clorhidrato de 2-cloro-*N*-(2-cloroetil)-*N*-metiletanamin-*N*-óxido, ciclofosfamida, clorambucilo, uramustina, melfalán, lewisitas (2-clorovinildicloroarsina, Bis(2-clorovinil)cloroarsina, Tris(2-clorovinil)arsina, dicloro(2-clorovinil)arsina), etildicloroarsina, metildicloroarsina, fenildicloroarsina y oxima de fosgeno (dicloroformoxima). Las víctimas de agentes vesicantes pueden presentar síntomas que incluyen, pero sin limitación, eritema, edema, necrosis y vesículas, melanoderma, traqueobronquitis, broncoespasmos, obstrucción bronquial, edema pulmonar hemorrágico, disfunción respiratoria, neumonía bacteriana, eritema ocular, lagrimeo, molestias oculares, dolor ocular grave, blefaroespasmo, iritis, ceguera, náuseas, vómitos, supresión de médula ósea, choque por lewisita, necrosis hepática, y disfunción renal secundaria a hipoperfusión.

(D) "Agentes Pulmonares" se refieren a agentes que son similares a los agentes vesicantes pero que tienen un efecto más pronunciado sobre el sistema respiratorio produciendo encharcamiento del sistema respiratorio y asfixia de la víctima. Los agentes químicos dentro de esta categoría incluyen, pero sin limitación, adamsita, Acroleína, Bis(clorometil)éter, cloro, Cloropicrina, difosfogeno, metil clorosulfato, cloruro estánico, cloruro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno y fosgeno. Las víctimas de agentes pulmonares pueden presentar síntomas que incluyen, pero sin limitación, sensación de quemazón (ojos, nasofaringe, orofaringe), lagrimeo abundante, rinorrea, tos, ronquera, disnea, odinofagia, conjuntivitis, lesión en la córnea, lesión/edema naso-orofaríngeo, distrés respiratorio debido a inflamación de las estructuras glóticas, secreciones, y/o laringoespasmos, síndromes respiratorios agudos y síndrome de disfunción reactiva de las vías respiratorias.

(E) "Agentes incapacitantes" se refieren a agentes que son menos letales y están dirigidos principalmente a incapacitar a través de efectos fisiológicos o mentales o ambos. Una clase común de agentes incapacitantes son los agentes lacrimógenos, agentes químicos que irritan los ojos causando lagrimeo, dolor e incluso ceguera temporal. Los agentes lacrimógenos incluyen, pero sin limitación, *a*-clorotolueno, bromuro de bencilo, Bromoacetona (BA), Bromobencilcianuro (CA), Bromometil etil cetona, Capsaicina (OC), Cloracetofenona (CN), clorometil cloroformiato, Dibenzoxacepina (CR), yodoacetato de Etilo, Orto-clorobencilideno malonotriilo (CS), Triclorometil cloroformiato y bromuro de xililo. Otros agentes incapacitantes incluyen, pero sin limitación, 3-Quinuclidinil bencilato (psicodélico; BZ), ácido hidrocianico (paralítico), difencilcloroarsina (estornudatorio; DA), difencilcianoarsina (DC), KOLOKOL-1 (derivado de fentanilo), Datura stramonium, Hellborne, Belladonna, Hyoscyamus falezlez, indoles (dietilamina del ácido lisérgico (LSD-25)), derivados de la marihuana (DMHP), anfetaminas, cocaína, cafeína, nicotina, estricnina, metrazol, barbitúricos (metohexital), opioides, antipsicóticos (haloperidol), benzodiacepinas, congéneres de fentanilo, silocibina, ibogaina, harmina, éxtasis, PCP, atropina, escopolamina, oxibutinina, ditropán, antihistaminas

anticolinérgicas, benacticina y tranquilizantes.

Muchos de los compuestos químicos indicados anteriormente tienen usos más allá de su uso como armas y se utilizan en la fabricación. Por tanto, la liberación accidental o intencionada de estos agentes químicos de plantas de fabricación o químicas planteará un riesgo a los empleados de la planta así como a las poblaciones que viven cerca de estas plantas. Como ejemplos de productos químicos tóxicos de fabricación industrial se incluyen, sin limitación, amoniaco, arsina, tricloruro de boro, trifluoruro de boro, disulfuro de carbono, cloro, diborano, óxido de etileno, flúor, formaldehído, bromuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno, cianuro de hidrógeno, fluoruro de hidrógeno, sulfuro de hidrógeno, ácido nítrico, fosgeno, tricloruro fosforoso, dióxido de azufre, ácido sulfúrico, hexafluoruro de tungsteno, cianohidrina de acetona, acroleína, acrilotrilo, alilo, alcohol alílico, amina alífica, clorocarbonato alílico, tribromuro de boro, monóxido de carbono, carbonil sulfida, cloroacetona, cloroacetilnitrilo, ácido cloro sulfónico, dicetona, 1,2-dimetil hidracina, dibromuro de etileno, seleniuro de hidrógeno, metano sulfonil cloruro, bromuro de metilo, metil cloroformiato, metil clorosilano, metil hidracina, metil isocianato, metil mercaptano, dióxido de nitrógeno, fosfina, oxicloloro fosforoso, pentafluoruro fosforoso, hexafluoruro de selenio, tetrafluoruro de silicón, estiloína, trióxido de azufre, cloruro de sulfurilo, fluoruro de sulfurilo, hexafluoruro de telurio, *n*-octil mercaptano, tetracloruro de titanio, cloruro de tricloroacetilo, cloruro de trifluoroacetilo, isotiocianato de alilo, tricloruro de arsénico, bromo, cloruro de bromo, pentafluoruro de bromo, trifluoruro de bromo, fluoruro de carbonilo, pentafluoruro de cloro, trifluoruro de cloro, cloroacetildialdehído, cloruro de cloroacetilo, crotonaldehído, cloruro de cianógeno, sulfato de dimetilo, dfenilmetan-4,4'-diisocianato, cloroformiato de etilo, clorotioformiato de etilo, dicloruro de etil fosfonotioico, dicloruro de etil fosfónico, etilenimina, hexaclorociclohexadieno, yoduro de hidrógeno, pentacarbonilo de hierro, isobutil cloroformiato, isopropil cloroformiato, isopropil isocianato, *n*-butil cloroformiato, *n*-butil isocianato, óxido nítrico, *n*-propil cloroformiato, paratión, perclorometil mercaptano, *sec*-butil isocianato, *terc*-butil isocianato, tetraetilo de plomo, tetraetil pirofosfato, tetrametilo de plomo, toluen 2,4-diisocianato y toluen 2,6-diisocianato.

(xi) Como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” incluye la cantidad de un péptido que es suficiente para modular cualquier enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o con el daño, los efectos o síntomas de los mismos, preferentemente para inhibir, suprimir o moderar los efectos perjudiciales de la respuesta del organismo contra la enfermedad o trastorno asociado con la lesión tisular que incluye, sin limitación, la respuesta del organismo contra el cáncer, la inflamación o exposición a agentes tóxicos. Adicionalmente, una “cantidad eficaz” incluye la cantidad del péptido que es suficiente para mitigar, mejorar, disminuir o prevenir cualquier enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o proporcionar un beneficio terapéutico en un paciente que padece una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular.

(xii) Como se usa en el presente documento “actividad eritropoyética” significa cualquier aumento significativo en los niveles de hemoglobina o hematocrito en un sujeto. “Poca o ninguna “actividad eritropoyética” significa que un nivel aumentado de hemoglobina o hematocrito en un sujeto cumple con los criterios aceptados en la técnica como un aumento insuficiente para ocasionar un efecto secundario en un sujeto. “Actividad eritropoyética significativamente aumentada” significa que una diferencia en el nivel de hemoglobina o hematocrito en un sujeto en comparación con un control cumple con los criterios aceptados en la técnica como significativo, que puede, entre otras cosas, aumentar la probabilidad de hipertensión, convulsiones y trombosis vascular.

(xiii) “Tejido excitable” significa tejido que contiene células excitables. Las células excitables son células que responden activamente a un estímulo eléctrico y que tienen un diferencial de carga eléctrica a través de sus membranas celulares. Las células excitadas generalmente pueden experimentar un potencial de acción. Dichas células expresan típicamente canales, tales como canales regulados por voltaje, por ligando y canales expansores, que permiten que el flujo de iones (potasio, sodio, calcio, cloro, etc.) a través de la membrana. El tejido excitable incluye tejido neuronal, tejido muscular y tejido glandular. Los tejidos excitables incluyen, sin limitación, tejidos neuronales tales como tejido del sistema nervioso periférico (oído y retina) y sistema nervioso central (cerebro y médula espinal); tejido cardiovascular tal como las células del corazón y nervios asociados; y tejido glandular tal como el páncreas donde los canales de calcio de tipo T junto con las uniones comunicantes célula a célula participan en la secreción de insulina. Una lista ejemplar de tejidos excitables incluye órganos y tejidos que incluyen nervios, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, útero, sistema nervioso central, médula espinal, cerebro, retina, sistema olfatorio, sistema auditivo, etc.

(xiv) La expresión “actividad hematopoyética” significa cualquier incremento significativo en los componentes celulares sanguíneos, tales como células eritroides, linfoides y mieloides. Además actividad hematopoyética se refiere a si un péptido o análogo peptídico aislado posee actividad seleccionada de acción vasoactiva (por ejemplo, vasoconstricción), plaquetas hiperactivantes, actividades procoagulantes y proliferación o producción estimulante de trombocitos o células dependientes de eritropoyetina.

(xv) La expresión “célula hospedadora” como se usa en el presente documento se refiere a la célula sujeto particular transfectada con una molécula de ácido nucleico y a la progenie o posible progenie de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o a influencias ambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula hospedadora.

(xvi) La expresión “afecciones inflamatorias” como se usa en el presente documento se refiere a diversas

enfermedades o traumatismos, bien mecánica o químicamente inducidos, que tienen un componente inflamatorio. Estas incluyen afecciones que dan lugar a inflamación en uno o más órganos o tejidos, incluyendo, pero sin limitación, el cerebro, la médula espinal, tejido conectivo, corazón, pulmón, riñón, tracto urinario, páncreas, ojos y próstata. Los ejemplos no limitantes de dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, apendicitis, blefaritis, 5 bronquitis, bursitis, cervicitis, colangitis, colecistitis, corioamnionitis, conjuntivitis, cistitis, dacrioadenitis, dermatitis, endocarditis, endometritis, epicondilitis, epididimitis, fibrositis, gastritis, gingivitis, glositis, hidradenitis supurativa, iritis, laringitis, mastitis, miocarditis, miositis, nefritis, onfalitis, ooforitis, orquitis, osteítis, otitis, parotitis, pericarditis, peritonitis, faringitis, pleuritis, flebitis, neumonitis (neumonía), prostatitis, pielonefritis, rinitis, salpingitis, sinusitis, estomatitis, sinovitis, tonsilitis, uveítis, uretritis, vaginitis, vulvitis, asma, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, 10 tendinitis, angiitis, bronquitis crónica, pancreatitis, osteomielitis, artritis (reumatoide y soriásica), glomeronefritis, neuritis óptica, arteritis temporal, encefalitis, meningitis, mielitis transversal, dermatomiositis, polimiositis, fascitis necrotizante, hepatitis, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, ileítis y enteritis), proctitis, vasculitis, estenosis vascular, reestenosis, hipotensión, diabetes de Tipo 1, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Decum, enfermedad pulmonar obstructiva 15 crónica, soriasis, arterosclerosis, escleroderma, síndrome de Sjogren, enfermedad de tejido conectivo mixta, rosácea, úlceras gástricas, úlceras duodenales, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Still de aparición en adultos, epitelitis pigmentaria retinal aguda, síndrome de Tietze, enfermedad de Bechçet, síndrome de manchas blancas (epiteliopatía pigmentaria placode multifocal posterior aguda, coroiditis serpigínea, coriorretinopatía de Birdshot, coroiditis multifocal con panuveítis, síndrome de fibrosis subretinal difusa, coroidopatía interna punctata, 20 síndrome de múltiples manchas blancas evanescentes y neurorretinitis subaguda unilateral difusa), granuloma anular, síndrome del intestino irritable, gastroenteritis, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple, contractura de Dupuytren, enfermedades por rechazo de injerto (incluyendo rechazo de aloinjerto y enfermedad de injerto contra huesped), por ejemplo rechazo de injerto de piel, rechazo de trasplante de órgano sólido, rechazo de trasplante de médula ósea, dermatosis inflamatoria, patologías cutáneas virales tales como las derivadas del virus del papiloma humano, VIH o infección por RLV, patologías cutáneas bacterianas, fúngicas y u otras parasitarias, lupus 25 eritematoso cutáneo y enfermedad de Híper IgG4. Además “afección inflamatoria” puede referirse a inflamación resultante de afecciones isquémicas o no isquémicas, incluyendo, pero sin limitación, traumatismo roto, contusiones, alergias y enfermedades alérgicas, enfermedad reumática (artritis juvenil, artritis reumatoide, síndrome de Churg-Strauss, fibromialgia, arteritis de células gigantes (temporal), gota, púrpura de Henoch-Schoenlin, vasculitis por hipersensibilidad, espondilitis anquilosante, capsulitis, fiebre reumática, cardiopatía reumática, lupus 30 eritematoso sistémico, polimialgia reumática, osteoartritis (mano, cadera, rodilla, etc.), poliarteritis nodosa, síndrome de Reiter), lesiones relacionadas con el deporte (rodilla de corredor, codo de tenista, hombro congelado, tendinitis de Aquiles, fascitis plantar, bursitis, enfermedad de Osgood-Schlatter), lesiones por estrés repetitivo (enfermedades por traumatismo acumulado, distonía focal, síndrome del túnel carpiano, síndrome de intersección, síndrome de distrofia simpática refleja, tenosinovitis estenosante (síndrome De Quervain, dedo en gatillo/pulgar en gatillo), síndrome del opérculo torácico, tendinitis, tenosinovitis, síndrome del túnel radial, enfermedad de Raynaud, ganglión, pulgar de jugador, Wii-itis, etc.), infecciones que incluyen infecciones virales, fúngicas y bacterianas. La “afección inflamatoria” puede ser aguda o crónica.

(xvii) Un péptido “aislado” o “purificado” carece sustancialmente de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la cual procede la proteína o el péptido, o carece sustancialmente de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “carece sustancialmente de material celular” incluye preparaciones de un péptido en las que el péptido se separa de los componentes de las células de las que se aísla o produce de manera recombinante. Por tanto, un péptido que carece sustancialmente de material celular que incluye preparaciones de péptidos que tienen menos de 45 aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (denominada también en el presente documento “proteína contaminante”). Cuando el péptido se produce de manera recombinante, este también carece de modo preferente sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína. Cuando el péptido se produce por síntesis química, este carece de modo preferente sustancialmente de precursores químicos o de otros productos 50 químicos, es decir, está separado de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente dichas preparaciones del péptido tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del péptido de interés. Preferentemente, los péptidos de la invención están aislados o purificados.

(xviii) Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede carecer sustancialmente de otro material celular, o medio de cultivo, cuando se produce por técnicas recombinantes, o carecer sustancialmente de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En un caso específico, una molécula (o moléculas) de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención está aislada o purificada.

(xix) Como se usa en el presente documento, el término “gestión” incluye proporcionar uno o más efectos secundarios beneficiosos que un paciente recibe de un péptido que, en una realización, no invierte el daño, los efectos o los síntomas de una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular. En determinados casos, a un paciente se le administra un péptido para “gestionar” los síntomas de una enfermedad o trastorno asociado con daño

tisular para impedir el avance o empeoramiento de los síntomas.

(xx) Los términos “modular”, “modulaciones” y similares se refieren a la capacidad de un compuesto para aumentar o disminuir la función y/o expresión de mediadores de la respuesta corporal contra una enfermedad o un trastorno asociado con lesión tisular, incluyendo la transcripción de la actividad reguladora y/o unión con proteínas. Modulación, como se describe en el presente documento, incluye la inhibición, el antagonismo, el antagonismo parcial, la activación, el agonismo o agonismo parcial de una función o característica asociada con el mediador, bien directa o indirectamente, y/o la regulación positiva o negativa de la expresión del mediador. Preferentemente, la modulación es directa, y más preferentemente la modulación se produce a través de un inhibidor o antagonista del mediador, un compuesto que se une a, bloquea parcial o totalmente la estimulación, disminuye, impide, inhibe, retrasa la activación, inactiva, desensibiliza, o regula negativamente las señales de transducción. La capacidad de un péptido particular útil en el método de la presente invención para inhibir la función de un mediador puede demostrarse en un ensayo bioquímico, por ejemplo, un ensayo de unión, un ensayo basado en células, por ejemplo, un ensayo de transfección transitoria, o en ensayos *in vivo*, por ejemplo, en modelos animales de lesión neuronal, cáncer, inflamación, o lesión química o por radiación, tal como en un modelo de rata o murino.

(xxi) Como se usa en el presente documento en referencia a una estructura dentro de un péptido, el término “motivo” se refiere bien a un conjunto de aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica y/o a un conjunto de aminoácidos lineal o espacialmente adyacentes dentro de la estructura secundaria y/o terciaria de dicho péptido. Dado que el motivo puede formarse en su totalidad o en parte como resultado del plegamiento de la proteína, los aminoácidos que son adyacentes en el motivo descrito pueden estar separados por 0, 1 o más, 5 o más, 10 o más, 15 o más o 20 o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos lineal del péptido.

(xxii) Como se usa en el presente documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y proteína se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a secuencias de aminoácidos restringidas (es decir, que tienen algún elemento de estructura como, por ejemplo, la presencia de aminoácidos que inician un giro  $\beta$  o lámina  $\beta$  plegada, o por ejemplo, se ciclan debido a la presencia de restos de Cys unidos por disulfuro) o secuencias de aminoácidos no restringidas (por ejemplo, lineales). El péptido puede constar de menos de 30 aminoácidos. Sin embargo, después de la lectura de la presente divulgación, el experto en la técnica reconocerá que no es la longitud de un péptido particular lo que distingue a los péptidos útiles en el método de la presente invención, sino su capacidad para unirse a un complejo receptor protector de tejido y/o competir por la unión de un péptido descrito en el presente documento. Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” también se refieren a compuestos que contienen equivalentes de aminoácidos u otros grupos que no son aminoácidos, conservando aún al mismo tiempo la actividad funcional deseada de un péptido o proteína. Los equivalentes peptídicos pueden diferenciarse de los péptidos convencionales por el reemplazo de uno o más aminoácidos con ácidos orgánicos relacionados (tales como PABA), equivalentes de aminoácidos o similares o la sustitución o modificación de cadenas laterales o grupos funcionales.

(xxiii) La expresión “prevención de daños, efectos o síntomas de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular” significa retrasar la aparición, obstaculizar el progreso, obstaculizar la presencia, protección contra, inhibir o eliminar la emergencia o reducir la frecuencia, de dichos daños, efectos o síntomas. El uso del término “prevención” no significa que implique que todos los pacientes en una población de pacientes a los que se administra una terapia preventiva nunca se verán afectados por, o desarrollarán síntomas en respuesta a, la enfermedad o trastorno asociado con el daño tisular destinado para la prevención, sino que la población de pacientes mostrará una reducción en los daños, efectos o síntomas de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, muchas vacunas gripales no son eficaces al 100 % para prevenir la gripe en aquellas personas a las que se administra la vacuna. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente pacientes y situaciones en las cuales sería beneficiosa la terapia preventiva, tales como, pero sin limitación, individuos que desempeñan actividades que pueden exponerlos a diversos agentes tóxicos o traumatismos (por ejemplo soldados que participan en operaciones militares, trabajadores de la industria química o alimentaria, personal de urgencias o de primeros auxilios, etc.), o individuos que pueden estar sometidos a exposición a un agente tóxico (por ejemplo, individuos que viven cerca de instalaciones químicas, nucleares o fábricas, o individuos bajo amenaza de ataque militar o terrorista).

(xxiv) Como se usa en el presente documento, una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un péptido que es suficiente para dar como resultado la prevención del daño, efectos o síntomas resultantes de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de un péptido que es suficiente para prevenir el daño, los efectos o los síntomas resultantes de una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular. Además, una cantidad profilácticamente eficaz con respecto a otro agente profiláctico significa que la cantidad de ese agente profiláctico en combinación con un péptido proporciona un beneficio profiláctico en la prevención del daño, efectos o síntomas resultantes de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular. Usado junto con una cantidad de un péptido, la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” puede incluir una cantidad que mejore la profilaxis o potencie la eficacia profiláctica global de, o proporcione un efecto sinérgico, con otro agente profiláctico.

(xxv) El término “neoplasma” se refiere a crecimientos anómalos que carecen de las propiedades cancerígenas de los tumores cancerosos, y son generalmente tumores leves y no progresivos. Los neoplasmas incluyen, pero sin limitación, lunares, fibromas uterinos, adenomas tiroideos, adenomas adrenocorticales, adenomas pituitarios y

teratomas.

(xxvi) La expresión “agente de radiación” como se usa en el presente documento significa cualquier material radioactivo que pueda destruir o herir a un sujeto, y puede usarse para producir disturbios en una ciudad o nación. La exposición a un agente de radiación puede producirse a través de la implementación de un arma (bomba nuclear, bomba de fisión, fusión, de neutrones, de fisión incrementada o de sal), proyectiles que contienen uranio empobrecido), dispositivos terroristas (“bomba sucia”), o consecuencias resultantes de la detonación de un arma nuclear o fallos de una planta nuclear. Los agentes radioactivos pueden incluir, pero sin limitación, <sup>137</sup>Cs, <sup>60</sup>Co, <sup>241</sup>Am, <sup>252</sup>Cf, <sup>192</sup>Ir, <sup>238</sup>Pu, <sup>90</sup>Sr, <sup>226</sup>Ra, <sup>91</sup>Sr, <sup>92</sup>Sr, <sup>95</sup>Zr, <sup>99</sup>Mo, <sup>106</sup>Ru, <sup>131</sup>Sb, <sup>132</sup>Te, <sup>139</sup>Te, <sup>140</sup>Ba, <sup>141</sup>La, <sup>144</sup>Ce, <sup>233</sup>U, <sup>235</sup>U, <sup>238</sup>U, <sup>228</sup>P, <sup>229</sup>P, <sup>230</sup>P, <sup>231</sup>P, <sup>232</sup>P, <sup>233</sup>P, <sup>234</sup>P, <sup>235</sup>P, <sup>236</sup>P, <sup>237</sup>P, <sup>238</sup>P, <sup>239</sup>P, <sup>240</sup>P, <sup>241</sup>P, <sup>242</sup>P, <sup>243</sup>P, <sup>244</sup>P, <sup>245</sup>P, <sup>246</sup>P, <sup>247</sup>P y <sup>131</sup>I.

La exposición a agentes radioactivos puede dar como resultado carcinogénesis, esterilización, formación de cataratas, radiodermatitis, quemaduras beta, quemaduras gamma, pérdida de células (en particular células de la médula ósea, del tracto digestivo), daños en el sistema hematopoyético, gastrointestinal, sistema nervioso central, cardiovascular, piel y/o sistema reproductor, síndrome por radiación aguda, síndrome por radiación crónica, síndrome por radiación cutánea. El síndrome por radiación aguda generalmente resulta de grandes dosis de radiación en el cuerpo de un sujeto que se producen en un corto periodo de tiempo. El síndrome tiene un curso predecible que comienza con una sensación de náuseas, vómitos, malestar general y fatiga, depresión del sistema inmunitario, pérdida de cabello, sangrado incontrolable (boca, debajo de la piel, riñones), diarrea masiva, delirio, coma y muerte. El síndrome por radiación cutánea es un subconjunto de síndromes por radiación aguda y se refiere a efectos de radiación en la piel, que incluyen, sin limitación, inflamación, eritema, descamación seca o húmeda, pérdida de cabello, formación de ampollas, enrojecimiento, ulceración, daños a las glándulas sebáceas y sudoríparas, atrofia, fibrosis, disminución o aumento de la pigmentación de la piel y necrosis.

(xxvii) Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto”, “paciente” y “víctima” se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferentemente a un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata y un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, un simio, o un ser humano) y más preferentemente un ser humano.

(xxviii) Como se usa en el presente documento, la expresión “síndromes asociados con neoplasmas o cánceres” se refiere a síndromes resultantes de la acción directa de los tumores a través del “efecto masa” (compresión de órganos vitales debido al tumor) o “tumores funcionales” (sobrepresión de hormonas por órganos afligidos con tumores). Dichos síndromes incluyen, pero sin limitación, síndrome de Beckwith-Wiedmann, síndrome de SBLA, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Poliposis Adenomatosa Familiar (síndrome de Gardner), Cáncer Colorrectal No polipósico Hereditario, síndrome de Turcot, síndrome de Cowden, síndrome de Carney Triad, síndromes de Neoplasia Endocrina Múltiple (Wermer (MEN-1), Sipple (MEN-2a, MEN-2b), síndrome de Von Hippel-Lindau, síndrome de Cushing, síndrome de Addison, síndrome de Verner Morrison, síndrome de Zollinger-Ellison, síndrome de WDHA, Cólera Pancreático, síndrome de Isaac, síndrome muscular de Rippling, síndrome de Stiffman, Ataxia Paraneoplásica, síndrome de Yo, síndrome de Tr, síndrome de Hu, síndrome CV-2, síndromes de CRMP-5, Opsoclono/Mioclono, síndromes de Ma, corea fibrilar de Morvan, síndrome de Bannayan-Riley-Runalcaba, síndrome de Peutz-Jegher, síndrome de Muir-Torre, enfermedad de Hirschsprung, síndrome de Lynch, síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Miastenia Gravis, Neuromiotonía, Degeneración Cerebelar Paraneoplásica, Encefalitis Límbica Paraneoplásica, síndrome de Sweets, síndrome de Birt-Hogg-Dube, síndrome del Carcinoma Nevoide Basocelular, síndrome Folicular Basaloide Generalizado, síndrome de Hamartoma, síndrome de Bazex, síndrome de Brooke Spiegler, Cilindromatosis Familiar, Tricoepitelioma Múltiple Familiar, síndrome de Privación de Andrógenos, síndrome Mielodisplásico Relacionado con Terapia, síndrome de Somnolencia, síndrome de Gulf War y síndrome de Somatostatina.

(xxvix) Como se usa en el presente documento, la expresión “actividad protectora tisular” o “protección de tejidos” se refiere al efecto de inhibir o retrasar el daño o la muerte de una célula, tejido u órgano. Salvo que se indique lo contrario, el “retraso” en el daño o muerte de una célula, tejido u órgano se evalúa con respecto a una afección de control en ausencia de un péptido de la invención. La actividad protectora tisular es específica de los tejidos, células y/u órganos que expresan un complejo receptor protector tisular (es decir, un tejido, célula y/u órgano sensible, respectivamente), tales como, pero sin limitación, los tejidos del sistema nervioso central. En casos específicos, las células sensibles no son células progenitoras eritrocitarias.

(xxx) La expresión “complejo receptor protector tisular” como se usa en el presente documento significa un complejo que comprende al menos una subunidad receptora de eritropoyetina y al menos una subunidad receptora beta común. El complejo receptor protector tisular puede contener subunidades receptoras de eritropoyetina múltiples y/o subunidades receptoras beta comunes, así como otros tipos de receptores o proteínas. Véase el documento WO 2004/096148.

(xxxi) La expresión “agente tóxico” como se usa en el presente documento se refiere a los agentes biológicos, químicos y radioactivos mencionados anteriormente.

(xxxii) Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. Después, se comparan los restos aminoacídicos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoacídico que

la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones solapantes idénticas x 100/número total de posiciones). En un caso, las dos secuencias tienen la misma longitud. Como alternativa, las secuencias son de diferente longitud y, por consiguiente, el porcentaje de identidad se refiere a una comparación de la secuencia más corta con una parte de la secuencia más larga, donde dicha parte tiene la misma longitud que dicha secuencia más corta.

(xxxiii) Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la eliminación, reducción, gestión o control de daños, efectos o síntomas resultantes de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o con daños, efectos o síntomas de los mismos.

## 5. Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** es un gráfico relativo a la proliferación de células UT-7 EPO en presencia de EPO o Péptido ID. Como se muestra en el gráfico, la EPO conduce a una proliferación de las células UT-7 EPO mientras que el Péptido ID en todas las dosis no da como resultado la proliferación de las células, demostrando que el Péptido ID no es eritropoyético.

La **FIGURA 2** es un cuadro gráfico que indica la concentración de hemoglobina en ratas Sprague Dawley a las que se administra el Péptido ID dos veces al día i.v. durante un periodo de 28 días. Como se muestra en el gráfico, la concentración de hemoglobina de las ratas que no recibieron péptido fue la misma que la de las que recibieron Péptido ID, demostrando por tanto que el Péptido ID no es eritropoyético.

La **FIGURA 3** es una serie de gráficos de barra que ilustran (a) la concentración de hemoglobina, (b) el hematocrito y (c) el recuento de plaquetas en muestras sanguíneas extraídas de Conejos Blancos de Nueva Zelanda a los que se administraron diversas dosis de Péptido ID dos veces al día i.v. durante un periodo de 28 días. Como se muestra en los gráficos, la administración del Péptido ID, en todas las dosis, no tuvo ningún efecto sobre la concentración de hemoglobina, hematocrito o recuento de plaquetas de los animales.

La **FIGURA 4** es un gráfico de barras que indica la supervivencia relativa de neuronas motoras sometidas a ácido kaínico. Como se muestra en el gráfico, las células previamente tratadas con Péptido B o con EPO presentaron mejores índices de supervivencia.

La **FIGURA 5** es un cuadro gráfico que ilustra las puntuaciones De Ryck de ratas sometidas a un ensayo de fallo de apoyo de pata después de oclusión de la arteria cerebral media y tratamiento con solución salina, Péptido ID o Péptido IX. Como se muestra en el cuadro gráfico, el Péptido ID mejoró significativamente el comportamiento de las ratas en el protocolo de fallo de apoyo de pata ( $11,2 \pm 1,1$  fallos de apoyo de pata) en comparación con las ratas tratadas con solución salina ( $20,2 \pm 0,8$  fallos de apoyo de pata) y ratas tratadas con el Péptido IX ( $20,1 \pm 2,1$  fallos de apoyo de pata).

La **FIGURA 6** es una serie de gráficos en relación con la concentración de creatinina (Gráfico A), urea (Gráfico B), y aspartato aminotransferasa (AST) (Gráfico C) en el suero de ratones que se habían sometido a 30 minutos de isquemia renal bilateral seguido de un periodo de 24 horas de reperfusión y que recibieron un control (PBS), 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 1 minuto en reperfusión, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 30 minutos en reperfusión, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 6 horas en reperfusión, o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 6 horas en reperfusión. Como se muestra en cada gráfico, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 6 horas en reperfusión o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID a 6 horas en reperfusión produjo una reducción en estos marcadores bioquímicos de disfunción renal.

La **FIGURA 7** es una serie de gráficos en relación con la concentración de creatinina (Gráfico A), urea (Gráfico B), y aspartato aminotransferasa (AST) (Gráfico C) en el suero de ratones que se habían sometido a 30 minutos de isquemia renal bilateral seguido de un periodo de 24 horas de reperfusión y que recibieron dosis múltiples de un control (PBS), 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID, a 1 minuto, 6 horas y 12 horas en reperfusión. Como se muestra en cada gráfico, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de Péptido ID produjo una reducción en estos marcadores bioquímicos de disfunción renal.

La **FIGURA 8** es un cuadro gráfico que ilustra la reducción en el área de la herida durante un periodo de tratamiento en un ensayo de herida de espesor completo por biopsia con sacabocados en ratas que reciben diariamente Péptido ID (24 nmol/kg de pc) por vía s.c. Como se muestra en el cuadro gráfico, las heridas en las ratas que reciben el Péptido ID curan más rápidamente.

La **FIGURA 9** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de reconocimiento de objetos nuevos realizado en ratas Wistar adultas que reciben solución salina, galantamina, como control positivo (3 mg/kg de pc), o Péptido ID (24 nmol/kg de pc) a diversos momentos. Como se muestra en el gráfico, la galantamina y el Péptido ID aumentaron en las ratas el reconocimiento de los nuevos objetos.

La **FIGURA 10** es un gráfico que compara el volumen de orina producido por las ratas tratadas con cisplatino, cisplatino y Péptido IC o control (PBS). El gráfico ilustra que el volumen de orina de las ratas tratadas con cisplatino

y Péptido IC era sustancialmente igual al del grupo tratado con control (PBS). Por tanto el gráfico demuestra que en un modelo de neuropatía inducida por cisplatino en ratas, el Péptido IC administrado tres veces a la semana a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  durante un periodo de 5 semanas protegió a las ratas tratadas contra el daño renal debido al cisplatino.

5 La **FIGURA 11** es un gráfico que compara el tiempo que tarda una rata en retirar la pata de una placa caliente en ratas tratadas con cisplatino, cisplatino con Péptido IC o control (PBS). El gráfico ilustra que el tiempo que tardan las ratas tratadas con cisplatino y Péptido IC en retirar sus patas de la placa caliente era sustancialmente similar al del grupo de control (PBS). Por tanto el gráfico demuestra que en un modelo de neuropatía inducida por cisplatino en ratas, el Péptido IC administrado tres veces a la semana a una dosis de 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  durante un periodo de 5 semanas  
10 protegió a las ratas tratadas contra neuropatía periférica debida al cisplatino.

La **FIGURA 12** es un gráfico que compara el volumen relativo de un tumor cortical implantado en el cerebro de una rata de acuerdo con el protocolo de Lampson L. A. et al., 193, Cancer Res. 53(1): 176-82, después de 25 días. El gráfico muestra que el volumen relativo de los tumores en las ratas tratadas con solución salina aumentó a un valor ligeramente mayor de 0,4  $\text{cm}^2$  mientras que las ratas tratadas con Péptido ID después del implante no mostraron  
15 aumento en el volumen relativo del tumor.

La **FIGURA 13** es un gráfico que compara el volumen relativo de un tumor cortical implantado en el cerebro de una rata de acuerdo con el protocolo de Lampson L. A. et al., 193, Cancer Res. 53(1): 176-82, después de 25 días. El gráfico muestra que el volumen relativo de los tumores en las ratas tratadas con solución salina comenzando dos semanas después del implante es aproximadamente 300  $\text{mm}^2$  mayor mientras que el tratamiento con el Péptido ID y Péptido IW (un péptido con semivida prolongada) comenzando dos semanas después el implante, redujo el tamaño  
20 del tumor en ambos casos. La administración del Péptido IW a las dos semanas dio como resultado una reducción en el tamaño del tumor equivalente a la obtenida por tratamiento inmediato con el Péptido ID.

La **FIGURA 14** es una comparación de tamaño de tumor cortical en ratas tratadas con solución salina diariamente, con Péptido ID o Péptido IW después de un retraso de dos semanas. Las áreas oscuras de la fotografía ilustran la presencia del tumor. Las fotos comparativas demuestran claramente que la administración del Péptido IW después de dos semanas condujo a una reducción en el tamaño del tumor similar a la de la administración del Péptido ID  
25 inmediateamente después del implante del tumor.

La **FIGURA 15** muestra la diferencia en el grosor de oreja en las orejas de ratas Sprague Dawley a las que se inyecta por vía intradérmica difosfato de histamina. Las ratas se trataron con Péptido ID por vía intravenosa o con solución salina. Las orejas de las ratas tratadas con Péptido ID, mostraron menos inflamación en respuesta a la  
30 exposición a histamina en comparación con las orejas de las ratas tratadas con solución salina.

La **FIGURA 16** es un cuadro gráfico que demuestra la diferencia en el tamaño de la roncha (habón) en los abdómenes de ratas en respuesta a la histamina administrada por vía intradérmica en aquellas ratas previamente tratadas con solución salina y previamente tratadas con Péptido ID. El cuadro gráfico ilustra los efectos  
35 antiinflamatorios del Péptido ID hasta 24 horas después de la inyección de histamina.

La **FIGURA 17** es un cuadro gráfico que demuestra la diferencia en el área de la roncha (habón) en respuesta a exposición a histamina en ratas entre las ratas tratadas con EPO y las ratas tratadas con solución salina. El área de la roncha después de quince (15) minutos fue menor en las ratas tratadas con EPO en comparación con las tratadas con solución salina.

40 La **FIGURA 18** es un cuadro gráfico que compara la diferencia en el tamaño de la roncha (habón) (área de la lesión) en ratas expuestas a histamina y tratadas usando solución salina, Péptido IY, Péptido ID y Péptido IW. Los animales tratados con Péptido ID o Péptido IW presentaron casi la mitad del área de lesión (aproximadamente ,35  $\text{cm}^2$  y ,3  $\text{cm}^2$  respectivamente) de las lesiones en los animales tratados con solución salina y Péptido IY (aproximadamente ,6  $\text{cm}^2$ ).

45 La **FIGURA 19** es un cuadro gráfico que compara la diferencia en el tamaño de la roncha (habón) (área de lesión) en ratas expuestas a histamina y tratadas solución salina, Péptido JA, Péptido IW, Péptido IZ y Péptido ID. Los animales tratados con Péptido IW, IZ, o ID presentaron un área de lesión más pequeña (0,3  $\text{cm}^2$ , 0,35 $\text{cm}^2$  y 0,4  $\text{cm}^2$  respectivamente) en comparación con los animales tratados con solución salina y Péptido JA (ambos aproximadamente de 0,6  $\text{cm}^2$ ).

50 La **FIGURA 20** es un cuadro gráfico que compara la diferencia en el tamaño (área) de la herida (úlceras) en ratas sometidas a una úlcera por presión y tratadas usando solución salina, Péptido ID administrado dos veces al día, Péptido ID administrado diariamente o EPO administrada diariamente. El cuadro gráfico demuestra que las ratas tratadas con Péptido ID y EPO presentaban mejor cicatrización que las ratas tratadas con solución salina. Los animales tratados diariamente con el Péptido ID tenían un tamaño de herida más pequeño.

55 La **FIGURA 21** muestra Curvas de Supervivencia de Kaplan Meier de ratones irradiados con 796cGy (A) o 831 cGy (B) y después tratados con Péptido ID por vía subcutánea diariamente durante 29 días después de irradiación o con PBS por vía subcutánea durante 29 días. A ambas dosis de radiación, el Péptido ID aumentó significativamente el

tiempo de supervivencia global de los ratones el día 30 (45 % de supervivencia el día 30 a 796cGy, 20 % de supervivencia el día 30 a 831cGy).

La **FIGURA 22** es un cuadro gráfico que muestra el índice de supervivencia de ratones que recibieron irradiación corporal parcial de 15Gy y que después se trataron con el Péptido ID el día 1 y diariamente después o con PBS el día uno y diariamente después. Como muestra el cuadro gráfico, el número de ratones que sobreviven el día 20 fue sustancialmente mayor entre los que recibieron el Péptido ID en comparación con los que recibieron PBS (6 ratones tratados con Péptido frente a 1 ratón tratado con PBS).

## 6. Descripción detallada de la invención

### 6.1 Polipéptidos aislados

La presente invención se refiere en líneas generales a la modulación de los efectos de la respuesta del organismo a una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular, a la prevención, tratamiento, mejora o gestión de daños, efectos o síntomas en un paciente que padece una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular usando un péptido que procede de la eritropoyetina o de otra citocina de Tipo 1. Preferentemente, el péptido usado en el método actual es protector, neuroprotector, neuritogénico o anti-apoptótico tisular.

Por consiguiente la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido purificado y un transportador farmacéuticamente eficaz, en la que el péptido purificado consta de la secuencia de aminoácidos UEQLERALNSS, en la que U es piroglutamato. El péptido no tiene actividad hematopoyética significativa. El péptido se produce por síntesis química y tiene menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos de los del péptido purificado. La composición farmacéutica tiene actividad protectora tisular en una célula, tejido u órgano sensible, en el que la actividad protectora tisular es la protección, mantenimiento, potenciación o restablecimiento de la función o viabilidad de dicha célula, tejido u órgano.

En otro aspecto, la invención proporciona dicha composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad asociada con daño tisular. En una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por cáncer, lesiones isquémicas, hipóxicas, traumáticas, tóxicas o inflamatorias. En determinadas realizaciones, la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad cardiovascular, cardiopulmonar, respiratoria, renal, del sistema urinario, del sistema reproductor, ósea, de la piel, gastrointestinal, una anomalía endocrina, metabólica, una disfunción cognitiva, o una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central o periférico. E una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central. En otra realización preferida la enfermedad asociada con daño tisular en una enfermedad o trastorno del sistema nervioso periférico. En otra realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular es disfunción cognitiva. En otra realización aún preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones inflamatorias. Las lesiones inflamatorias pueden ser por sarcoidosis o lesiones inflamatorias o pueden ser por artritis reumatoide. En una realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones isquémicas. En otra realización preferida, la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones hipóxicas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona dicha composición farmacéutica para su uso en un método de prevención, tratamiento, mejora o gestión del cáncer, un trastorno neoplásico, inflamación, o exposición a un agente tóxico en un sujeto que lo necesite.

La solicitud también desvela otros péptidos que tienen actividad protectora tisular y que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades asociadas con daño tisular.

Diversos péptidos derivados de citocinas de Tipo 1, tales como EPO, se han desvelado en la técnica, tales como: (a) y (b) Brines et al. en el documento PCT/US2006/031061, publicado como documento WO 2007/019545, y las Solicitudes de Patente de Estados Unidos: "Tissue Protective Peptides and Peptide Analogs for Preventing and Treating Diseases and Disorders Associated with Tissue Damage," n° de serie 61/062,012, presentada el 22 de enero del 2008; "EPO-derived Tissue Protective Peptides and Peptide Analogs for Preventing and Treating Disorders Associated with Tissue Damage," n° de serie 61/062,022, presentada el 22 de enero del 2008; y "Method of Treating Inflammation or Inflammatory Conditions and Symptoms Thereof with Peptides," n° de serie 61/133,912, presentada el 3 de julio del 2008 ("Brines"); (c) Bock et al. en la Solicitud PCT N° DK2006/000246 publicada como WO 2006/119767 y WO 2007/071248 ("Bock"); (d) O'Brien et al. en las Patentes de Estados Unidos N° 5.571.787, 5.700.909, 5.696.080, 5.714.459, 6.590.074, 6.559.124, 6.271.196, 6.268.347 y 6.849.602 ("O'Brien"); (e) Smith-Swintowsky et al. en la Patente de Estados Unidos N° 7.259.146 y en la Publicación de Estados Unidos N° 20030130197 ("Smith-Swintowsky") y (f) Yuan et al. en el documento PCT/IB2006/003581 publicado como WO/2007/052154 ("Yuan").

Con el fin de analizar los motivos anteriores, se acepta la estructura tridimensional de la EPO como describen Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5; 861-866 (también disponible como datos depositados en el Banco de Datos de Proteínas del National Center for Biotechnology Information como entrada "IBUY").

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos útiles para la modulación de la respuesta corporal contra una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular y/o útiles en la prevención, tratamiento, mejora y gestión de daños, efectos o síntomas en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular tienen un motivo basado en fragmentos de la secuencia de aminoácidos de EPO, derivada de la estructura tridimensional de la proteína EPO, y en particular, derivada de aquellas regiones de EPO orientadas lejos de los sitios de unión a ligando y/o a la parte interna del homodímero de EPOR. Estos fragmentos derivan de las siguientes estructuras de EPO: (1) bucle AB y parte N terminal de la hélice B (Péptido A: NITVPDTKVNFYAWKRMEVG, correspondiente a los aminoácidos 38-57 de la EPO); (2) parte C terminal de la hélice B (Péptido B: QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la EPO y (3) una parte del bucle A-B que consta de un pequeño bucle de cisteína y una lámina  $\beta$  plegada (Péptido C: GCAEHCSLNENITVPDTKVN, correspondiente a los aminoácidos 28-47 de la EPO). Específicamente estos motivos pueden ser:

(a) Motivo estructural A.

En este motivo estructural, el péptido útil para la prevención, tratamiento, mejora o gestión de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos posee dos aminoácidos con carga negativa, que pueden estar separados mediante hasta 5 aminoácidos, flanqueados por aminoácidos hidrófobos. Estructuralmente esto puede representarse como  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , en la que  $n$  es 0-5; o como alternativa como:

(a1) HNNH;

(a2) HNXNH;

(a3) HNXXNH;

(a4) HNXXXNH;

(a5) HNXXXXNH; o

(a6) HNXXXXXNH,

en la que H representa aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, aminoácidos moderadamente hidrófobos: Gly (G), Pro (P), Cys (C), Tyr (Y) y Trp (W), y preferentemente los aminoácidos altamente hidrófobos: Ala (A), Val (V), Ile (I), Met (M), Leu (L), Phe (F)), N representa un aminoácido con carga negativa tal como Glu (E) o Asp (D), y X representa cualquier aminoácido, aunque preferentemente es uno hidrófilo.

Se desvela una variación de este motivo estructural, estructuralmente representado como  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , en la que  $n$  es 0-5, o  $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ , en la que  $n$  es 0-5, en la que uno de los aminoácidos hidrófobos flanqueantes se ha remplazado con un aminoácido polar tal como Ser (S), Thr (T), Asn (N) o Gln (Q).

Los ejemplos de este motivo son:

Péptido D APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE;

Péptido A NITVPDTKVNFYAWKRMEVG; y

Péptido B QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV.

En un ejemplo particular del Motivo Estructural A, una clase de péptidos y análogos peptídicos aislados útil para la prevención, tratamiento, mejora, control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular, o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos puede tener la Fórmula I estructural:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-(Z)_n-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}$

en la que:

$X_1$  es Cys (C) o Pro (P);

$X_2$  es Asp (D) o Pro (P);

$X_3$  es Ser (S) o Arg (R);

$X_4$  es Arg (R) o Leu (L);

$X_5$  es Val (V) o Ile (I);

$X_6$  es Leu (L) o Cys (C);

$X_7$  es Glu (E) o Asp (D);

X<sub>8</sub> es Arg (R) o Ser (S);

X<sub>9</sub> es Tyr (Y) o Arg (R);

X<sub>10</sub> es Leu (L) o Val (V);

X<sub>11</sub> es Leu (L) o Ala (A);

5 X<sub>12</sub> es un aminoácido con carga negativa;

(Z)<sub>n</sub> es un aminoácido, en el que n es 1-5;

X<sub>13</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>14</sub> es Ala (A) o Leu (L);

X<sub>15</sub> es Glu (E) o Lys (K);

10 X<sub>16</sub> es Asn (N), Glu (E), o Lys (K);

X<sub>17</sub> es Ila (I) o Ala (A);

X<sub>18</sub> es Thr (T), Glu (E), o Gly (G);

X<sub>19</sub> es Thr (T), Asn (N), o Ala (A);

X<sub>20</sub> es Gly (G) o Ile (I);

15 X<sub>21</sub> es Cys (C) o Thr (T);

X<sub>22</sub> es Ala (A) o Thr (T);

X<sub>23</sub> es Glu (E) o Gly (G);

X<sub>24</sub> es Hes (H) o Cys (C).

20 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula I pueden no incluir el Péptido D, APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE; el Péptido A, NITVPDTKVNFYAWKRMEVG; el Péptido B, QQAVEVWQCLALLSEAVLRQALLV, el Péptido C, GCAEHCSLNENITVPDTKVN o Péptido E, RYLLEAKEAENITTGC.

25 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 24 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula I estructural contienen tan solo 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y las propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructura I.

30 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural I, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos polares, cargados negativa y positivamente, e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

35 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula I también pueden extenderse a uno o ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula I.

40 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula I pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de un modo significativo, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula I en la que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados constan de la secuencia de aminoácidos:

Péptido F CDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEH;

Péptido G PPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGC;

y

Péptido H ADRELEKIGA.

(b) Motivo estructural B.

En este motivo estructural, el péptido tiene un aminoácido positivo cerca de un aminoácido negativo y ambos aminoácidos cargados están flanqueados aminoácidos hidrófobos sencillos. Estructuralmente esto puede representarse como:

5 (b1) HNPH; o

(b2) HPNH,

en la que P representa aminoácidos con carga positiva, tales como arginina, lisina o histidina y N representa los aminoácidos con carga negativa, glutamato o aspartato.

10 En una variación de este motivo particular, los aminoácidos negativos y positivos pueden estar separados por un aminoácido polar, por ejemplo,

(b3) HNLPH;

(b4) HPLNH,

15 en la que L representa un aminoácido polar tal como serina, treonina, asparagina o glutamina. Como alternativa, los motivos estructurales anteriores pueden representarse como  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , en la que  $n$  es 0-1, o  $H_1-P_1-(L)_n-N-H_2$ , en la que  $n$  también es 0-1. Un ejemplo de este motivo es el péptido C (GCAEHCSLNENITVPDTKVN).

El Motivo Estructural B de los péptidos y análogos peptídicos aislados desvelados a continuación en las Fórmulas II - IV pueden no incluir el Péptido D, APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE; Péptido A, NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG; Péptido B, QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, Péptido C, GCAEHCSLNENITVPDTKVN o Péptido E, RYLLEAKEAENITTGC.

20 En un ejemplo particular de Motivo Estructural B, una clase de los péptidos y análogos peptídicos aislados útil para la prevención, tratamiento, mejora, control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, puede comprender de 10 a 28 restos aminoacídicos consecutivos, que tiene la Fórmula estructural II:

$$X_1- X_2- X_3- X_4- X_5- X_6- X_7- X_8- X_9- X_{10}- X_{11}- X_{12}- X_{13}- X_{14}- X_{15}- X_{16}-X_{17}- X_{18}- X_{19}- X_{20}- X_{21}- X_{22}- X_{23}- X_{24}$$

25 en la que:

$X_1$  es Ser (S);

$X_2$  es Arg (R);

$X_3$  es Val (V);

$X_4$  es Leu (L);

30  $X_5$  es Glu (E);

$X_6$  es Arg (R);

$X_7$  es Tyr (Y);

$X_8$  es Leu (L);

$X_9$  es Leu (L);

35  $X_{10}$  es Glu (E);

$X_{11}$  es Ala (A);

$X_{12}$  es un aminoácido con carga positiva;

$X_{13}$  es aminoácido con carga negativa;

$X_{14}$  es Ala (A);

40  $X_{15}$  es Glu (E);

X<sub>16</sub> es Asn (N);

X<sub>17</sub> es Ile (I);

X<sub>18</sub> es Thr (T);

X<sub>19</sub> es Thr (T);

5 X<sub>20</sub> es Gly (G);

X<sub>21</sub> es Cys (C);

X<sub>22</sub> es Ala (A);

X<sub>23</sub> es Glu (E);

X<sub>24</sub> es Hes (H).

10 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 24 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural II contienen tan solo 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural II.

15 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural II, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos con carga negativa y positiva e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

20 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula II también pueden extenderse a uno o ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, la estructura y/o propiedades funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos contienen hasta 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula II.

25 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula II pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula II en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera  
30 conservativa.

En casos específicos, el péptido o análogo peptídico aislado consta de la secuencia de aminoácidos:

Péptido I SRVLERYLLEAKEAENITGCAEH

35 En un ejemplo adicional de Motivo Estructural B, una clase de los péptidos y análogos peptídicos aislados útil para la prevención, tratamiento, mejora, control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular, o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, tiene la Fórmula estructural III:

X<sub>1</sub>- X<sub>2</sub>- X<sub>3</sub>- X<sub>4</sub>- X<sub>5</sub>- X<sub>6</sub>- X<sub>7</sub>- X<sub>8</sub>- X<sub>9</sub>- X<sub>10</sub>- X<sub>11</sub>- X<sub>12</sub>- X<sub>13</sub>- X<sub>14</sub>- X<sub>15</sub>- X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>- X<sub>18</sub>- X<sub>19</sub>- X<sub>20</sub>- X<sub>21</sub>- X<sub>22</sub>- X<sub>23</sub>- X<sub>24</sub>

en el que:

X<sub>1</sub> es Pro (P), Lys (K), o Ser (S);

X<sub>2</sub> es Pro (P), Glu (E), o Gln (Q);

40 X<sub>3</sub> es Arg (R), Ala (A), o Pro (P);

X<sub>4</sub> es Leu (L), Glu (E), o Trp (W);

X<sub>5</sub> es Ile (I), Asn (N), o Glu (E);

X<sub>6</sub> es Cys (C), Ile (I), o Pro (P);

X<sub>7</sub> es Asp (D), Thr (T), Leu (L), o Ala (A);

45 X<sub>8</sub> es Ser (S), Thr (T), Gln (Q), o Asp (D);

X<sub>9</sub> es Arg (R), Gly (G), o Leu (L);

X<sub>10</sub> es Val (V), Cys (C), Hes (H), o Glu (E);

X<sub>11</sub> es Leu (L), Ala (A), Val (V);

X<sub>12</sub> es un aminoácido con carga negativa;

5 X<sub>13</sub> es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>14</sub> es Tyr (Y), Cys (C), Ala (A), o Ile (I);

X<sub>15</sub> es Leu (L), Ser (S), Val (V), o Gly (G);

X<sub>16</sub> es Leu (L), Ser (S), o Ala (A);

X<sub>17</sub> es Glu (E), Asn (N), o Gly (G);

10 X<sub>18</sub> es Ala (A), Glu (E), o Leu (L);

X<sub>19</sub> es Lys (K), Asn (N), o Arg (R);

X<sub>20</sub> es Glu (E), He (I), o Ser (S);

X<sub>21</sub> es Ala (A), Thr (T), o Leu (L);

X<sub>22</sub> es Glu (E), Val (V), o Thr (T);

15 X<sub>23</sub> es Asn (N), Pro (P), o Thr (T);

X<sub>24</sub> es Ile (I), Asp (D), o Leu (L).

20 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 24 restos aminoacídicos. De hecho, las formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula III estructural contienen tan solo 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y las propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural III.

25 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural III, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos con carga negativa y positiva e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

30 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula III también pueden extenderse a uno o a ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula III.

35 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula III pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula III en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

40 En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados se seleccionan del grupo de péptidos expuesto a continuación:

Péptido J PPRLICDSRVLERYLLEAKEAENI;

Péptido K KEAENITGCAEHCSLNENITVPD;

Péptido L SQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL;

y

Péptido H ADRELEKIGA.

En otro ejemplo adicional del Motivo Estructural B, una clase de los péptidos y análogos peptídicos aislados útil para la prevención, tratamiento, mejora, gestión de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, los péptidos y análogos peptídicos aislados tiene la Fórmula estructural IV:

5 X<sub>1</sub>- X<sub>2</sub>- X<sub>3</sub>- X<sub>4</sub>- X<sub>5</sub>- X<sub>6</sub>- X<sub>7</sub>- X<sub>8</sub>- X<sub>9</sub>- X<sub>10</sub>- X<sub>11</sub>- X<sub>12</sub>- X<sub>13</sub>- X<sub>14</sub>- X<sub>15</sub>- X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub>- X<sub>18</sub>- X<sub>19</sub>- X<sub>20</sub>- X<sub>21</sub>- X<sub>22</sub>- X<sub>23</sub>- X<sub>24</sub>-X<sub>25</sub>

en la que:

X<sub>1</sub> es His (H);

X<sub>2</sub> es Cys (C);

X<sub>3</sub> es Ser (S);

10 X<sub>4</sub> es Leu (L);

X<sub>5</sub> es Ala (A) o Asn (N);

X<sub>6</sub> es Pro (P) o Glu (E);

X<sub>7</sub> es Pro (P) o Asn (N);

X<sub>8</sub> es Arg (R) o Ile (I);

15 X<sub>9</sub> es Leu (L) o Thr (T);

X<sub>10</sub> es Ile (I) o Val (V);

X<sub>11</sub> es Cys (C) o Pro (P);

X<sub>12</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>13</sub> es un aminoácido polar;

20 X<sub>14</sub> es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>15</sub> es Val (V);

X<sub>16</sub> es Leu (L) o Asn (N);

X<sub>17</sub> es Glu (E) o Phe (F);

X<sub>18</sub> es Arg (R) o Tyr (Y);

25 X<sub>19</sub> es Tyr (Y) o Ala (A);

X<sub>20</sub> es Leu (L) o Trp (W);

X<sub>21</sub> es Leu (L) o Lys (K);

X<sub>22</sub> es Glu (E) o Arg (R);

X<sub>23</sub> es Ala (A) o Met (M);

30 X<sub>24</sub> es Lys (K) o Glu (E);

X<sub>25</sub> es Glu (E) o Val (V).

Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 25 restos aminoacídicos. De hecho, las formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural IV contienen tan solo 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural IV.

35

Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural IV, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos polares, con carga negativa y positiva, e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

40

Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula IV también pueden extenderse a uno o a ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula IV.

Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula IV pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de modo significativo, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula IV en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa

En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados se seleccionan del grupo de péptidos expuesto a continuación:

Péptido M APPRLICDSRVLERYLLEAKE;

y

Péptido N HCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEV.

Un experto en la técnica reconocería la importancia de lo que anteriormente se ha señalado para los motivos estructurales A y B. Por tanto un experto en la técnica reconocería que los péptidos aislados pueden tener un porcentaje de identidad de secuencia menor que 90 %, menor que 85 %, menor que 80 %, menor que 75 %, menor que 70 %, menor que 65 %, menor que 60 %, menor que 55 %, menor que 50 %, menor que 45 %, menor que 40 %, menor que 35 %, menor que 30 %, o menor que 20 % con cualquier parte de la secuencia de aminoácidos de la EPO humana madura, en el que dicha parte de EPO contiene el mismo número de restos aminoacídicos que dicho péptido.

Los solicitantes proponen adicionalmente que la actividad protectora tisular de los motivos estructurales A y B se deben a una configuración de carga apropiada, espacialmente compacta, generada por los motivos. La proximidad de estas cargas puede producirse mediante la estructura lineal impuesta por enlaces peptídicos, es decir, la estructura puede formarse por aminoácidos consecutivos en una cadena polipeptídica, o como alternativa, la proximidad también puede producirse mediante una relación espacial entre diferentes partes de la molécula EPO (u otras moléculas de citocina de Tipo 1 relacionadas) conferida por la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína, es decir, la estructura tridimensional. Sin desear ligarse a ninguna teoría específica, los solicitantes piensan que, en general, este requisito dictamina que un péptido protector tisular tendrá una estructura terciaria distinta (por ejemplo hélices y láminas plegadas) que proporciona la localización espacial necesaria del par de aminoácidos con carga (es decir, los dos aminoácidos con carga negativa y/o el aminoácido con carga positiva y negativa). Una excepción simple es un polipéptido lineal en el que el par de aminoácidos está inmediatamente adyacente entre sí, con la rigidez requerida conferida por la estructura peptídica. Por consiguiente, el motivo estructural A, abarca una secuencia lineal de restos aminoacídicos, por ejemplo, H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, o una secuencia lineal de restos aminoacídicos en la que N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> están separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos intervinientes, por ejemplo H-N-X-X-X-X-N-H.

Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, los solicitantes piensan que para la protección tisular, el par de aminoácidos cargados en el péptido debe estar orientado espacialmente de tal manera que los carbonos carbamilo tengan una separación de aproximadamente 3 Angstrom (Å) a aproximadamente 5 Å, preferentemente una separación de aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å, y más preferentemente una separación de aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å. Esto puede realizarse de diversas maneras, por ejemplo, mediante aminoácidos cargados adyacentes en un péptido lineal simple, o para péptidos que pueden formar una hélice alfa, aminoácidos cargados separados por un resto aminoacídico interviniente. Debe observarse que la estructura terciaria (por ejemplo, una hélice alfa en péptidos anfipáticos) también puede impartirse cuando el péptido está dentro de un microentorno específico, tal como la interfaz de la membrana de la superficie celular-extracelular (véase, Segrest, 1990, Proteins 8: 103-117).

Además, la actividad protectora tisular se predice para péptidos que contienen pares de aminoácidos cargados de tal manera que las cadenas laterales cargadas (positiva y negativa o dos negativas) están espacialmente confinadas en el interior entre sí de aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å. Esto puede proporcionarse en una hélice alfa estando separando el par cargado mediante uno o dos aminoácidos, que harán que las cargas estén más o menos en el mismo lado de la hélice con la separación necesaria de aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å. Un experto en la técnica puede diseñar una estructura terciaria para el péptido que se requiere generalmente para obtener la localización tridimensional apropiada de los aminoácidos cargados, así como el diseño de moléculas pequeñas que imiten la separación de carga en el péptido.

Las distancias espaciales entre los carbonos carbamilo de cualquiera de dos aminoácidos o entre las cadenas laterales de cualquiera de dos aminoácidos pueden deducirse por cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento. Por ejemplo, cuando se conoce la estructura tridimensional de la proteína, la separación de carga de dos cadenas laterales o la distancia espacial entre dos carbonos carbamilo dentro de una parte de interés de dicha proteína puede calcularse basándose en las coordenadas tridimensionales publicadas, o de otra manera, aceptadas en la técnica, de los restos aminoácidos en dicha parte de interés. Cuando la estructura tridimensional de la proteína y, por lo tanto, la parte de interés se desconoce, o cuando se construye un péptido completamente sintético basándose en las enseñanzas del presente documento, cuya estructura tridimensional se desconoce, la separación de carga de dos cadenas laterales o la distancia espacial entre los dos carbonos carbamilo dentro de dicho péptido puede calcularse usando la estructura tridimensional predicha por el programa informático de modelación de proteínas conocido en la técnica. Son ejemplos no limitantes de dichos programas informáticos MOE™ de Chemical Computing Group (Quebec, Canadá) y Modeler de Accelrys (San Diego, California). De manera similar dicho programa informático predictivo, disponible también en las compañías mencionadas indicadas anteriormente, también se conoce en la técnica para el diseño de pequeñas moléculas y, por consiguiente, un experto en la técnica, basándose en las enseñanzas del presente documento, sería capaz de fabricar moléculas pequeñas que emulen los motivos estructurales desvelados.

#### c. Motivo estructural C.

Otro motivo estructural presentado por los péptidos útiles para la prevención, tratamiento, mejora y control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos es:

20  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$

en el que  $X_1$  es un resto aminoácido cargado,  $X_6$  es un resto aminoácido hidrófobo o A, y  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  y  $X_5$  es cualquier resto aminoácido.

Además de la presencia del resto cargado en la posición  $X_1$  del motivo, preferentemente el resto con carga negativa, y un resto aminoácido hidrófobo en la posición  $X_6$ , preferentemente Leu (L), Val (V) o Tyr (Y), la secuencia puede comprender adicionalmente i) una Ser (S) en la posición  $X_2$  y/o ii) un resto hidrófobo en la posición  $X_3$  del motivo. Los ejemplos de dichos motivos preferidos pueden ser las secuencias (i) R-S- $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ -L y (ii) R-V- $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ -A, R-V-L- $X_4$ - $X_5$ -Y, K-A-V- $X_4$ - $X_5$ -L, R-X2-L- $X_4$ - $X_5$ -L, o R-S-L- $X_4$ - $X_5$ -L. Incluso, Ser (S) o Thr (T) está, en algunos casos preferidos, en la posición  $X_4$  independientemente de la presencia de un resto hidrófobo en la posición  $X_2$  y/o  $X_3$ .

30 Un grupo de péptidos útiles en la prevención, tratamiento, mejora o control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos que presentan el Motivo Estructural C es:

Péptido O DSRVLERYLLEAKE;

Péptido P NENITVPDTKVNIFYAWKR;

Péptido Q QLHVDKAVSGLRSLTLLRA; y

Péptido R RVYSNFLRGKLYTGEA.

#### d. Motivo estructural D.

Un motivo adicional para los péptidos útiles en la prevención, tratamiento, mejora o control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, se basa en una secuencia consenso peptídica neurotrófica encontrada en diversas citocinas neutróficas y hematopoyéticas que estimularán tanto el crecimiento neurítico e imitarán la actividad de la prosaposina. Esta secuencia consenso que deriva de una comparación del péptido activo de 22 unidades monoméricas derivado de la saposina C tiene la secuencia de aminoácidos CEFLVKEVTKLIDNNKTEKEIL y un péptido CNTF de 20 unidades monoméricas con la secuencia de aminoácidos YVKHQGLNKNINLDSVDGVP con diversas secuencias reveladas de citocinas y factores de crecimiento similares a EPO.

La secuencia consenso es:

$A(X)_nN(X)_oN(X)_pB(X)_qC$ ,

en la que N es Asp (N), A es una Leu (L) o Ile (I), X es independientemente cualquier aminoácido, n es 2-3, o es 0-1, p es 1-7, B es uno o más aminoácidos cargados (Asp (D), Lys (K), Glu (E), o Arg (R)), q es 4-7 y C es uno o más aminoácidos hidrófobos (Ala (A), Leu (L), Ile (I) o Val (V)), en la que C es los 6-10 aminoácidos del segundo resto de asparagina. Un ejemplo de un péptido que presenta el Motivo Estructural D es el Péptido U: AEHCSLNENITVPDTKU derivado del bucle AB de EPO. Una secuencia adicional de acuerdo con el Motivo Estructural D es LIRX<sub>1</sub>NNX<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>3</sub>X<sub>1</sub>X<sub>1</sub> en la que  $X_1$  es cualquier aminoácido,  $X_2$  es cualquier aminoácido excepto Leu (L) o Arg (R),  $X_3$  es un aminoácido cargado y  $X_4$ , cuando está presente, es un aminoácido cargado.

## e. Motivo estructural E.

Adicionalmente, los péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos núcleo de  $X_3 - X_4 - X_5 - G - F - X_6 - T - W - X_7 - X_8$  en la que  $X_3$  puede ser Cys (C), Glu (E), Ala (A), ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -bromobutírico u Hoc, en la que Hoc es homocisteína;  $X_4$  puede ser Arg (R), His (H), Tyr (Y), Leu (L) o Trp (W) o  $X_4$  es un enlace;  $X_5$  puede ser Met (M), Phe (F) o Ile (I);  $X_6$  es independientemente uno cualquiera de los 20 L aminoácidos codificados genéticamente o los D-aminoácidos estereoisoméricos;  $X_7$  puede ser Asp (D), Glu (E), Ile(I), Leu (L) o Val (V); y  $X_8$  puede ser Cys (C), Lys (K), Ala (A), ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -bromobutírico u Hoc, en la que Hoc es homocisteína, a condición de que bien  $X_3$  o  $X_8$  sea Cys (C) u Hoc sean útiles en la prevención, tratamiento, mejora o gestión de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos. Una variación del motivo en el que la unidad peptídica monomérica del dímero o multímero comprende una secuencia núcleo  $YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8$  en la que  $X_2$  y  $X_6$  se selecciona independientemente de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente,  $X_3$  puede ser Cys (C), Glu (E), Ala (A), ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -bromobutírico u Hoc, en el que Hoc es homocisteína;  $X_4$  puede ser Arg (R), His (H), Tyr (Y), Leu (L) o Trp (W), o  $X_4$  es un enlace;  $X_5$  puede ser Met (M), Phe (F) o Ile (I);  $X_7$  puede ser Asp (D), Glu (E), Ile (I), Leu (L) o Val (V); y  $X_8$  puede ser Cys (C), Lys (K), Ala (A), ácido  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -bromobutírico u Hoc, en el que Hoc es homocisteína. Más preferentemente, bien  $X_3$  o  $X_8$  es Cys (C) u Hoc. Se desvela una variación adicional del motivo en la que la unidad peptídica monomérica del dímero o multímero comprende una secuencia núcleo de aminoácidos  $YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8$ , en la que cada uno de  $X_2$  y  $X_6$  es independientemente uno cualquiera de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente;  $X_3$  es Cys (C); y  $X_2$  es Cys (C). Se desvela otra variación del motivo en la que la unidad peptídica monomérica del dímero comprende una secuencia núcleo de aminoácidos  $X_1YX_2X_3X_4X_5GPX_6TWX_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en la que cada uno de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_6$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  se selecciona independientemente de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente. Particularmente,  $X_3$  puede ser Cys (C), Glu (E), Ala (A);  $X_4$  puede ser Arg (R), His (H) o Tyr (Y), o  $X_4$  es un enlace;  $X_5$  puede ser Met (M), Phe (F), o Ile (I);  $X_7$  puede ser Asp (D) o Val (V); y  $X_8$  puede ser Cys (C), Lys (K), o Ala (A). En otra variación del motivo, tanto  $X_3$  como  $X_8$  son Cys (C) y por tanto, la unidad peptídica monomérica del dímero comprende una secuencia núcleo de aminoácidos  $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ . El motivo también puede ser una secuencia núcleo de aminoácidos  $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ , en la que  $X_4$  puede ser Arg (R) o His (H);  $X_5$  puede ser Phe (F) o Met (M);  $X_6$  puede ser Ile (I), Leu (L), Thr (T), Met (M) o Val (V);  $X_7$  es Asp (D) o Val (V);  $X_9$  puede ser Gly (G), Lys (K), Leu (L), Gln (Q), Arg (R), Ser (S) o Thr (T); y  $X_{10}$  puede ser Ala (A), Gly (G), Pro (P), Arg (R) o Tyr (Y). O el motivo puede comprender una secuencia núcleo de aminoácidos  $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ , en la que  $X_1$  puede ser Asp (D), Glu (E), Leu (L), Asn (N), Ser (S), Thr (T) o Val (V);  $X_2$  puede ser Ala (A), His (H), Lys (K), Leu (L), Met (M), Ser (S) o Thr (T);  $X_4$  es Arg (R) o His (H);  $X_9$  puede ser Lys (K), Arg(R), Ser (S) o Thr (T); y  $X_{10}$  es Pro (P). Como alternativa, el motivo comprenderá una secuencia núcleo de aminoácidos  $X_1YX_2CX_4X_5GPX_6TWX_7CX_9X_{10}X_{11}$ , en la que  $X_1$  puede ser Asp (D), Glu (E), Leu (L), Asn (N), Ser (S), Thr (T) o Val (V);  $X_2$  puede ser Ala (A), His (H), Lys (K), Leu (L), Met (M), Ser (S) o Thr (T);  $X_4$  es Arg (R) o His (H);  $X_9$  puede ser Lys (K), Arg (R), Ser (S) o Thr (T); y  $X_{10}$  es Pro (P).

Los péptidos particulares de acuerdo con el Motivo Estructural E que son útiles en la prevención, tratamiento, mejora y control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son:

Péptido S	GGLYLGRFGPVTWDCGYKGG
Péptido T	GGTYSCHFGPLTWCKPQGG
Péptido U	GGDYHCRMGPLTWCKPLGG
Péptido V	VGNYMCHFGPITWVCRPGGG
Péptido W	GGVYACRMGPITWVCSPLGG
Péptido X	VGNYMAHMGPIWVCRPGG
Péptido Y	GGTYSCHFGPLTWCKPQ
Péptido Z	GGLYACHMGPMTWVQPLRG
Péptido AA	TIAQYICYMGPETWECRPSKA
Péptido AB	YSCHFGPLTWCK
Péptido AC	YCHFGPLTWVCK
Péptido AD	SCHFGPLTWVCK
Péptido AE	GGTASCHFGPLTWCKPQGG
Péptido AF	GGTYSCHFAPLWVCKPQGG

Péptido AG	GGTYS CFGPLTWVCKPQGG
Péptido AH	TYSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido AI	TYSCHFGPLTWVCKPQ
Péptido AJ	YSCHFGPLTWVCKP
Péptido AK	YSCHFGPLTWVC
Péptido AL	YSCHFGALTWVCK
Péptido AM	GGCRIGPITWVCGG
Péptido AN	HFGPLTWV
Péptido AO	GGTTSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido AP	GGTFSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido AQ	GGTYSCHFGALTWVCKPQGG
Péptido AR	GGTYSCHFGPATWVCKPQGG
Péptido AS	GGTYSCHFGPLAWVCKPQGG
Péptido AT	GGTYSCHFGPLTAVCKPQGG
Péptido AU	GGTYSCHFGPLTFVCKPQGG
Péptido AV	GGTYSCHFGPLTWVCKAQGG
Péptido AW	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido AX	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido AY	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG; (X = p-NH <sub>2</sub> -Phe)
Péptido AZ	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG; (X = p-F-Phe)
Péptido BA	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG; (X = p-I-Phe)
Péptido BB	GGTXSCHFGPLTWVCKPQGG; (X = 3,5-dibromo-Tyr)
Péptido BC	Ac-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG
Péptido BD	GGLYACHMGPMTWVCQPLGG
Péptido BE	LGRKYSCHFGPLTWVCQPAKKD; y
Péptido BF	GGTYSEHFGPLTWVKKPQGG.

f. Motivo estructural F.

También se contemplan otros péptidos derivados del bucle AB de EPO. Este péptido de bucle AB puede adicionalmente estabilizarse químicamente añadiendo una molécula bicíclica pequeña en al menos uno del extremo N terminal o extremo C terminal de la secuencia de aminoácidos del péptido.

- 5 Los péptidos particulares de acuerdo con el Motivo Estructural F que son útiles en la prevención, tratamiento, mejora y control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son:

Péptido BG	D-biotina-AEHCSLNENITVPDTKV;
Péptido BH	D-Biotina-AEHCSLNENITVP;
Péptido BI	AEHCSLNENITVPDTKK-biotina; y
Péptido BJ	AEHCSLNENITVP-D-biotina.

Además, los péptidos pueden estabilizarse mediante un enlace disulfuro formado entre un grupo sulfhidrilo de un primer resto aminoacídico y un grupo sulfhidrilo de un segundo resto aminoacídico a lo largo de la secuencia

5 peptídica. Un ejemplo particular del péptido tiene al menos 6 aminoácidos que tienen la secuencia peptídica XAEHYS, en la que X es un primer resto aminoacídico que contiene un grupo sulfhidrilo e Y es un segundo resto aminoacídico que contiene un grupo sulfhidrilo, y en el que el grupo sulfhidrilo del primer resto aminoacídico está a una distancia apropiada del grupo sulfhidrilo del segundo resto aminoacídico para formar el enlace disulfuro con el grupo sulfhidrilo del segundo resto aminoacídico dentro de la secuencia peptídica, estabilizando por tanto el péptido (Fórmula I).

Los péptidos particulares de acuerdo con el Motivo Estructural F, Fórmula I, que son útiles en la prevención, tratamiento, mejora y control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son:

Péptido BK TTGCAEHCSLNENITVPDTK;

Péptido BL CAEHCSLNENITVPDTKV;

Péptido BM CAEHCS;

Péptido BN GCAEHCSL;

Péptido BO GCAEHCSLNENITVPDTKV;

Péptido BP CAEHCSLNENITVP;

Péptido BQ TTGCAEHCSLNENITVPDTKV;

Péptido BR TTGCAEHCSLNENITVP; y

Péptido BS CAEHCSLNKNINLDSVDGVP

10 Como alternativa, el péptido derivado de EPO aislado estabilizado mediante enlace disulfuro se estabiliza además añadiendo químicamente una molécula bicíclica pequeña en al menos uno de los extremos N terminal y/o C terminal de la secuencia de aminoácidos del péptido.

15 El péptido también puede mostrar el siguiente motivo de al menos 7 aminoácidos que tienen la secuencia peptídica XAEHYS, en la que X es un primer resto aminoacídico que contiene un grupo sulfhidrilo e Y es un segundo resto aminoacídico que contiene un grupo sulfhidrilo, y en el que el grupo sulfhidrilo del primer resto aminoacídico está a una distancia apropiada del grupo sulfhidrilo del segundo resto aminoacídico para formar el enlace disulfuro con el grupo sulfhidrilo del segundo resto aminoacídico en la secuencia peptídica, estabilizando por tanto el péptido (Fórmula II).

20 Los péptidos particulares de acuerdo con el Motivo Estructural F, Fórmula II, que son útiles en la prevención, tratamiento, mejora y control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son:

Péptido BT AEHCSLMENNLRRPNL; y

Péptido BU D-Biotina-AEHCSLMENNLRRPNL.

G. Otros péptidos EPO derivados de EPO.

25 Además de los péptidos de EPO indicados anteriormente y motivos derivados de EPO, los péptidos, fragmentos o miméticos de EPO desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.106.954, 5.952.293, 6.004.758, 6.346.390, 6.932.968, 5.835.382, 7.037.902, 7.084.245 y 7.272.508; Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20050191301; documento WO2005/021579; Skelton et al. "Amino Acid Determinants of Beta-hairpin Confirmation in Erythropoietin Receptor Agonist Péptidos Derived From A Phage Display Library," Journal of Molecular Biology Vol. 316, Issue 8,  
30 2002, páginas 1111-1125; Livnah et al., Functional Mimcry of a Protein Hormone by a Péptido Agonist: the EPO Receptor Complex at 2Å, Science 26, julio de 1996 vol. 273, nº 5274, páginas 464-471; Johnson y Joliffe, "Erythropoietin Mimetic Péptidos and the Future," Nephrol. Dial. Transplant (2000) 15: 1274-1277, Wrighton et al. (1996) Science 273: 458-463; Johnson et al. (1998) Biochemistry, 37: 3699-3710 también pueden ser útiles en los métodos de modulación de los efectos de la respuesta corporal contra una enfermedad o trastorno descrito en el  
35 presente documento.

## 6.2 Fragmentos de citocina de tipo 1.

40 Los motivos anteriores no solo son útiles en la identificación de péptidos derivados de EPO o fragmentos de agonistas de EPO sino que los fragmentos de citocinas de Tipo 1 también puede presentar la capacidad de inhibir o retrasar una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos y son por lo tanto terapéuticamente eficaces en la prevención, tratamiento, mejora o mantenimiento de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos. La familia

de citocina de Tipo 1 incluye, pero sin limitación, interleucina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10 o IL-11, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), leptina, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), trombopoyetina (TPO), hormona del crecimiento, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina (EPO) y prolactina.

- 5 Considerando la estructura secundaria de la EPO se proporciona una orientación para la preparación de un péptido candidato mediante la disposición espacial de aminoácidos derivados de aminoácidos homólogos localizados dentro de estructuras secundarias homólogas dentro de otros ligandos del receptor de citocina de Tipo 1: por ejemplo, GM-CSF e IL-3 (Kannan, 2000, Neuroimmunomod. 8: 132-141), entre otros, se ha demostrado que posee una fuerte actividad neurotrófica y neutroprotectora, debido en gran parte, según piensan los solicitantes, a la estimulación de un receptor protector de tejido. Por ejemplo, considerando la hélice B de estas citocinas de tipo I: los aminoácidos homólogos en trombopoyetina (TPO; Banco de Datos de Proteínas (BDP) registro 1V7M) comprende D62, G65, T68, L69, E72, A76 y Q80, en el que estos aminoácidos están espacialmente adyacentes entre sí en una disposición lineal; LOS aminoácidos homólogos en el factor inhibidor de leucemia (LIF; PDB registro 1EMR) comprende E61, R64, Y68, S72, N75 y D79; LOS aminoácidos homólogos en el factor neurotrófico ciliar (CNTF; PDB registro 1CNT) comprende E71, E75. Todos estos son ejemplos del Motivo Estructural A descrito anteriormente en el que los aminoácidos subrayados son aminoácidos con carga negativa.

En determinados ejemplos de Motivo Estructural A desvelado a continuación como Fórmulas V-VI, los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden no incluir Péptido BV, WEHVNAIQEARRLL; Péptido BW, LSKLLRDSHVLH; Péptido BX, KIRSDLTALTESYVKH, Péptido BY, GTEKAKLVELYRIVVYL o Péptido BZ, SIMIDEIHHHLKRPPNPL.

- 20 En un ejemplo de Motivo Estructural A, los péptidos y análogos peptídicos derivados de citocina de Tipo 1 tienen la Fórmula estructural (V):

$X_1^- X_2^- X_3^- X_4^- X_5^- X_6^- X_7^- X_8^- X_9^- X_{10}^- X_{11}^- X_{12}^- X_{13}^- X_{14}^- X_{15}^- X_{16}^- X_{17}^- X_{18}^- X_{19}$

en la que:

- $X_1$  es Trp (W), Val (V), Ala (A), Ile (I), Pro (P), Leu (L), Ser (S), Asp (D),  
 25 o Thr (T);  
 $X_2$  es cualquier aminoácido;  
 $X_3$  es cualquier aminoácido;  
 $X_4$  es cualquier aminoácido;  
 $X_5$  es cualquier aminoácido;  
 30  $X_6$  es cualquier aminoácido;  
 $X_7$  es cualquier aminoácido;  
 $X_8$  es Ile (I), Phe (F), Leu (L), Val (V), Pro (P), Tyr (Y), o Gly (G);  
 $X_9$  es un aminoácido con carga negativa;  
 $X_{10}$  es un aminoácido con carga positiva;  
 35  $X_{11}$  es Ile (I), Leu (L), Ala (A), Gly (G), Phe (F), Val (V), o Pro (P);  
 $X_{12}$  es Ile (I), Met (M), Tyr (Y), Ser (S), Val (V), Phe (F), Lys (K), Leu (L), Glu (E), o Asp (D);  
 $X_{13}$  es cualquier aminoácido;  
 $X_{14}$  es His (H), Leu (L), Pro (P), Thr (T), Arg (R), Cys (C), Ile (I), Tyr (Y), Gln (Q), o Ala (A);  
 $X_{15}$  es Leu (L), Lys (K), Thr (T), Val (V), Phe (F), Ala (A), o Gln (Q);  
 40  $X_{16}$  es Lys (K), Glu (E), Met (M), Gly (G), Asn (N), Gln (Q), Thr (T), o Val (V);  
 $X_{17}$  es cualquier aminoácido;  
 $X_{18}$  es Pro (P), Lys (K), Arg (R), Ile (I), Asn (N), Ser (S), Gln (Q), o Phe (F);  
 $X_{19}$  es Pro (P), Ile (I), Tyr (Y), Leu (L), Phe (F), Ser (S), Ala (A), Asp (D), Asn (N), o Lys (K).

- 45 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 19 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural V contienen tan solo 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, o

incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y las propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural V.

Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula (V) en la actividad protectora tisular, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos polares, con carga negativa y positiva, e inmediatamente adyacentes no están deletados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub> y X<sub>11</sub> no están deletados.

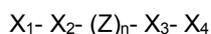
Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula V también pueden extenderse a uno o ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos contienen hasta 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula V.

Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula V pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, en el presente documento también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula V en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en las fórmulas se sustituyen de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula V se seleccionan del grupo de péptidos expuestos a continuación:

Péptido CA KTSWVNCSNMIDEIITHLKQPPLP  
 Péptido CB LLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPR  
 Péptido CC HQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSF  
 Péptido CD DSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED  
 Péptido CE EEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQ  
 Péptido CF SNVDKETGEDG  
 Péptido CG YSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSEK  
 Péptido CH FKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDA  
 Péptido CI LDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALS  
 Péptido CJ QALSEMIQFYLEEVMQAENQDPD  
 Péptido CK LQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFH  
 Péptido CL AQDLERSGLNIEDLEKLMARPNI  
 Péptido CM VPPSTALRELIEELVNITQNQKAP  
 Péptido CN IFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET  
 Péptido CO NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC  
 Péptido CP FMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTM; y  
 Péptido CQ CLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKED

En otro ejemplo de Motivo Estructural A, los péptidos y análogos peptídicos aislados basados en citocinas de Tipo 1 y útiles en el método tienen la Fórmula estructural VI:



en la que:

X<sub>1</sub> es Phe (F), Val (V), Ala (A), Gly (G), Pro (P), Leu (L), Tyr (Y), Ile (I), Cys (C) o Met (M);

X<sub>2</sub> es un aminoácido con carga negativa;

(Z)<sub>n</sub> es un aminoácido, en el que n es 1-5;

X<sub>3</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>4</sub> es Pro (P), Met (M), Val (V), Ile (I), Phe (F), Gly (G), Leu (L), Ala (A), Tyr (Y) y Trp (W).

5 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 9 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural VI contienen tan solo 8, 7, 6 o incluso 5 restos aminoacídicos que sustancialmente conservan las características generales y propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural VI.

10 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VI, en determinados casos, los restos comprenden los aminoácidos con carga negativa y positiva e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> no están delecionados.

15 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VI también pueden extenderse a uno o ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y en algunos casos incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula VI.

20 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula VI pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en algunos casos incluso potenciar, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VI en los que al menos uno y hasta cinco restos aminoacídicos en la fórmula se sustituyen de manera conservativa con otro resto aminoacídicos. En determinados casos, se sustituyen cuatro, tres, dos o un aminoácido de manera conservativa.

25 En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VI se seleccionan del grupo de péptidos expuestos a continuación:

- Péptido CR NETVEISEMFDLQEPTCLQTRLELY;
- Péptido CS NLKDFLLVIPFDCWEPVQE;
- Péptido CT RDTAAEMNETVEISEMFDLQEPTCLQ;
- Péptido CU RLLNLSRDAAEMNETVEISEMFDLQEP;
- Péptido CV LPLLDNFNNLNGEDQDILMENNLRPN;
- Péptido CW PTRHPIHIKGDWNEFRRKLTFLYKLT;
- Péptido CX HVGHVDVTYGPDTSGKDFVQKKLGCGL;
- Péptido CY KHQGLNKNINLDSADGMPVASTDQWS;
- Péptido CZ WSELTAEQELQRVAREVH;
- Péptido DA LRAHRLHQLAFDQYQEFEEAYIPKEQK;
- Péptido DB LVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGR;
- Péptido DC SNVDKETGEDG;
- Péptido DD QEERRRVNGFLDYLQEFGLVMNTEWII;
- Péptido DE EEFFRIFNRSIDAFKDFVASETSDCV;
- Péptido DF SRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSC;
- Péptido DG YSTVSGDWQLDL;
- Péptido DH QFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLG;
- Péptido DI QFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGEN;

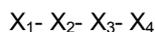
Péptido DJ KATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLA;  
 Péptido DK SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY;  
 Péptido DL FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKK;  
 Péptido DM VEIEEQTKRLLLEGMELIVSQVHPETK;  
 Péptido DN GMELIVSQVHPETKENEIYPVWSGLPSL;  
 Péptido DO PEAVEEREELSQV;  
 Péptido DP HKCDITLQEIIKTLNSLTEQ;  
 Péptido DQ AENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEET;  
 Péptido DR TCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFE;  
 Péptido DS VPPGEDSKDVAAPHRQPLTS;  
 Péptido DT RKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPK;  
 Péptido DU LVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEE;  
 Péptido DV TCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEE;  
 Péptido DW IQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKL;  
 Péptido DX RNNIYMAQLLDNSDTAEPKAGRGASQP;  
 Péptido DY PLPTPVLLPAVDFSLGEWKTQMEETKAQ;  
 Péptido DZ DFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLLEG;  
 Péptido EA LEWKTQTDGLEGAAGQ;  
 Péptido EB TVAGSKMQGLLERVNTIEHFVTKCAFQP;  
 Péptido EC LEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA;  
 Péptido ED NSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCIL;  
 Péptido EE EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSR;  
 Péptido EF TTNDVPHIQCGDGDQPGLRDNSQFC;  
 Péptido EG AWSAHLVGHMDLREEGDEETTNDVPH;  
 Péptido EH LVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGD;  
 Péptido EI LQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSSLPD;  
 Péptido EJ NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLH;  
 y  
 Péptido EK LEYCLKDRMNFDIPEEIKLQQFQKED.

Como ejemplos adicionales de péptidos protectores de tejido, útiles en los métodos de tratamiento derivados de citocinas de Tipo 1, que ilustran el Motivo Estructural B descrito anteriormente en el presente documento y desvelados en el documento PCT/US2006/031061, se incluyen, pero sin limitación, el fragmento de la hélice A de GM-CSF, Péptido BV: WEHVNAIQEARRLL; el fragmento de la hélice A de TPO, Péptido BW: LSKLLRDSHVLH; el fragmento de la hélice B de TPO: E56, K59; el fragmento de hélice A de CNTF, Péptido BX: KIRSDLTALTESYVKH; el fragmento de la hélice B de CNTF: R89, E92; el fragmento de la hélice B de LIF, Péptido BY: GTEKAKLVELYRIVVYL; y el fragmento de la hélice A de interleucina 3 (IL-3), Péptido BZ: SIMIDEIIHHLKRPNNPL.

En determinados ejemplos de Motivo Estructural B desvelado a continuación como Fórmulas VII-X, los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden no incluir el Péptido BV, WEHVNAIQEARRLL; Péptido BW, LSKLLRDSHVLH; Péptido BX, KIRSDLTALTESYVKH, Péptido BY, GTEKAKLVELYRIVVYL o Péptido BZ, SIMIDEIIHHLKRPNNPL.

Péptidos derivados de citocina de Tipo 1 adicionales que presentan el motivo estructural B que son útiles en el método actual de prevención, tratamiento, mejora o gestión de una enfermedad o tratamiento asociado con daño

tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son los que presentan la Fórmula estructural VII:



en la que:

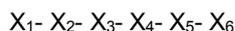
X<sub>1</sub> es Leu (L), Ile (I), Gly (G), Val (V), Phe (F), Pro (P), o Ala (A);

5 X<sub>2</sub> es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>3</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>4</sub> es Phe (F), Gly (G), Val (V), Leu (L), Ala (A) o Tyr (Y);

Los péptidos derivados de citocina de Tipo I pueden tener la Fórmula estructural VII(a):



10 en la que:

X<sub>1</sub> es Leu (L), Ile (I), Gly (G), Val (V), Phe (F), Pro (P) o Ala (A);

X<sub>2</sub> es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>3</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>4</sub> es Phe (F), Gly (G), Val (V), Leu (L), Ala (A) o Tyr (Y);

15 X<sub>5</sub> es Arg (R), Asp (D), Glu (E), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Phe (F), Val (V) o Tyr (Y);

X<sub>6</sub> es His (H), Lys (K), Asp (D), Glu (E), Gln (Q), Asn (N), Ser (S), Leu (L), Trp (W) o Phe (F).

Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 5 o incluso 4 restos aminoácídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de las Fórmulas estructurales VII o VIIa contienen tan solo 6 o incluso 5 restos aminoácídicos que conservan sustancialmente las características globales y propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados.

20 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de las Fórmulas estructurales VII o VIIa, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos con carga negativa y positiva e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> no están delecionados.

25 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VII y Fórmula Ila pueden también extenderse a uno o ambos extremos o internamente con restos aminoácídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoácídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula VII o Fórmula Ila.

30 Determinados restos aminoácídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula VII o Fórmula Ila pueden reemplazarse con otros restos aminoácídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VII en las que al menos uno y hasta dos restos aminoácídicos en las fórmulas están sustituidos de manera conservativamente con otro resto aminoácídico.

35 En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VII y Fórmula Ila se seleccionan del grupo de péptidos expuestos a continuación:

Péptido EL IITFESFKENLKDFLLVIPFDCWE

Péptido EM TAAPTRHPIHIKGDWNEFRRKLT

Péptido EN VDVTYGPDTSGKDVFQKKKLGCQL

Péptido EO SGKDVFQKQGQSVQ

Péptido EP QELSQWTVRSIHDLRFISSHQGTGI

Péptido EQ	WSELTAEQELQRVAREVH
Péptido ER	GASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGR
Péptido ES	GICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKD
Péptido ET	FRIFNRSIDAFKDFVASEETSDCV
Péptido EU	VIQISNDLENLRDLLHVLAFSKSC
Péptido EV	THFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTF
Péptido EW	PGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQFM
Péptido EX	LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLE
Péptido EY	QDPYVKEAENLKKYFNAG
Péptido EZ	VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA
Péptido FA	PGGAARCQVTLRDLFDRAVLSHY
Péptido FB	WGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLE
Péptido FC	DMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQ
Péptido FD	GPVPPSTALRELIEELVNITQN
Péptido FE	KDLLLLHLKFLFREGRFN
Péptido FF	RDTKIEVAQFVKDLLLLHLKFLFRE
Péptido FG	LDQIPGYLNRIHELLNGTRGLFPG
Péptido FH	SPISSDFAVKIRELSDYLLQDYPV; y
Péptido FI	YYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRV

En otro ejemplo más de los péptidos útiles en la prevención, tratamiento, mejora o gestión de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o dados, efectos o síntomas resultantes de los mismos, los péptidos o análogos peptídicos aislados derivados de citocinas de Tipo 1 y que presentan el Motivo Estructural B tiene la fórmula estructural (VIII):

5  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}$

en la que:

$X_1$  es Ala (A), Thr (T), Ser (S), Tyr (Y), Leu (L), Val (V), Ile (I), Phe (F) o Glu (E);

$X_2$  es cualquier aminoácido;

$X_3$  es Ser (S), Gln (Q), Asp (D), Leu (L), Glu (E), Cys (C), Asn (N), Arg (R) o Ala (A);

10  $X_4$  es Pro (P), Gly (G), Gln (Q), Leu (L), Thr (T), Asn (N), Ser (S), Phe (F) o Ile (I);

$X_5$  es cualquier aminoácido;

$X_6$  es Pro (P), Ser (S), Cys (C), Val (V), Lys (K), Thr (T), Leu (L), Ile (I) o Gln (Q);

$X_7$  es cualquier aminoácido;

$X_8$  es Thr (T), Pro (P), Leu (L), Arg (R), Gly (G), Tyr (Y), Gln (Q), Glu (E), Ile (I) o Ala (A);

15  $X_9$  es cualquier aminoácido;

$X_{10}$  es Pro (P), Asn (N), Glu (E), Asp (D), Thr (T), Leu (L), He (I), Gln (Q), Phe (F) o Trp (W);

$X_{11}$  es Trp (W), Leu (L), Ala (A), Met (M), Val (V), Ile (I), Phe (F) o Tyr (Y);

$X_{12}$  es un aminoácido con carga negativa;

$X_{13}$  es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>14</sub> es Val (V), Leu (L) o Ala (A);

X<sub>15</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>16</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>17</sub> es cualquier aminoácido;

5 X<sub>18</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>19</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>20</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>21</sub> Arg (R), Asp (D), Tyr (Y), Val (V), He (I), Leu (L), Lys (K), Ser (S) o Thr (T);

X<sub>22</sub> es cualquier aminoácido;

10 X<sub>23</sub> es cualquier aminoácido;

X<sub>24</sub> es Leu (L), Pro (P), Phe (F), Arg (R), Tyr (Y), Cys (C), Gly (G), Val (V) o Lys (K).

15 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 24 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de la Fórmula estructural VIII contiene tan solo 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural VIII.

Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VIII en la actividad protectora tisular, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos con carga negativa y positiva e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

20 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VIII también pueden extenderse a uno o a ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 25, 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula VIII.

25 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula VIII pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VIII en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En algunos casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

30 En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula VIII se seleccionan del grupo de péptidos expuestos a continuación:

Péptido FJ ARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLL;

Péptido FK ITFEKLVIP;

Péptido FL TAQGEPFPNNLDKLCGPNVDFPP;

Péptido FM STDQWSELTEAERLQENLQAYRTF;

Péptido FN YGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR;

Péptido FO LESQTVQGGTVERLFFKNLSLIKKY;

Péptido FP VQLSDSLTDLKDFSNISEGLSNY;

Péptido FQ ISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVEC;

Péptido FR SSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNG;

Péptido FS FNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNV;

Péptido FT ARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNL;  
 Péptido FU LDRVYNEEKRYTH;  
 Péptido FV EANQSTLENFLERLKTIMREKYSK;  
 Péptido FW LERSGLNIEDLEKLQMARPNILGL;  
 Péptido FX LWRLVLAQRWMERLKTVAGSKMQG;  
 Péptido FY TVAGSKMQGLLERVNTEIHFVTKC;  
 Péptido FZ LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS; y  
 Péptido GA LQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEP.

En otro ejemplo, los péptidos y análogos peptídicos aislados basados en citocinas de Tipo 1 que presentan el Motivo estructural B tienen la Fórmula estructural IX:

$$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}$$

en la que:

- 5 X<sub>1</sub> es Cys (C), Tyr (Y) o Ala (A);  
 X<sub>2</sub> es Ser (S), Leu (L) o Glu (E);  
 X<sub>3</sub> es Arg (R), Gln (Q) o Asn (N);  
 X<sub>4</sub> es Ser (S) o Leu (L);  
 X<sub>5</sub> es Ile (I), Leu (L) o Lys (K);
- 10 X<sub>6</sub> es Trp (W), Leu (L) o Lys (K);  
 X<sub>7</sub> es Leu (L), Phe (F) o Tyr (Y);  
 X<sub>8</sub> es Ala (A), Asn (N) o Phe (F);  
 X<sub>9</sub> es Arg (R), Pro (P) o Asn (N);  
 X<sub>10</sub> es Lys (K), Leu (L) o Ala (A);
- 15 X<sub>11</sub> es Ile (I), Val (V) o Gly (G);  
 X<sub>12</sub> es un aminoácido con carga positiva;  
 X<sub>13</sub> es un aminoácido polar;  
 X<sub>14</sub> es un aminoácido con carga negativa;  
 X<sub>15</sub> es Leu (L), Gly (G) o Val (V);
- 20 X<sub>16</sub> es Thr (T), Ile (I) o Ala (A);  
 X<sub>17</sub> es Ala (A), Cys (C) o Asp (D);  
 X<sub>18</sub> es Leu (L), Arg (R) o Asn (N);  
 X<sub>19</sub> es Thr (T), Asn (N) o Gly (G);  
 X<sub>20</sub> es Glu(E), Arg (R) o Thr (T);
- 25 X<sub>21</sub> es Ser (S), Val (V) o Leu (L);  
 X<sub>22</sub> es Tyr (Y), Thr (T), Phe (F);  
 X<sub>23</sub> es Asn (N) o Leu (L);  
 X<sub>24</sub> es Asn (N) o Gly (G);  
 X<sub>25</sub> es Val (V) o Ile (I).

Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 25 restos aminoacídicos. De hecho las formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural IX contienen tan solo 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y las propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de fórmula estructural IX.

5

Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula IX en la actividad protectora tisular, en determinados casos, los restos comprenden los aminoácidos polares, con carga positiva y negativa e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub> y X<sub>14</sub> no están delecionados.

10 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula IX también pueden extenderse a uno o a ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y en algunos casos incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula IX.

15

Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula IX pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula IX en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En determinados casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

20

En ejemplos específicos, los péptidos y análogos peptídicos aislados se seleccionan del grupo de péptidos indicados a continuación:

Péptido GB CSRSIWLARKIRSDLTALTESYVKH;

Péptido GC ELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDG;

Péptido GD YLQLLLFNPLVKTEGICRNRVTNNV; y

Péptido GE AENLKKEYFNAGHSDVADNGTLFLGI.

25 En otro caso, los péptidos y análogos peptídicos aislados basados de citocinas de tipo 1 que presentan el motivo estructural B tienen la fórmula estructural X:

$$X_1- X_2- X_3- X_4- X_5- X_6- X_7- X_8- X_9- X_{10}- X_{11}- X_{12}- X_{13}- X_{14}- X_{15}- X_{16}-X_{17}- X_{18}- X_{19}- X_{20}- X_{21}- X_{22}- X_{23}- X_{24}- X_{25}$$

en la que:

X<sub>1</sub> es Leu (L);

30 X<sub>2</sub> es Gly (G);

X<sub>3</sub> es Cys (C);

X<sub>4</sub> es Val (V);

X<sub>5</sub> es Leu (L);

X<sub>6</sub> es His (H);

35 X<sub>7</sub> es Arg (R);

X<sub>8</sub> es Leu (L);

X<sub>9</sub> es Ala (A);

X<sub>10</sub> es Asp (D);

X<sub>11</sub> es Leu (L);

40 X<sub>12</sub> es un aminoácido con carga negativa;

X<sub>13</sub> es un aminoácido polar;

X<sub>14</sub> es un aminoácido con carga positiva;

X<sub>15</sub> es Leu (L);

X<sub>16</sub> es Pro (P);

X<sub>17</sub> es Lys (K);

5 X<sub>18</sub> es Ala (A);

X<sub>19</sub> es Gln (Q);

X<sub>20</sub> es Asp (D);

X<sub>21</sub> es Leu (L);

X<sub>22</sub> es Glu (E);

10 X<sub>23</sub> es Arg (R);

X<sub>24</sub> es Ser (S);

X<sub>25</sub> es Gly (G).

15 Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden contener menos de 25 restos aminoacídicos. De hecho, formas truncadas o internamente delecionadas de Fórmula estructural X contienen tan solo 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o incluso 10 restos aminoacídicos que conservan sustancialmente las características generales y las propiedades protectoras tisulares de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula estructural X.

20 Debido a la supuesta importancia de la configuración de carga espacialmente compacta en los restos internos de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula X en la actividad protectora tisular, en determinados casos, los restos que comprenden los aminoácidos polares, con carga positiva y negativa e inmediatamente adyacentes no están delecionados. Por tanto, en determinados casos, los restos X<sub>11</sub>, X<sub>12</sub>, X<sub>13</sub>, X<sub>14</sub> y X<sub>15</sub> no están delecionados.

25 Los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula X también pueden extenderse a uno o a ambos extremos o internamente con restos aminoacídicos adicionales que no interfieren sustancialmente con, y algunas veces incluso potencian, las propiedades estructurales y/o funcionales de los péptidos o análogos peptídicos. De hecho, en el presente documento se describen péptidos y análogos peptídicos núcleo extendidos que contienen hasta 26, 27, 28 o 29 restos aminoacídicos. Preferentemente, dichos péptidos extendidos conservarán sustancialmente las propiedades protectoras tisulares de los análogos peptídicos de Fórmula X.

30 Determinados restos aminoacídicos en los péptidos y análogos peptídicos núcleo de Fórmula X pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos sin afectar perjudicialmente de manera significativa, y en muchos casos incluso potenciando, la actividad de los péptidos y análogos peptídicos. Por tanto, también se describen formas alteradas o mutadas de los péptidos y análogos peptídicos aislados de Fórmula X en las que al menos uno y hasta ocho restos aminoacídicos en la fórmula están sustituidos de manera conservativa con otro resto aminoacídico. En algunos casos, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un aminoácido está sustituido de manera conservativa.

35 En casos específicos, los péptidos y análogos peptídicos constan de la secuencia de aminoácidos:

Péptido GF LGCVLHRLADLEQRLPKAQLDERSG.

Ejemplos adicionales de péptidos derivados de las citocinas de Tipo 1 que ilustran el Motivo Estructural C descrito anteriormente en el presente documento incluyen, pero sin limitación, derivado de la trombopoyetina humana, Péptido GG:DLRVLSKLLRDSHV; Péptido GH:PTPVLLPAVDFSLGEWKTQM; Péptido 40 GI:TAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFL; y Péptido GJ:PNRTSGLLETNFTAS; derivado de GM-CSF, Péptido GK:PSTQPWEHVNAIQEARR; Péptido GL:NETVEVISE; Péptido GM:QTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTM; y Péptido GN:KDFLLVIPDFCWEPVQE; derivado de CNFT, Péptido GO:CSRSIWLARKIRSD; Péptido GP:NKNINLDSADGMPVASTD; Péptido GQ:LLQVAAFAYQIEELMILLEYK; y Péptido GR:ELSQWTVRSIHDLRFISS; derivado de IL-6, Péptido GS:SERIDKQIRYILDGIS; Péptido GT:AENNLNLPKMAEKD; Péptido 45 GU:EEQARAVQMSTKVLIQ y Péptido GV:RSFKEFLQSSLR; derivado de IL-3, Péptido GW:SCNMIDEIITHLKQ; Péptido GX:ENNLRRPNLEAFNRVKS; y Péptido GY:HIKGDGWNFRRKLTFFYLKT; derivado de alfa interferón humano, Péptido GZ:SSCLMDRHDGFGFPQEEFDGNQ; Péptido HA:QQIFNLFTTKDSSAAWDE; y Péptido HB:LMNADSIKAVKKYFRITLY; derivado de beta interferón humano, Péptido HC:MSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLN; Péptido HD:DRMNFDIPEEIKLQFQK; Péptido 50 HE:KLEKEDFTRGKLMSSLHLKR y Péptido HF:FINRLTGYLNRN; derivado de gamma interferón humano, Péptido HG:CYCQDPYVKEAENLKKYFNA; Péptido HH:ADNGTLFLGILKNWKEESDR; Péptido

HI: NSNKKKRDDFEKLTNYSVTD; y Péptido HJ: ELSPAAGTKGR; derivado del factor de células madre humano, HK: SLIIGFAAGALYWKKRQPSL; HL: RNRVTNNVKDVTCLV; Péptido HM: DKLVNIVDDLVECVKE; y Péptido HN: SETSDCWSSTLSPEKDSRV; y derivado de la proteína 2 del déficit del factor de coagulación múltiple humano, Péptido HO: DELINIIDGVLRDDDKNND; Péptido HP: GLDKNTVHDQEHIMEHLEGV; y Péptido HQ: QLHYFKMHDYDGNLL.

Ejemplos adicionales de péptidos derivados de las citocinas de Tipo 1 que ilustran el Motivo Estructural D descrito anteriormente en el presente documento incluyen, sin limitación, derivado de Saposina C, Péptido HR: CEFLVKEVTKLIDNNKTEKEIL; derivado del bucle AB de hCNTF, Péptido HS: YVKHQGLNKNINLDSVDGVP; derivado del bucle AB de hIL-6, Péptido HT: EALAENNLNLPKMAG, derivado del bucle AB de hIL-2, Péptido HU: LQMILNGINNYKNPKLT, derivado del bucle AB de hIL-3, Péptido HV: ILMENNLRRPNL, derivado del bucle AB de hIL-gamma, Péptido HW: FYLRNNQLVAGTL, derivado del bucle AB de hLIF, Péptido HX: YTAQGEFPNNVELKLCAP; derivado de la hélice C de hIL-1 beta, Péptido HY: FNKIEINNKLEFESA y derivado de la hélice C de hONC-M, Péptido HZ: RPNILGLRNNIYMAQLL.

Ejemplos adicionales de péptidos derivados de las citocinas de Tipo I que ilustran el Motivo Estructural F descrito anteriormente en el presente documento incluyen, sin limitación, derivado de hCNTF, Péptido IA: YVKHQGLNKNINLDSVDGVP-biotina y derivado de hIL-3, Péptido IB: D-Biotina-ILMENNLRRPNL.

Estos aminoácidos mencionados anteriormente son meramente ejemplares de algunos miembros de la superfamilia de citocinas que señalizan a través de los receptores de citocina de Tipo 1, y los expertos en la técnica identificarán fácilmente regiones homólogas en otros miembros de la superfamilia de citocinas.

### 6.3 Quimeras

En el presente documento también se describen péptidos "quiméricos" - secuencias de aminoácidos lineales que incorporan elementos estructurales no lineales de los aminoácidos externamente orientados de la molécula EPO u otras citocinas de tipo I - que presentan los motivos estructurales indicados anteriormente. Los péptidos quiméricos pueden consistir en la combinación de elementos estructurales de secuencias de aminoácidos distintas en un solo péptido. En otras palabras, un péptido quimérico puede comprender secuencias de aminoácidos derivadas de elementos estructurales no lineales pero adyacentes, tal como un fragmento derivado de las secuencias de aminoácidos 110-115, 133-136 y 160-165 que permitiría contener en un solo péptido, elementos estructurales de la parte C terminal de la hélice C y la parte N terminal del bucle C-D, la lámina plegada  $\beta$  en el bucle C-D y la parte C terminal de EPO. De manera adicional, los péptidos quiméricos pueden usarse para seleccionar las características importantes de una estructura particular, por ejemplo, los aminoácidos externamente orientados de una estructura terciaria particular. Por tanto, un péptido quimérico puede consistir en un fragmento que comprende los aminoácidos 58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84 y 85 de la hélice B (por ejemplo, el Péptido IC, QEQLERALNSS) o, en otras palabras, todos los aminoácidos que se presenten en el exterior de la hélice B de la EPO, como se desvela en el documento PCT/US2006/031061. También se describe un péptido quimérico adicional en el que la primera glutamina se reemplaza con piroglutamato (por ejemplo, Péptido ID, UEQLERALNSS).

Adicionalmente, pueden diseñarse péptidos de origen natural o quiméricos que imiten las proximidades espaciales críticas entre los carbonos carbamilo de cualquiera de dos aminoácidos o entre las cadenas laterales de cualquiera de dos aminoácidos en la eritropoyetina u otra citocina de Tipo 1 descrita en el presente documento anteriormente mediante una secuencia lineal de aminoácidos y puede proporcionar una guía para evaluar posibles quimeras protectoras tisulares derivadas de otras proteínas. También se describen nuevos péptidos quiméricos protectores de tejido, incluyendo los que presentan estos motivos estructurales y proximidades espaciales críticas que desencadenan la protección tisular.

Adicionalmente, la fuerza de los péptidos actuales puede aumentarse uniendo una hélice peptídica anfipática. Las hélices peptídicas anfipáticas son muy conocidas en la técnica, por ejemplo, de péptidos que señalizan a través de receptores acoplados a proteína G de Clase B (por ejemplo, Segrest et al., 1990, Proteins 8: 103), que sirven para localizar el ligando peptídico en la membrana celular. Los ejemplos de dichas hélices incluyen, pero sin limitación, las regiones altamente hidrófobas de: calcitonina (Péptido IE: ALSILVLLQAGS); hormona liberadora de corticotropina (Péptido IF: VALLPCPPCRA); beta endorfina (Péptido IG: NAIKKNAYKKG); glucagón (Péptido IH: GSWQRSLLQDTE); secretina (Péptido II: GGSAAARPAPP); péptido vasointestinal (Péptido IJ: NALAENDTPYY); neuropéptido Y (Péptido IK: GALAEAYPSKP); hormona liberadora de gonadotropina (Péptido IL: GCSSQHWYGL); hormona paratiroidea (Péptido IM: VMIVMLAICFL); polipéptido pancreático (Péptido IN: LRRYINMLTRP); y péptido relacionado con el gen de calcitonina (Péptido IO: LALSILVLYQA) (desvelado en Grace et al., 2004, PNAS 101: 12836). Por ejemplo, puede fabricarse un péptido quimérico a partir de un péptido con el motivo de carga de superficie de la hélice B de la EPO (Péptido IC: QEQLERALNSS) unido en el extremo carboxilo a la hélice anfipática del polipéptido pancreático (Péptido IN: LRRYINMLTRP) para un péptido quimérico (Péptido IP: QEQLERALNSSLRRYINMLTRP) como se desvela en el documento PCT/US2006/031061. Pueden realizarse modificaciones adicionales en el extremo carboxilo de la hélice anfipática sin afectar a sus propiedades protectoras tisulares. Por tanto, un ejemplo adicional de un péptido útil en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos se genera reemplazando la Pro terminal del péptido quimérico anterior con la secuencia TR (Péptido IQ: QEQLERALNSSLRRYINMLTRP).

Adicionalmente, en lugar de las hélices indicadas anteriormente, a los péptidos pueden unirse otras estructuras terciarias. Por ejemplo, los aminoácidos que presentan la hélice B exterior pueden ligarse a la lámina beta plegada (Péptido IR:CSLNENI) encontrada dentro del bucle AB de la EPO para formar un péptido quimérico que tiene la secuencia peptídica IS:CSLNENIQQLERALNSS. Adicionalmente, los aminoácidos que presentan la parte terminal de la hélice C (Péptido IT:ALGKA, que corresponde a los aminoácidos 111, 112, 113, 116 y 118 de la EPO) pueden combinarse con todo o parte del bucle CD parcial (Péptido IU:LGAQEAI SPPDAASAAPLRTI, que corresponde a los aminoácidos 112-133 de la EPO) para formar el Péptido IV:ALGKALGAQKEAISPPDAASAAPLRTI.

Adicionalmente, los péptidos aislados que presentan los diversos motivos desvelados en el presente documento -- Motivo Estructural A (incluyendo las Fórmulas I-IV), Motivo Estructural B (incluyendo las Fórmulas V-X), Motivo Estructural C, Motivo Estructural D, Motivo Estructural E y Motivo Estructural F - pueden combinarse para formar diversas quimeras también. En determinados, casos, las quimeras excluirán el Péptido IC, QEQLERALNSS, el Péptido IP:QEQLERALNSSLRRYINMLTRP, el Péptido IQ:QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, el Péptido IS:CSLNENIQQLERALNSS, el Péptido IT:ALGKA y el Péptido IV:ALGKALGAQKEAISPPDAASAAPLRTI.

Preferentemente entre los péptidos fusionados habrá un brazo enlazador que proporcione flexibilidad de tal manera que los péptidos unidos puedan asumir la orientación estructural adecuada para unirse con el complejo receptor protector tisular. Dichos péptidos de fusión pueden tener un efecto sinérgico, obteniendo conjuntamente un mayor efecto protector tisular, a diferencia de individualmente, posiblemente a través de la unión potenciada con el complejo receptor protector tisular o un aumento de la semivida biológica.

Un experto habitual en la técnica reconocerá el beneficio de combinar diversos elementos estructurales deseados en un solo péptido para maximizar la eficacia de dichos compuestos en el método de prevención, tratamiento, mejora o gestión de daños efectos o síntomas resultantes de la exposición a un agente tóxico. Dichas quimeras pueden comprender péptidos, aminoácidos y elementos que no sean aminoácidos, tales como enlazadores o átomos o residuos comunicantes.

#### 6.4 Péptidos de fusión

Dos o más de los péptidos, derivados de fragmentos o quimeras indicados anteriormente pueden unirse a una proteína relacionada o no relacionada tal como eritropoyetina, albúmina, etc. Dichos péptidos de fusión pueden generarse para conseguir beneficios sinérgicos, aumentar la semivida del péptido en circulación, o aumentar la capacidad del péptido para atravesar barreras endoteliales, tales como la barrera hematoencefálica, la barrera hematorretiniana, etc. o viceversa, es decir, actuar como un mecanismo transportador similar al descrito en el documento PCT/US01/49479 publicado como WO 2002/053580.

#### 6.5 Fabricación de péptidos

Los péptidos pueden fabricarse usando técnicas recombinantes o sintéticas bien conocidas en la materia. En particular, es muy adecuada la síntesis de proteínas en fase sólida para la longitud relativamente corta de los péptidos y puede proporcionar mayores rendimientos con resultados más consistentes. Adicionalmente, la síntesis de proteínas en fase sólida puede proporcionar flexibilidad adicional en cuanto a la fabricación de los péptidos. Por ejemplo, en la fase de síntesis pueden incorporarse modificaciones químicas deseadas en el péptido: podría usarse homocitrulina en la síntesis del péptido en lugar de lisina, obviando de este modo la necesidad de carbamilar el péptido después de la síntesis o podrían dejarse aminoácidos con grupos funcionales protegidos en el péptido durante la síntesis.

##### 40 Síntesis

Los péptidos y análogos peptídicos aislados pueden prepararse usando solución gradual convencional o síntesis en fase sólida (véase, por ejemplo Merrifield, R. B., 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla., y referencias citadas en su interior; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton y Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, Inglaterra, y referencias citadas en su interior).

Como alternativa, los péptidos y análogos peptídicos pueden prepararse mediante condensación de segmentos, como se describe, por ejemplo, en Liu et al., 1996, Tetrahedron Lett. 37(7): 933-936; Baca, et al., 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 1881-1887; Tam et al., 1995, Int. J. Peptide Protein Res. 45: 209-216; Schnolzer y Kent, 1992, Science 256: 221-225; Liu y Tam, 1994, J. Am. Chem. Soc. 116(10): 4149-4153; Liu y Tam, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6584-6588; Yamashiro y Li, 1988, Int. J. Peptide Protein Res. 31: 322-334). Este es particularmente el caso de los péptidos que contienen Gly (G). Otros métodos útiles para sintetizar los péptidos de análogos peptídicos son los descritos en Nakagawa et al., 1985, J. Am. Chem. Soc. 107: 7087-7092.

##### Técnicas recombinantes

Para producir los péptidos y análogos peptídicos puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión-hospedador. Dichos sistemas de expresión-hospedador representan vehículos mediante los cuales los péptidos de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando

se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden presentar el producto génico de eritropoyetina modificado *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, sistemas hospedadores de bacterias, insectos, plantas, mamíferos, incluyendo seres humanos, tales como, pero sin limitación, sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes peptídicas; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contienen las secuencias codificantes de la molécula relacionada con eritropoyetina; o sistemas de células de mamífero, incluyendo sistemas de células de ser humano, por ejemplo células HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, PERC6 que llevan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero, por ejemplo, promotor de metalotioneína, o de virus de mamífero, por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5 K del virus de la vacuna.

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de una manera específica deseada. Dichas modificaciones y procesamiento de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Como saben los expertos habituales en la técnica, diferentes células hospedadoras tienen mecanismos específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína exógena expresada. Para esta finalidad, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glucosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero, incluyendo células hospedadoras de ser humano, incluyen, pero sin limitación, HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 y WI38.

Para la producción prolongada a alto rendimiento de los péptidos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresen de manera estable el producto génico de la molécula relacionada con citocina protector tisular recombinante puede modificarse por ingeniería genética. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación viral, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados, por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación y similares, y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN exógeno, se puede permitir que las células modificadas por ingeniería genética se desarrollen durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y después cambiarse a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y desarrollarse para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen el producto protector tisular. Dichas líneas celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena del producto génico de la molécula relacionada con EPO.

#### Modificaciones adicionales

Los péptidos con modificaciones adicionales también pueden usarse para la prevención, tratamiento, mejora o control de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos. Por ejemplo, los péptidos de los motivos estructurales indicados anteriormente pueden sintetizarse con uno o más (D)-aminoácidos. La elección de incluir un (L) o (D) aminoácido en un péptido depende, en parte, de las características del péptido deseadas. Por ejemplo, la incorporación de uno o más (D)-aminoácidos puede conferir aumentar la estabilidad del péptido *in vitro* o *in vivo*. La incorporación de uno o más (D)-aminoácidos también puede aumentar o disminuir la actividad de unión del péptido según se determine, por ejemplo, usando los bioensayos descritos en el presente documento, u otros métodos bien conocidos en la técnica.

El reemplazo de toda o parte de una secuencia de (L)-aminoácidos por la secuencia respectiva de (D)-aminoácidos enantioméricos crea una estructura ópticamente isomérica en la parte respectiva de la cadena peptídica. La inversión de la secuencia de toda o parte de una secuencia de (L)-aminoácidos crea retro-análogos del péptido. La combinación del reemplazo enantiomérico (L por D o D por L) y la inversión de la secuencia crea análogos retro-inversos del péptido. Los expertos en la técnica saben que los péptidos enantioméricos, sus retro-análogos y sus análogos retro-inversos mantienen una relación topológica significativa con el péptido parental, y a menudo se obtiene especialmente un alto grado de semejanza para el parental y sus análogos retro-inversos. Esta relación y semejanza puede reflejarse en las propiedades bioquímicas de los péptidos, especialmente altos grados de unión de los péptidos y análogos respectivos con una proteína receptora. La síntesis de las propiedades de los análogos de péptidos retro-inversos se ha analizado, por ejemplo, en *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics - Workbench Edición Volumen E22c* (Editor jefe Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York), y en referencias citadas en su interior.

Una "modificación" de aminoácido se refiere a la alteración de un aminoácido de origen natural para producir un aminoácido de origen no natural. Pueden crearse derivados de los péptidos con aminoácidos de origen no natural mediante síntesis química o mediante incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales en los péptidos durante la biosíntesis, como se describe en Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith,

Peter G Schultz, 1989 Science, 244: 182-188.

Pueden usarse peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los péptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH- (cis y trans), --COCH<sub>2</sub>--, --CH(OH)CH<sub>2</sub>--, y -CH<sub>2</sub>SO-, mediante métodos conocidos en la técnica y descritos adicionalmente en las siguientes referencias: Spatola, A. F. en "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins," B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, página 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (marzo 1983), Vol. 1. Issue 3, "Peptide Backbone Modifications" (revisión general); Morely, J. S., Trends Pharma Sci (1980) páginas 463-468 (revisión general); 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-); Hann, M. M., (1982) J Chem Soc Perkin Trans I 307-314 (--CH=CH-, cis y trans); Almquist, R. G. *et al.*, (1980) J Med Chem 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>--); y Hruby, V. J., (1982) Life Sci 31: 189-199 (--CH<sub>2</sub>-S--).

Un enlace no peptídico particularmente preferido es --CH<sub>2</sub>NH--. Dichos péptidomiméticos pueden tener ventajas significativas sobre los péptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, fuerza, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas); antigenicidad reducida, y otras.

Es posible una variedad de diseños para los péptidomiméticos. Por ejemplo, los péptidos cíclicos, en los que la conformación necesaria está estabilizada por compuestos no peptídicos, se contemplan específicamente, Patente de Estados Unidos N° 5.192.746 de Lobl, *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.576.423 de Aversa, *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.051.448 de Shashoua y Patente de Estados Unidos N° 5.559.103 de Gaeta, *et al.*, describen múltiples métodos para crear dichos compuestos. La síntesis de compuestos no peptídicos que imitan secuencias peptídicas también se conoce en la técnica. Eldred *et al.*, J. Med. Chem. 37: 3882 (1994) describen antagonistas no peptídicos que imitan la secuencia peptídica. Del mismo modo, Ku *et al.*, J. Med. Chem 38:9 (1995) aclaran adicionalmente la síntesis de una serie de dichos compuestos.

Después de la síntesis pueden implementarse modificaciones adicionales. Por ejemplo, los péptidos también pueden modificarse químicamente, es decir carbamilarse, acetilarse, succinilarse, guanidarse, nitrarse, trinitrofenilarse, amidinarse, etc., de acuerdo con la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/188,905, que se publica como 20030072737-A1 el 17 de abril de 2003 y desvela EPO modificada químicamente, y de acuerdo con la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/612.665, presentada el 1 de julio del 2003 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 09/753.132, presentada el 29 de diciembre del 2000.

Adicionalmente, los péptidos pueden consistir en péptidos recombinantes -- muteínas. Las mutaciones desveladas pueden incluir sustituciones, deleciones, incluyendo deleciones internas, adiciones incluyendo adiciones que dan lugar a proteínas de fusión, o sustituciones conservativas de restos aminoácidos dentro de y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que dan como resultado un cambio "silencioso", y cambios de aminoácidos no conservativos y mayores inserciones y deleciones, como se describe previamente en el documento PCT/US03/20964 titulado Recombinant Tissue Protective Cytokines and Encoding Nucleic Acids Thereof for Protection, Restoration, and Enhancement of Responsive Cells, Tissues, and Organs.

En uno o más restos aminoácidos pueden realizarse sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Pueden realizarse sustituciones tanto conservativas como no conservativas. Los reemplazos conservativos son aquellos que tiene lugar dentro de una familia de aminoácidos que está relacionada con sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados pueden dividirse en cuatro familias: (1) ácidos = Asp (D), Glu (G); (2) básicos = Lys (K), Arg (R), His (H); (3) no polares (hidrófobos) = Cys (C), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Met (M), Trp (W), Gly (G), Tyr (Y); y (4) polares sin carga = Asn (N), Gin (Q), Ser (S), Thr (T). Los no polares puede subdividirse en: fuertemente hidrófobos = Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Met (M), Phe (F); y moderadamente hidrófobos = Gly (G), Pro (P), Cys (C), Tyr (Y), Trp (W). De manera alternativa, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos = Asp (D), Glu (G); (2) básicos = Lys (K), Arg (R), His (H), (3) alifáticos = Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Ser (S), Thr (T), agrupándose Ser (S) y Thr (T) opcionalmente por separado como hidroxilo-alifáticos; (4) aromáticos = Phe (F), Tyr (Y), Trp (W); (5) amidas = Asn (N), Glu (Q); y (6) con azufre = Cys (C) y Met (M). (Véase, por ejemplo, Biochemistry, 4<sup>a</sup> ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman and Co., 1995).

Como alternativa, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante de un péptido, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse con respecto a su actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad. Después de la mutagénesis, el péptido codificado puede expresarse de manera recombinante y la actividad del péptido recombinante puede determinarse.

El péptido puede modificarse adicionalmente través de la adición de polímeros (tales como polietilenglicol), azúcares, o proteínas adicionales (tales como construcciones de fusión) en un esfuerzo de ampliar la semivida del péptido o potenciar los efectos protectores tisulares del péptido. Los ejemplos de dichas modificaciones se desvelan en los documentos WO/04022577 A3 y WO/05025606 A1. Por ejemplo, un polímero de polietilenglicol puede unirse al Péptido IC para producir un Péptido IW (PEG-QEQLERALNNS).

Dependiendo de la química de conjugación seleccionada y del número de sitios reactivos ya presentes o creados en el péptido, pueden añadirse uno, dos o un número de polímeros seleccionado de una manera reproducible. El modo de unión principal de un PEG, y sus derivados, con péptidos es un enlace inespecífico a través de un resto aminoacídico peptídico (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.088.538, 4.496.689, 4.414.147, 4.055.635 y el documento PCT WO 87/00056). Otro modo de unir péptido PEG a péptidos es a través de oxidación inespecífica de restos de glucosilo en un glucopéptido (véase, por ejemplo, el documento WO 94/05332). En estos métodos inespecíficos, el PEG se añade de manera inespecífica, al azar, a restos reactivos en una estructura peptídica.

## 7. Ensayos para evaluar péptidos

Para determinar la utilidad de los péptidos indicados anteriormente para su uso en métodos terapéuticos pueden usarse diversos ensayos. La actividad protectora tisular de los péptidos se confirmaría usando diversos ensayos conocidos en la técnica y desvelados en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos 10/554.517, 10/612.665 y 11/997.898. Además, los péptidos que carecen de actividad eritropoyética o de actividad eritropoyética reducida se confirmarán usando diversos ensayos *in vitro*, tales como bioensayo con líneas celulares dependientes de EPO (UT-7), bazo de ratón (Krystal, G. (1983) (un simple microensayo de eritropoyetina basado en la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en esplenocitos de ratones tratados con fenilhidracina. *Exp. Hematol.* 11, 649-660)), o ensayos clonales (Spivak, J. L., Seiber, F. (1983). *Erythropoietin. Horm. Norm. Abnorm. Hum. Tissues* 3, 63-96) y ensayos *in vivo*, tales como el ensayo de ratón policitémico ex-hipóxico (Cotes PM, Bangham DR, Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at a reduced pressure, *Nature*. septiembre 1961 9; 191: 1065-7). Adicionalmente, un experto habitual en la técnica reconocerá que la capacidad del péptido para prevenir, mitigar o tratar una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, pueden confirmarse a través de diversos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque se prefieren los ensayos *in vivo*.

### 7.1 Ensayos y modelos protectores de tejido

Los péptidos utilizados en el método actual presentan propiedades protectoras tisulares, es decir anti apoptóticas, neurotónicas, neuroprotectoras, etc. La actividad protectora tisular de los péptidos, por ejemplo, protección de células, tejidos u órganos, puede evaluarse. Las actividades protectoras pueden evaluarse adicionalmente usando ensayos *in vitro* e *in vivo*. Las evaluaciones *in vitro* que son indicativas de actividad protectora tisular incluyen, por ejemplo, ensayos de proliferación celular, ensayos de diferenciación celular, o detección de la presencia de proteínas o ácidos nucleicos regulados positivamente por el complejo receptor protector tisular, por ejemplo, complejo receptor de citocinas protectoras de tejido, actividad, por ejemplo, de nucleolina, neuroglobina, citoglobina o frataxina. La neuroglobina, por ejemplo, puede estar implicada en facilitar el transporte o el almacenamiento a corto plazo de oxígeno. Por lo tanto, los ensayos de transporte o almacenamiento de oxígeno pueden usarse como un ensayo para identificar o explorar compuestos que modulen la actividad protectora tisular.

La neuroglobina se expresa en células y tejidos del sistema nervioso central en respuesta a hipoxia o isquemia y puede proporcionar protección a lesiones (Sun *et al.* 2001, *PNAS* 98: 15306-15311; Schmid *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.* 276: 1932-1935). La citoglobina puede desempeñar una función similar en la protección, pero se expresa en una diversidad de tejidos a varios niveles (Pesce *et al.*, 2002, *EMBO* 3: 1146-1151). Los niveles de una proteína regulada positivamente en una célula pueden medirse antes y después de poner en contacto el péptido con una célula. La presencia de una proteína regulada positivamente asociada con actividad protectora tisular en una célula, puede usarse para confirmar las actividades protectoras tisulares de un péptido.

La nucleolina puede proteger a las células de daños. Esta desempeña numerosas funciones en las células que incluyen, la modulación de procesos de transcripción, de proteínas de unión a ARN específico de secuencia, citocinesis, nucleogénesis, transducción de señal, apoptosis inducida por linfocitos T, remodelación de cromatina, o replicación. También puede funcionar como una ADN/ARN helicasa receptora de la superficie celular, ATPasa dependiente de ADN, lanzadera de proteína, componente de factor transcripcional o represor transcripcional (Srivastava y Pollard, 1999, *FASEB J.*, 13: 1911-1922; y Ginisty *et al.*, 1999, *J. Cell Sci.*, 112: 761-772).

La frataxina es una proteína implicada en el metabolismo del hierro mitocondrial y previamente se ha mostrado que se regula positivamente fuertemente por EPO tanto *in vivo* como *in vitro* (Sturm *et al.* (2005) *Eur J Clin Invest* 35: 711).

La expresión de una proteína regulada positivamente puede detectarse detectando niveles de ARNm correspondientes a la proteína en una célula. El ARNm puede hibridarse con una sonda que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica la proteína regulada positivamente. La hibridación puede consistir, por ejemplo, en

transferencia de Northern, transferencia de Southern, hibridación de matriz, cromatografía de afinidad o hibridación *in situ*.

La actividad protectora tisular del péptido también puede detectarse usando ensayos de neuroprotección *in vitro*. Por ejemplo, pueden prepararse cultivos neuronales primarios de hipocampo de rata recién nacida por tripsinización, y cultivarse mediante cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, por ejemplo, en un medio de crecimiento MEM-II (Invitrogen), D-glucosa 20 mM, 2 L-glutamina mM, suero-Nu al 10 % (bovino; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), complemento B27 al 2 % (Invitrogen), NaHCO<sub>3</sub> 26,2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptavidina 1 mg/ml (véase, por ejemplo, Leist *et al.*, 2004, Science 305: 239-242 ). Un día después de la siembra, se añade citosín-arabinofuranósido 1  $\mu$ M. Después, cultivos de trece días de vida se preincuban con dosis crecientes del péptido de interés (3-3000 pM) durante 24 horas. El día 14, el medio se retira y los cultivos se exponen a NMDA 300  $\mu$ M en PBS a temperatura ambiente (TA). Después de 5 minutos, se restituye medio preacondicionado a los cultivos que después vuelven a llevarse a la incubadora durante 24 horas. Las células se fijan en paraformaldehído, se tiñen con Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) y pueden contarse los núcleos apoptóticos condensados. Como controles positivos se incluye NGF (50 ng/ml) y MK801 (1  $\mu$ M).

Para demostrar la actividad protectora de un compuesto o para demostrar la seguridad y eficacia de los compuestos identificados mediante los métodos de exploración descritos anteriormente tisular pueden usarse sistemas de modelos animales. La actividad biológica de los compuestos identificados en los ensayos puede después evaluarse usando modelos animales para un tipo de daño tisular, enfermedad, afección o síndrome de interés. Estos incluyen animales modificados genéticamente para que contengan el complejo receptor protector tisular acoplado a un sistema de lectura funcional, tal como un ratón transgénico.

Los modelos animales que pueden usarse para evaluar la eficacia de la actividad protectora tisular o celular de un compuesto identificado se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, protección contra la aparición de una encefalomiелitis alérgica experimental aguda en ratas Lewis, restablecimiento o protección de función cognitiva disminuida en ratones después de recibir traumatismo cerebral, isquemia cerebral ("ictus") o convulsiones estimuladas por excitotoxinas (Brines *et al.*, 2000, PNAS, 97: 10295-10672), protección de isquemia retinal inducida (Rosenbaum *et al.*, 1997, Vis. Res. 37: 3443-51), protección de lesión en el nervio ciático y protección de lesión por isquemia-reperusión en el corazón (estudios con cardiomiocitos *in vitro* y lesión por isquemia reperusión *in vivo*, véase, por ejemplo, Calvillo *et al.*, 2003, PNAS 100: 4802-4806 y Fiordaliso *et al.*, 2005, PNAS 102: 2046-2051). Dichos ensayos se describen con mayor detalle en Grasso *et al.* (2004) Med Sci Monit 10: BR1-3, publicación PCT n° WO02/053580, o solicitud PCT PCT/US2006/031061. Los métodos *in vivo* descritos en el presente documento se dirigen a la administración de EPO, sin embargo, también se han identificado proteínas protectoras tisulares administradas en lugar de EPO que también presentan similar actividad biológica, por ejemplo, Leist *et al.* (2004) Science 305: 239-242. Los péptidos también pueden sustituirse para su evaluación. Los expertos en la técnica conocen bien otros ensayos para determinar la actividad protectora tisular de un péptido.

Como alternativa, también pueden realizarse ensayos de unión a células para la evaluación de los péptidos. Por ejemplo, el péptido de interés puede unirse a un marcador biológico, tal como un marcador fluorescente o radiomarcado, para detectar fácilmente y evaluar la unión a células BaF3 transfectadas que expresan EPOR y/o el receptor de  $\beta_c$ . En una placa de 96 pocillos, se siembran ocho diluciones en serie 1:2 del péptido de interés en medio de cultivo (RPMI 1640, suero bovino fetal al 10 %, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM), de tal manera que el volumen final en cada pocillo sea de aproximadamente 100  $\mu$ l. La línea parental BaF3 y las células BaF3 transfectadas con EPOR y/o con el receptor de  $\beta_c$  pueden lavarse tres veces en medios de cultivo (véase anteriormente), resuspenderse los sedimentos en medio de cultivo y las células pueden contarse y diluirse en medio de cultivo a 5.000 células/100  $\mu$ l. Después, se añaden 100  $\mu$ l de células diluidas a cada dilución peptídica. Después, la placa de ensayo se incuba en una incubadora a 37 °C durante tres a cuatro días. Las placas/células se lavan después y la placa se lee en un lector de placa fluorescente o mediante cualquier otro método adecuado para detectar el nivel del biomarcador asociado con la actividad biológica del péptido de interés.

De manera similar, para determinar si un péptido es protector tisular puede utilizarse un ensayo competitivo. En el ensayo competitivo, un compuesto que se sabe que es protector tisular incluye, pero sin limitación, citocinas protectoras tisulares tales como las desveladas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/188.905 y 10/185.841, que pueden unirse a un biomarcador adecuado.

En una placa de 96 pocillos, se siembran ocho diluciones en serie 1:2 de un compuesto protector tisular conocido/biomarcador en un medio de cultivo adecuado, y se siembra en placa las mismas series de dilución del compuesto protector tisular conocido/biomarcador y un exceso del péptido de interés. El volumen final de cada dilución debe ser de aproximadamente 100  $\mu$ l. De nuevo otra vez, se siembran células BaF3 en las placas como se ha desvelado anteriormente y se dejan incubando. Después de una cantidad de tiempo apropiada, las células se lavan y la placa se lee en un lector de placa fluorescente o mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica para detectar el biomarcador. Si la lectura de las placas y/o de los pocillos que contienen el compuesto protector tisular conocido/biomarcador y el péptido de interés es menor que la lectura de las placas que solo contienen el compuesto protector tisular conocido/biomarcador, entonces el péptido de interés es protector tisular.

Muchos factores de proteína descubiertos hasta ahora, incluyendo todas las citocinas conocidas, han mostrado actividad en uno o más ensayos de proliferación de células dependientes de factores, y por tanto estos ensayos sirven como una confirmación conveniente de actividad de citocinas. La actividad de un péptido puede ponerse de manifiesto mediante uno cualquiera de diversos ensayos de proliferación de células dependientes de factores rutinarios para líneas celulares incluyendo, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK. Estas células se cultivan en presencia o en ausencia de un péptido, y la proliferación celular se detecta, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante un ensayo colorimétrico basado en la degradación metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, 1983, J. Immunol. Meth. 65: 55-63).

Si un péptido presenta una actividad protectora tisular, un experto habitual en la técnica reconocería que esto podría ser beneficioso para verificar el resultado usando uno de los ensayos neuroprotectores y protectores tisulares conocidos por los expertos en la técnica, tales como, pero sin limitación, ensayos con células P-19 y PC-12. Adicionalmente, diversos modelos *in vivo*, tales como modelos animales relacionados con lesión de médula espinal, ictus isquémico, daño en nervios periféricos, heridas o daño al corazón, ojos, riñones, etc. sería útil en la caracterización adicional del péptido. En las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos 10/188.905 y 10/185.841, se desvelan ensayos *in vitro* e *in vivo* adecuados.

## 7.2 Ensayos para indicaciones específicas

### A. Agentes tóxicos.

Puede demostrarse que los péptidos aislados a usar en el método inhiben daños, efectos o síntomas resultantes de exposición a un agente tóxico *in vitro* o *in vivo* usando diversos ensayos conocidos en la técnica, o descritos en el presente documento.

Péptidos adicionales usados en el método, pueden evaluarse en diversos ensayos *in vitro* en la técnica para determinar su capacidad para prevenir, tratar, mejorar o controlar los daños, efectos o síntomas resultantes de exposición a un agente tóxico. En general, esto se realiza seleccionando una línea celular apropiada, sometiendo esta célula a un agente tóxico de interés y tratando una parte de las células con un péptido de interés y determinando la supervivencia o respuesta de las células en presencia del agente tóxico y en presencia del agente tóxico y del péptido de interés. Si la célula presenta supervivencia mejorada o reducción de daños, efectos o síntomas en presencia del péptido, puede considerarse que el péptido es un posible agente terapéutico para la exposición al agente tóxico. Además un experto habitual en la técnica reconocerá que la capacidad de los péptidos como protectores puede evaluarse tratando las células con el péptido antes de exponerlas al agente tóxico.

Por ejemplo, ensayos adecuados de agentes tóxicos incluyen, pero sin limitación:

Agentes Químicos: a) líneas celulares dérmicas tales como J-774 (línea celular derivada de macrófagos de ratón), CHO-K1 (cepa de la línea celular epitelial derivada de células de ovario de hámster chino) y HeLa (carcinoma cervical humano) (Sawyer, T. *et al.*, Hypothermia as an adjunct to vesicant-induced skin injury, *Eplasty* 2008; 8: e25); b) líneas de células de córnea para agentes vesicantes (Amir, A. *et al.*, The corneal epithelium in sulfur mustard ocular injury - In vitro and ex vivo studies, *Proceedings of the U.S. Army Medical Defense Bioscience Review*, Aberdeen Proving Ground, MD (2004)); c) macrófagos (Amir A., *et al.*, Sulfur mustard toxicity in macrophages: effect of dexamethasone, *J Appl Toxicol*, 20 Suppl 1: S51-8 (2000)); d) líneas celulares del tracto respiratorio superior (Andrew, D. J. y C. D. Lindsay, Protection of human upper respiratory tract cell lines against sulphur mustard toxicity by glutathione esters, *Hum Exp Toxicol* 17(7): 387-95 (1998); Calvet *et al.*, Airway epithelial damage and release of inflammatory mediators in human lung parenchyma after sulfur mustard exposure, *Hum Exp Toxicol* 18(2): 77-81(1999); Langford, A. M. *et al.*, The effect of sulphur mustard on glutathione levels in rat lung slices and the influence of treatment with arylthiols and cysteine esters, *Hum Exp Toxicol* 15(8): 619-24); e) modelos de piel (Blaha *et al.*, Effects of CEES on inflammatory mediators, heat shock protein 70A, histology and ultrastructure in two skin models, *J Appl Toxicol* 20 Suppl 1: S101-8 (2000); Henemyre-Harris *et al.*, An in vitro wound healing model to screen pharmacological interventions for the effective treatment of cutaneous sulfur mustard injuries, *Proceedings of the U.S. Army Medical Defense Bioscience Review*, Aberdeen Proving Ground, MD (2004))(Véase en líneas generales, [www.counteract.rutgers.edu/invitro.html](http://www.counteract.rutgers.edu/invitro.html) para una bibliografía adicional sobre estudios *in vitro* apropiados); Agentes de Radiación a) células endoteliales (Abderrahmani, R. *et al.*, Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation-induced endothelial cell apoptosis, *Radioprotection* 2008, vol 43, nº 5, b) células neuroinmunitarias (nervios aferentes, nervios sensoriales entéricos, mastocitos) (Wang, J. *et al.*, Neuroimmune interactions: potential target for mitigating or treating intestinal radiation injury, *British Journal of Radiology* (2007) 80, S41-S48), c) cultivos de linfocitos o sangre (Lloyd DC *et al.*, *Phys Med Biol* 18(3): 421-31 (1973); Lloyd DC *et al.*, *Mutat. Res.* 179(2): 197-208 (1987); Blakely WF *et al.*, *Stem Cells* 13 (Suppl 1): 223-30 (1995); Gotoh E *et al.*, *Int. J. Radiation. Biol.* 81(1): 33-40 (2005)); Agentes Biológicos: (a) células mononucleares de sangre periférica (Rasha, H. *et al.* Modeling of SEB-induced host gene expression to correlate in vitro to in vivo responses: Microarrays for biodefense and environmental applications, *Biosensors and Bioelectronics* (2004) vol. 20, nº 4, 719-727).

Además, en la técnica se conocen ensayos *in vitro* adecuados para evaluar el efecto de agentes terapéuticos sobre la exposición a un agente tóxico. También se contemplan modelos animales que utilizan ratas, ratones, cobayas,

conejos, cerdos, ovejas, hurones, perros y primates no humanos así como animales no humanos transgénicos que son particularmente susceptibles a un agente tóxico (ratones CD46). En particular, ensayos conocidos en la técnica incluyen, pero sin limitación: Agentes Químicos: (1) Reid, F. M., Sulfur mustard induced skin burns in weanling swine evaluated clinically and histopathologically, *Journal of applied toxicology*, vol. 20 (S1), páginas S153-S160 (2001); (2) Isidore, M. A. *et al.*, A dorsal model for cutaneous vesicant injury 2-chloroethyl ethyl sulfide using c57b1/6 mice, *Cutaneous and ocular toxicology*, Vol. 26 (3), 265-276 (2007); (3) Véase en líneas generales, [www.counteract.rutgers.edu/animal.html](http://www.counteract.rutgers.edu/animal.html); (4) Kassa J., *et al.*, The Choice: HI-6, pradoxime or Obidoxime against Nerve Agents?, [www.asanlte.com/ASANews-97/Antidot-Choice.html](http://www.asanlte.com/ASANews-97/Antidot-Choice.html), (5) Shih, TM *et al.*, Organophosphorus nerve agents-induced seizures and efficacy of atropine sulfate as anticonvulsant treatment, *Pharmacol-Biochem-Behav.* septiembre 1999, 64(1), 147-53, (6) Luo, C *et al.*, Comparison of oxime reactivation and aging of the nerve agent-inhibited monkey and human acetylcholinesterases, *Chemico-Biological Interactions*, 175(1-3), 261-266 (2008); Agentes de Radiación: (1) W. F. Blakely *et al.*, In Vitro and Animal Models of Partial-Body Dose Exposure: Use of Cytogenetic and Molecular Biomarkers for Assesment of Inhomogeneous Dose Exposures and Radiation Injury, PB-Rad-Injury 2008 Workshop, 5-6 de mayo de 2008 AFRRRI, Bethesda, Maryland; (2) Augustine, A *et al.*, Meeting Report: Animal Models of Radiation Injury, Protection and Therapy, *Radiation Research* 164: 100-109 (2005); (3) Houchen, C *et al.* Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE2 in radiation injury are mediated by EP2 receptor in intestine, *Am JPhysiol Gastrointest Liver Physiol*, 284: G490-G498, 2003; (4) Jichun Chen, Animal Models for Acquired Bone Marrow Failure Syndromes, *Clinical Medicine & Research* 3(2): 102-108; Agentes Biológicos: (1) Biodefense: Research Methodology and Animal Models, James R. Swearingen (editor) 2006 CRC Press.

## 20 B. Inflamación

Adicionalmente, pueden usarse diversos modelos de inflamación *in vitro* para evaluar la capacidad de los péptidos para proteger o tratar el daño, los síntomas o los efectos de la inflamación en el organismo. Inicialmente, la capacidad del péptido para modular un mediador inflamatorio puede confirmarse midiendo los niveles del mediador inflamatorio en un ensayo inflamatorio después del tratamiento con el péptido mediante métodos conocidos, que incluyen, pero sin limitación, ELISA, análisis en matriz de perlas citométricas, ensayos de alta sensibilidad e inmunonefelométricos. Por ejemplo para determinar si el péptido modula TNF- $\alpha$  o IL-1, se realizaría un modelo murino de producción de citocinas mediado por LPS. Algunos ratones en el modelo murino se tratarían previamente con el péptido de interés y después se expondrían a LPS mientras que otros se tratarían con solución salina. Después, se extraería la sangre y los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 en la sangre podrían determinarse mediante un kit ELISA (kits ELISA para TNF- $\alpha$  e IL-1 de ratón OPT-EIA (BD Biosciences). Si los niveles de TNF- $\alpha$  en los animales tratados son inferiores que los niveles de TNF- $\alpha$  en los animales tratados con solución salina entonces puede considerarse que el péptido modula TNF- $\alpha$ . Preferentemente, el péptido podría evaluarse con respecto a su capacidad para modular más de un mediador inflamatorio, y más preferentemente, sería un mediador distinto de TNF- $\alpha$ , o por añadidura TNF- $\alpha$ , y más preferentemente sería histamina. De manera similar, los péptidos pueden evaluarse en ensayos *in vitro* adicionales incluyendo, pero sin limitación, los desvelados en Lopata, Andreas L., Specialized in vitro Diagnostic Methods In The Evaluation Of Hypersensitivity -An Overview, *Current Allergy & Clinical Immunology*, marzo 2006, Vol. 19, N° 1, (ensayos de histamina y triptasa), y Arulmozhi *et al.*, Pharmacological Investigations of *Sapindus trifoliatus* in various in vitro and in vivo models of inflammation, *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 37: 2, 96-102 (2005) (5-lipoxygenase (5-LO), cyclooxygenase (COX), Leukotrine B4 (LTB4) and nitric oxide synthase (NOS)).

Además, los ensayos de inflamación *in vivo* pueden ser útiles para evaluar la utilidad de los péptidos como un agente terapéutico contra agentes tóxicos. Los ensayos *in vivo*, incluyen, pero sin limitación, modelo murinos de EAE, aquellos que utilizan ratones transgénicos tales como el modelo murino DSS IBD de MDBiosciences de colitis severa, el modelo murino TNBS IBD de MDBioscience de enfermedad inflamatoria intestinal, modelos que implican ratones IL-1 genosuprimidos (*knockout*) desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 6.437.216, o modelos de ratones transgénicos que implican TNF- $\alpha$  como se desvela en Probert *et al.* Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing CNS-specific expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995 USA 92, 11294-11298, Kontoyiannis *et al.* Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10: 387-398, 1999, Keffer *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* diciembre 1991; 10(13): 4025-31, o modelos que usan exposiciones a productos químicos o sintético para inducir la inflamación, tales como los modelos de asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, desvelados en JPET 307: 373-385, 2003, modelos de artritis con adyuvante, como se desvela en el documento EP 1 777 234; modelos murinos de choque inducido por LPS, modelos murinos de pulmón con LPS, modelos de inflamación aguda en patas, o modelos de formación de ronchas por exposición a histidina como se desvela con detalle más adelante.

Además, la eficacia de los compuestos en seres humanos puede evaluarse usando estudios clínicos bien conocidos, tales como la prueba de punción cutánea y la prueba de broncoprovocación, desvelados en Ravensberg *et al.* "Validated safety predictions of airway responses to house dust mites in asthma", *Clinical and Experimental Allergy*, 37: 100-107 (2007); estudios de asma, como se desvela en Diamant *et al.* "Methods used in clinical development of novel anti-asthma therapies", *Respiratory Medicine* (2008) 102, 332-338, o exposición a alérgenos nasales, como se desvela en Boot *et al.* "Nasal Nitric Oxide: longitudinal reproducibility and the effects of a nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis", *Allergy* 2007: 62: 378-384.

## C. Cáncer.

Puede demostrarse que los péptidos aislados a usar en el método inhiben la proliferación celular tumoral, la transformación celular y la tumorigénesis *in vitro* o *in vivo* usando diversos ensayos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento. Dichos ensayos pueden usar células de una línea de células cancerosas o células de un paciente. Pueden usarse muchos ensayos bien conocidos en la técnica para ensayar dicha supervivencia y/o crecimiento; por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse midiendo la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, mediante recuento celular directo, detectando cambios en la transcripción, traducción o actividad de genes conocidos, tales como protooncogenes (por ejemplo, fos, myc) o marcadores de ciclo celular (Rb, cdc2, cyclin A, D1, D2, D3 o E). Los niveles de dicha proteína y ARNm y la actividad pueden determinarse mediante cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden cuantificarse mediante métodos de inmunodiagnóstico conocidos tales como transferencia de Western o inmunoprecipitación usando anticuerpos disponibles en el comercio (por ejemplo, muchos anticuerpos marcadores del ciclo celular son de Santa Cruz, Inc.). El ARNm puede cuantificarse mediante métodos que son muy conocidos y rutinarios en la técnica, por ejemplo, por análisis de Northern, protección con RNasa, la reacción en cadena de la polimerasa junto con la transcripción inversa, etc. La viabilidad celular puede evaluarse usando tinción con azul de tripano u otro marcador de muerte o viabilidad celular conocido en la técnica. La diferenciación puede evaluarse visualmente basándose en cambios de morfología, etc.

Para el análisis del ciclo celular y de la proliferación celular se describen varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, las siguientes:

20 Como ejemplo, puede usarse la incorporación de bromodesoxiuridina ("BRDU") como un ensayo para identificar células proliferativas. El ensayo con BRDU identifica una población celular que se somete a síntesis de ADN por incorporación de BRDU en ADN recién sintetizado. El ADN recién sintetizado puede después detectarse usando un anticuerpo anti BRDU (véase Hoshino *et al.*, 1986, *Int. J. Cancer* 38, 369; Campana *et al.*, 1988, *J. Immunol. Meth.* 107, 79).

25 La proliferación celular también puede examinarse usando la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina (véase, por ejemplo, Chen, J., 1996, *Oncogene* 13: 1395 403; Jeoung, J., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 18367 73). Este ensayo permite la caracterización cuantitativa de la síntesis de ADN en fase S. En este ensayo, las células que sintetizan ADN incorporarán <sup>3</sup>H-timidina en ADN recién sintetizado. Después, la incorporación puede medirse con técnicas convencionales en la materia, tales como recuento de radioisótopos en un contador de Centelleo (por ejemplo, Contador de Centelleo Líquido LS 3800).

35 Para medir la proliferación celular también puede usarse la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). El PCNA es una proteína de 36 kiloDaltons cuya expresión es elevada en células proliferativas, particularmente en las fases tempranas G1 y S del ciclo celular y por lo tanto pueden servir como un marcador de células proliferativas. Las células positivas se identifican por inmunotinción usando un anticuerpo anti-PCNA (véase Li *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6: 189 199; Vassilev *et al.*, 1995, *J. Cell Sci.* 108: 1205 15).

40 La proliferación celular puede medirse contando muestras de una población celular a lo largo del tiempo (por ejemplo recuentos celulares diarios). Las células pueden contarse usando un hematocitómetro y un microscopio óptico (por ejemplo, hematocitómetro HyLite, Hausser Scientific). El número de células pueden representarse frente al tiempo para obtener una curva de crecimiento de la población de interés. Preferentemente, las células contadas mediante este método se mezclan primero con el colorante azul de Tripano (Sigma), de tal manera que las células vivas excluyen el colorante, y se cuentan como miembros viables de la población.

45 El contenido de ADN y/o el índice mitótico de las células puede medirse, por ejemplo, basándose en el valor de la ploidía del ADN de la célula. Por ejemplo, las células en la fase G1 del ciclo celular generalmente contienen un valor de ploidía de ADN de 2N. Las células en las que se ha copiado el ADN pero que no han progresado a través de mitosis (por ejemplo, células en fase S) presentarán un valor de ploidía mayor de 2 N y hasta un contenido de ADN de 4 N. El valor de la ploidía y la cinética del ciclo celular puede medirse adicionalmente usando el ensayo con yoduro de propidio (véase, por ejemplo, Turner, T., *et al.*, 1998, *Prostate* 34: 175 81). Como alternativa, la ploidía del ADN puede determinarse por cuantificación de ADN con tinción de Feulgen (que se une al ADN de manera estequiométrica) en un sistema de tinción microdensitométrica computerizada (véase, por ejemplo, Bacus, S., 1989, *Am. J. Pathol.* 135: 783 92). El contenido del ADN puede analizarse por preparación de una propagación cromosómica (Zabalou, S., 1994, *Hereditas.* 120: 127 40; Pardue, 1994, *Meth. Cell Biol.* 44: 333 351).

55 La expresión de las proteínas del ciclo celular (por ejemplo, CycA, CycB, CycE, CycD, cdc2, Cdk4/6, Rb, p21 o p27) proporciona información crucial con respecto al estado proliferativo de una célula o población de células. Por ejemplo, la identificación en una ruta de señalización antiproliferativa puede indicarse por la inducción de p21cip1. Niveles aumentados de la expresión de p21 en células producen retraso de entrada en la fase G1 del ciclo celular (Harper *et al.*, 1993, *Cell* 75: 805 816; Li *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6: 189 199). La inducción de p21 puede identificarse por inmunotinción usando un anticuerpo anti-p21 específico disponible en el comercio (por ejemplo, de Santa Cruz, Inc.). De manera similar, las proteínas del ciclo celular pueden examinarse mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos disponibles en el comercio. En otro caso, las poblaciones de células se sincronizan

antes de la detección de una proteína del ciclo celular. Las proteínas del ciclo celular también pueden detectarse por análisis FACS (separación de células activada por fluorescencia) usando anticuerpos contra la proteína de interés.

5 La detección de cambios en cuanto a la duración del ciclo celular o a la velocidad del ciclo celular también puede usarse para medir la inhibición de la proliferación celular por un péptido. En un caso la duración del ciclo celular se determina duplicando el tiempo de una población de células (por ejemplo usado células en contacto o sin contacto con uno o más péptidos de la invención). En otro caso, se usa análisis FACS para analizar la fase de progresión del ciclo celular, o purificar fracciones de G1, S y G2/M (véase, por ejemplo, Delia, D. *et al.*, 1997, *Oncogene* 14: 2137 47).

10 El lapsus de uno o más puntos de control del ciclo celular y/o la inducción de uno o más puntos de control del ciclo celular, pueden examinarse mediante los métodos descritos en el presente documento, o mediante cualquier método conocido en la técnica. Sin limitación, un punto de control del ciclo celular es un mecanismo que garantiza que se produzcan determinados acontecimientos celulares en un orden particular. Los genes de los puntos de control se definen por mutaciones que permiten que se produzcan acontecimientos tardíos sin una previa terminación de un acontecimiento anterior (Weinert, T., y Hartwell, L., 1993, *Genetics*, 134: 63 80). La inducción o inhibición de los genes de los puntos de control del ciclo celular puede ensayarse, por ejemplo, por análisis de transferencia de Western o por inmunotinción, etc. El lapsus de los puntos de control del ciclo celular puede evaluarse adicionalmente mediante la progresión de una célula a través del punto de control sin que previamente se produzcan acontecimientos específicos (por ejemplo, la progresión en mitosis sin replicación completa del ADN genómico).

20 Además de los efectos de expresión de una proteína particular del ciclo celular, la actividad y las modificaciones postraduccionales de las proteínas implicadas en el ciclo celular pueden desempeñar una función integral en la regulación y estado proliferativo de una célula. Se describen ensayos implicados en detectar modificaciones postraduccionales (por ejemplo, fosforilación) mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos que detectan restos de tirosina fosforilados se encuentran disponibles en el comercio, y pueden usarse análisis de transferencia de Western para detectar proteínas con dichas modificaciones. En otro ejemplo, pueden detectarse modificaciones tales como miristoilación con cromatografía de capa fina o con h.p.l.c. de fase inversa (véase, por ejemplo, Glover, C., 1988, *Biochem. J.* 250: 485 91; Paige, L., 1988, *Biochem. J.*; 250: 485 91).

25 La actividad de señalización de las proteínas y/o complejos de proteínas y del ciclo celular a menudo está mediada por una actividad quinasa. Se describen análisis de actividad quinasa mediante ensayos tales como el ensayo con histona H1 (véase, por ejemplo, Delia, D. *et al.*, 1997, *Oncogene* 14: 213747).

30 También puede demostrarse que los péptidos usados en el método alteran la proliferación celular en células cultivadas *in vitro* usando métodos muy conocidos en la técnica. Ejemplos específicos de modelos de cultivo celular incluyen, sin limitación, para cáncer de pulmón, líneas de células tumorales primarias de pulmón de rata (Swafford *et al.*, 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17: 1366 1374) y de células de cáncer indiferenciadas de células grandes (Mabry *et al.*, 1991, *Cancer Cells*, 3: 53 58); líneas de células colorrectales para cáncer de colon (Park y Gazdar, 1996, *J. Cell Biochem. Supl.* 24: 131 141); líneas de células establecidas múltiples para cáncer de mama (Hambly *et al.*, 1997, *Breast Cancer Res. Treat.* 43: 247 258; Gierthy *et al.*, 1997, *Chemosphere* 34: 1495 1505; Prasad y Church, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 14 19); diversos modelos de células bien caracterizadas para cáncer de próstata (Webber *et al.*, 1996, *Prostate*, Parte 1, 29: 386 394; Parte 2, 30: 58 64; y Parte 3, 30: 136 142; Boulikas, 1997, *Anticancer Res.* 17: 1471 1505); para cánceres genitourinarios, líneas de células continuas de cáncer de vejiga humano (Ribeiro *et al.*, 1997, *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 11 20); cultivos de órganos de carcinomas de células transicionales (Booth *et al.*, 1997, *Lab Invest.* 76: 843 857) y modelos de progresión en la rata (Vet *et al.*, 1997, *Biochim. Biophys. Acta* 1360: 39 44); y líneas de células establecidas para leucemias y linfomas (Drexler, 1994, *Leuk Res.* 18: 919 927, Tohyama, 1997, *Int. J. Hematol.* 65: 309 317).

45 También puede demostrarse que los péptidos inhiben la transformación celular (o progresión al fenotipo canceroso) *in vitro*. Las células con un fenotipo celular transformado se ponen en contacto con uno o más péptidos, y se examina el cambio de las características asociadas con un fenotipo transformado (un conjunto de características *in vitro* asociadas con una capacidad tumorigénica *in vivo*), por ejemplo, pero sin limitación, la formación de colonias en agar blando, una morfología celular más redonda, una adhesión al sustrato más laxa, pérdida de inhibición al contacto, pérdida de dependencia de anclaje, liberación de proteasas tales como activador de plasminógeno, transporte de azúcar aumentado, demanda de suero disminuida, o expresión de antígenos fetales, etc. (véase Luria *et al.*, 1978, *General Virology*, 3ª Ed., John Wiley y Sons, Nueva York, páginas 436446).

55 La pérdida de invasividad o adhesión disminuida también puede usarse para demostrar los efectos anticancerosos de los péptidos usados en el método. Por ejemplo, un aspecto crítico de la formación de un cáncer metastásico es la capacidad de una célula precancerosa o cancerosa para separarse del sitio primario de la enfermedad y para establecer una nueva colonia de crecimiento en un sitio secundario. La capacidad de una célula para invadir sitios periféricos refleja una posibilidad de un estado canceroso. La pérdida de invasividad puede medirse mediante diversas técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, la inducción de la adhesión de célula a célula mediada por E-cadherina. Dicha adhesión mediada por E-cadherina puede producir reversión fenotípica y pérdida de invasividad (Hordijk *et al.*, 1997, *Science* 278: 1464 66).

La pérdida de invasividad puede examinarse adicionalmente por inhibición de la migración celular. En el comercio se dispone de una diversidad de matrices celulares bidimensionales y tridimensionales (Calbiochem-Novabiochem Corp. San Diego, Calif.). La migración celular a través, o dentro, de una matriz puede examinarse al microscopio, fotografía o videografía de lapso de tiempo, o mediante cualquier método de la técnica que permita medir la migración celular. En un caso relacionado, la pérdida de invasividad se examina por respuesta al factor de crecimiento hepatocitario (HGF). La dispersión celular inducida por el HGF está correlacionada con invasividad de células tales como células renales caninas de Madin-Darby (MDCK). Este ensayo identifica una población de células que ha perdido la actividad de dispersión celular en respuesta al HGF (Hordijk *et al.*, 1997, *Science* 278: 1464-66).

Como alternativa, la pérdida de invasividad puede medirse por migración celular a través de una cámara de quimiotaxis (Neuroprobe/Precision Biochemicals Inc. Vancouver, BC). En dicho ensayo, un agente quimioatrayente se incuba en un lado de la cámara (por ejemplo, en la parte inferior de la cámara) y se siembran células en un filtro de separación del lado opuesto (por ejemplo, la cámara superior). Para que las células pasen desde la cámara superior a la cámara inferior, deben migrar activamente a través de pequeños poros en el filtro. Después, un análisis de tablero de ajedrez del número de células que ha migrado puede correlacionarse con la invasividad (véase, por ejemplo, Ohnishi, T., 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 518-25).

También puede demostrarse que los péptidos usados en el método inhiben la formación de tumores *in vivo*. En la técnica se conoce una gran cantidad de modelos animales de trastornos hiperproliferativos, incluyendo la tumorigénesis y la propagación metastásica (véase la Tabla 317-1, Capítulo 317, "Principles of Neoplasia," en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13ª Edición, Isselbacher *et al.*, eds., McGraw-Hill, N. Y., página 1814, y Lovejoy *et al.*, 1997, *J. Pathol.* 181: 130-135). Los ejemplos específicos incluyen, para cáncer de pulmón, el trasplante de nódulos tumorales en ratas (Wang *et al.*, 1997, *Ann. Thorac. Surg.* 64: 216-219) o el establecimiento de metástasis de cáncer de pulmón en ratones SCID con empobrecimiento de células NK (Yono y Sone, 1997, *Gan To Kagaku Ryoho* 24: 489-494); para cáncer de colon, el trasplante de células de cáncer de colon humano en ratones desnudos con cáncer de colon (Gutman y Fidler, 1995, *World J. Surg.* 19: 226-234), el modelo de titi de cabeza de algodón de colitis ulcerosa humana (Warren, 1996, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Sup 12: 45-47) y modelos de ratón con mutaciones del supresor tumoral de la poliposis adenomatosa (Polakis, 1997, *Biochim. Biophys. Acta* 1332: F127-F147); para cáncer de mama, modelos transgénicos de cáncer de mama (Dankort y Muller, 1996, *Cancer Treat. Res.* 83: 71-88; Amundadittir *et al.*, 1996, *Breast Cancer Res. Treat.* 39: 119-135) e inducción química de tumores en ratas (Russo y Russo, 1996, *Breast Cancer Res. Treat.* 39: 7-20); para cáncer de próstata, modelos de roedores transgénicos e inducidos químicamente, y modelos de xenoinjerto humano (Royai *et al.*, 1996, *Semin. Oncol.* 23: 35-40); para cánceres genitourinarios, neoplasmas de vejiga inducidos en ratas y ratones (Oyasu, 1995, *Food Chem. Toxicol.* 33: 747-755) y xenoinjertos de carcinomas de células transicionales humanas en ratones desnudos (Jarrett *et al.*, 1995, *J. Endourol.* 9: 17); y para cánceres hematopoyéticos, médula alogénica trasplantada en animales (Appelbaum, 1997, *Leukemia* 11 (Supl. 4): S15-S17). Además, se han descrito modelos animales generales aplicables a muchos tipos de cánceres, incluyendo, pero sin limitación, el modelo de ratón p53 deficiente (Donehower, 1996, *Semin. Cancer Biol.* 7: 269-278), el ratón Min (Shoemaker *et al.*, 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, 1332: F25-F48) y respuestas inmunitarias a tumores en la rata (Frey, 1997, *Methods*, 12: 173-188).

Por ejemplo, un péptido a usar en el método puede administrarse a un animal de ensayo, a un animal de ensayo predispuesto a desarrollar un tipo de tumor, y posteriormente el animal de ensayo puede examinarse para detectar una frecuencia disminuida de la formación del tumor en comparación con un animal al que no se administra al péptido. Como alternativa, un péptido puede administrarse a animales de ensayo que tienen tumores (por ejemplo, animales en los que los tumores se han inducido por introducción de células malignas, neoplásicas o transformadas o por administración de un carcinógeno) y posteriormente examinarse los tumores en los animales de ensayo con respecto a la regresión tumoral en comparación con animales a los que no se administra el péptido.

## 8. Uso terapéutico

### A. Modulación de mediadores de la respuesta corporal

Un experto habitual en la técnica reconocerá que los péptidos pueden usarse para modular los efectos de la respuesta corporal contra una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular. En particular, un ejemplo de mediadores de los péptidos indicados anteriormente que puede usarse para modular son los moduladores inflamatorios, incluyendo pero sin limitación, mediadores inflamatorios derivados de plasma, tales como bradiquininas, C3, C5a, Factor XII, complejo de ataque a membrana, factor de Hageman, plasmina, trombina, linfocinas (factor activador de macrófagos (MAF), factor de inhibición de la migración de macrófagos (MMIF), factor quimiotáctico de macrófagos (MCF), factor de inhibición de la migración de leucocitos (LMIF), factores liberadores de histamina (HRF) y factor de transferencia (TF)); interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, ... IL-15); factores de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$  (caquectina), TNF- $\beta$  (linfotóxina)); Interferones (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ ); factores estimuladores de colonias (factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), y factor estimulador de multi colonias (IL-3)); factores de crecimiento de polipéptidos (factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)); factores de crecimiento transformantes (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ),  $\alpha$ -Quimiocinas (IL-8, proteína 2 activadora de

neutrófilos (NAP-2), factor 4 plaquetario (PF-4) y  $\beta$ -tromboglobulina ( $\beta$ TG));  $\beta$ -Quimiocinas (proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , proteína 1 $\beta$  inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ), quimiocina regulada por activación expresada y presumiblemente secretada por linfocitos T normales (RANTES)) y proteínas de Estrés (proteínas de choque térmico (HSP), proteínas relacionadas con glucosa (GSP), ubiquitina y superóxido dismutasa (Mn)), factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), proteína básica plaquetaria (PBP), gránulos de lisosomas, histamina, serotonina, leucotrieno B4, óxido nítrico y/o prostaglandinas. Preferentemente los péptidos inhiben o suprimen la actividad de los mediadores y más preferentemente inhiben la actividad de TNF- $\alpha$ , histamina, óxido nítrico e interleucinas. Más preferentemente, los péptidos inhiben la actividad de dos o más mediadores inflamatorios.

## 10 B. Tratamiento o prevención de diversas enfermedades, trastornos y afecciones

Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido también son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades, trastornos y afecciones. Un experto en la técnica reconocería también que dichos péptidos y análogos peptídicos pueden usarse para conseguir la modulación de un complejo receptor protector de tejido, por ejemplo, un complejo de citocina protector tisular. Las técnicas que pueden usarse para evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* las indicaciones terapéuticas, por ejemplo, de los compuestos identificados por los ensayos de la invención desvelados anteriormente, se desvelan en la Solicitud PCT N° PCT/US01/49479, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/188.905 y 10/185.841.

Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido anteriormente mencionados pueden usarse generalmente para la prevención, el tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de enfermedades o trastornos humanos del sistema nervioso central o sistema nervioso periférico, que tienen síntomas principalmente neurológicos o psiquiátricos, enfermedades oftálmicas, enfermedad cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, urinarias y reproductoras, enfermedades óseas, enfermedades de la piel, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas. Los ejemplos de su uso incluyen, pero sin limitación, protección contra, y reparación de, lesiones resultantes de traumatismo y de inflamación en el cerebro (ictus isquémico, traumatismo romo, hemorragia subaracnoidea), médula espinal (isquemia, traumatismo por fuerza roma), nervios periféricos (lesión del nervio ciático, neuropatía diabética, síndrome del túnel carpiano), retina (edema macular, retinopatía diabética, glaucoma) y corazón (infarto de miocardio, cardiopatía crónica). En particular, dichas enfermedades, trastornos o afecciones incluyen afecciones hipóxicas, que afectan adversamente a tejidos sensibles, tales como tejidos excitables que incluyen, pero sin limitación, los indicados anteriormente en la Sección 4.2 (xiii), o a las células, tejidos u órganos sensibles, a las que expresan el receptor de citocina de Tipo 1 apropiado por ejemplo, el receptor EPO-R o al complejo receptor protector de tejido. Por lo tanto, los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido pueden usarse para tratar o prevenir daños a tejidos sensibles resultantes de afecciones hipóxicas en una variedad de afecciones y circunstancias. En la tabla del presente documento, más adelante, se proporcionan ejemplos no limitantes de dichas afecciones y circunstancias.

Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido son también de interés en la modulación de la actividad de las células madre. Está bien establecido que las citocinas que presentan actividad protectora tisular, por ejemplo EPO, son capaces de movilizar células madre, estimulando la migración a regiones de lesión y ayudando en los procesos de reparación, por ejemplo, en una función regenerativa. Por ejemplo, en ictus experimental, la EPO media la migración de neuroblastos en una región de lesión isquémica para regenerar neuronas durante el periodo de recuperación (Tsai *et al*, J. Neurosci (2006) 26: 1269-74). Como otro ejemplo, la EPO y la EPO carbamilada (CEPO) movilizan células progenitoras endoteliales de la médula ósea en la circulación. Estas células después se anidan en regiones distantes y están implicadas en la formación de nuevos vasos sanguíneos (para efecto de EPO, véase Bahlmann *et al*, 2003, Kidney Int. 64: 1648-1652). Aunque sin desear quedar relacionado a ninguna teoría particular, se piensa que los péptidos y análogos peptídicos aislados desvelados en el presente documento tienen un efecto similar sobre la migración de las células madre.

En el ejemplo de la protección de patologías del tejido neuronal tratable y prevenible usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido, dichas patologías incluyen las que dan como resultado la oxigenación reducida de tejidos neuronales. Cualquier afección que reduzca la disponibilidad de oxígeno en el tejido neuronal, resultante en estrés, lesión y finalmente muerte celular neuronal, puede tratarse usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido. Generalmente denominadas como hipoxia y/o isquemia, estas afecciones surgen de, o incluyen, pero sin limitación, ictus, oclusión vascular, privación de oxígeno prenatal o postnatal, sofoco, asfixia, ahogamiento, envenenamiento con monóxido de carbono, inhalación de humo, traumatismo, incluyendo cirugía y radioterapia, asfixia, epilepsia, hipoglucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, síndrome de distrés respiratorio en adultos, choque hipotensivo, choque séptico, choque anafiláctico, choque por insulina, enfermedad de células falciformes, parada cardíaca, disritmia, narcosis de nitrógeno, hipoxia hipoxémica (mareo por altitud, edema pulmonar por alta altitud, edema cerebral por alta altitud, apnea del sueño, hipopnea, parada respiratoria, derivaciones), metahemoglobinemia, hipoxia histotóxica, hipoxia intrauterina y déficits neurológicos causados por procedimientos de derivación cardíaca pulmonar.

Por ejemplo, los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido identificados usando los ensayos indicados anteriormente pueden administrarse solos o como parte de una composición para prevenir los daño o lesión tisular

5 resultante de riesgo de daño o lesión tisular antes de, durante o posterior a un procedimiento quirúrgico o un procedimiento químico. Por ejemplo, los procedimientos quirúrgicos pueden incluir resección de tumores o reparación de aneurisma y procedimientos médicos pueden incluir el parto o alumbramiento. Otras patologías causadas por o resultantes de hipoglucemia que pueden tratarse usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido incluyen sobredosis de insulina, también denominada hiperinsulinemia iatrogénica, insulinoma, déficit de la hormona del crecimiento, hipocortisolismo, sobredosis de fármacos y determinados tumores.

10 Otras patologías resultantes de daño tisular neuronal excitable incluyen trastornos convulsivos, tales como epilepsia, convulsiones o trastornos convulsivos crónicos. Otras afecciones y enfermedades tratables incluyen, pero sin limitación, enfermedades tales como ictus, esclerosis múltiple, hipotensión, parada cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis cerebral, traumatismo cerebral o de médula espinal, demencia por SIDA, pérdida de función cognitiva relacionada con la edad, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos convulsivos, alcoholismo, isquemia retinal, lesión en el nervio óptico resultante de glaucoma y pérdida neuronal.

15 Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido específicos pueden usarse para tratar o prevenir la inflamación resultante de afecciones o enfermedades de diversos traumatismos tales como inflamación física o químicamente inducida. Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido también se contemplan para el tratamiento y prevención de afecciones inflamatorias en uno o más órganos o tejidos incluyendo, pero sin limitación, cerebro, médula espinal, tejido conectivo, corazón, pulmón, riñón y tracto urinario, páncreas, ojos y próstata. Los ejemplos no limitantes dichos traumatismos incluyen, pero sin limitación los indicados en la Sección 4.2 (xvi). Además los péptidos protectores de tejido pueden usarse para tratar o prevenir la inflamación resultante de afecciones isquémicas y no isquémicas que incluyen, pero sin limitación, alergias, enfermedades alérgicas, síntomas alérgicos, enfermedades reumáticas, lesiones relacionadas con el deporte, exposición a agentes tóxicos, infecciones incluyendo infección viral, fúngica, bacteriana, ejemplos adicionales de dichas afecciones se desvelan anteriormente en la Sección 4.2 (iv), (v) y (xvi). La inflamación puede ser aguda o crónica. Otras aplicaciones en el campo de la inflamación se indican en el documento PCT/US2004/031789 presentado el 29 de septiembre de 2004 y publicada como WO 2005/032467.

25 Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido específicos pueden usarse para tratar enfermedades del sistema nervioso central y periférico resultantes de desmielinización o disfunción de la vaina de mielina. Se define principalmente que estas enfermedades implican las lesiones de la vaina miélica inflamatoria de origen desconocido, con la excepción de las enfermedades por déficit de mielinización, tales como leucodistrofia y enfermedades debido a causas obvias. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad típica entre las enfermedades desmielinizantes y patológicamente, se caracteriza por cambios, principalmente, desmielinización inflamatoria y gliosis. Dado que su etiología es desconocida, su diagnóstico se realiza basándose en sus características clínicas, es decir, multiplicidad espacial y multiplicidad a lo largo del tiempo de lesiones del sistema nervioso central. Además, la encefalomielitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria, encefalomielitis hemorrágica necrotizante aguda y subaguda y mielitis transversal se incluyen en enfermedades desmielinizantes. Además, los tejidos nerviosos periféricos necesitan células de Schwann para mantener la vaina de mielina, si estas células se alteran, se produce la enfermedad desmielinizante periférica.

30 Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido pueden usarse para tratar o prevenir afecciones de, y lesiones en el corazón que incluyen cualquier evento patológico crónico o agudo que implique el corazón y/o tejido asociado (por ejemplo, el pericardio, la aorta y otros vasos sanguíneos asociados), incluyendo lesión por isquemia-reperusión; insuficiencia cardíaca congestiva; parada cardíaca, infarto de miocardio, aterosclerosis, filtración de válvula mitral, aleteo auricular, cardiotoxicidad causada por compuestos tales como fármacos (por ejemplo, doxorrubicina, herceptina, tioridacina y cisaprida); lesión cardíaca debido a infección parasitaria (bacterias, hongos, rickettsias y virus, por ejemplo, sífilis, infección crónica por *Trypanosoma cruzi*); amiloidosis cardíaca fulminante; cirugía cardíaca; trasplante cardíaco; angioplasia; cirugía por laparoscopia, lesión cardíaca traumática (por ejemplo penetrante o lesión cardíaca roma y rotura de válvula aórtica), reparación quirúrgica de un aneurisma aórtico torácico; un aneurisma aórtico suprarrenal, choque cardiogénico debido a infarto de miocardio o disfunción cardíaca; choque neurogénico y anafilaxis. Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido también pueden usarse para tratar aquellos individuos que están en riesgo de enfermedad cardíaca tal como disfunción cardíaca (es decir, cuando el corazón no es capaz de bombear sangre a una velocidad necesaria por los tejidos metabolizantes o cuando el corazón puede hacerlo únicamente con una presión de carga elevada). Dichos pacientes en riesgo incluirían pacientes que tienen o están en riesgo de tener infarto cardíaco, enfermedad de arteria coronaria, miocarditis, quimioterapia, cardiomiopatía, hipertensión, enfermedades cardíacas valvulares (más frecuentemente insuficiencia mitral y estenosis aórtica) y cardiomiopatía inducida por toxinas (por ejemplo, etanol, cocaína, etc.) y similares.

50 Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido pueden usarse para tratar o prevenir afecciones de, y lesiones en, los ojos, por ejemplo, tejido retinal. Dichos trastornos incluyen, pero sin limitación, isquemia retinal, degeneración macular, desprendimiento de retina, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, bloqueo de arteria retinal, bloqueo de vena retinal, edema retinal, hipotensión y retinopatía diabética.

Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido pueden usarse para prevenir o tratar lesiones resultantes de exposición a agentes tóxicos; es decir radiación o lesión química a tejido sensible. Los péptidos indicados anteriormente son útiles como agentes terapéuticos para modular los mediadores de la respuesta corporal frente a agentes tóxicos, preferentemente para suprimir o inhibir la actividad de dichos moduladores. Adicionalmente, los péptidos indicados anteriormente son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento, prevención, mejora o control de enfermedades, efectos o síntomas de exposición a un agente tóxico. Los péptidos pueden usarse para tratar la exposición a diversos agentes tóxicos, incluyendo agentes biológicos, químicos o de radiación.

Estos péptidos pueden usarse para tratar lesiones, efectos o síntomas debidos a agentes biológicos tales como priones, virus, microorganismos (bacterias y hongos) y algunos eucariotas unicelulares y multicelulares (es decir, parásitos), incluyendo, pero sin limitación, las toxinas biológicas indicadas anteriormente en la Sección 4.2 (viii). Además, los péptidos pueden usarse para prevenir, tratar, mejorar o controlar los daños, efectos o síntomas debidos a agentes químicos. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes sanguíneos, agentes vesiculantes, agentes nerviosos, agentes pulmonares y agentes incapacitantes. Adicionalmente, los péptidos pueden usarse para prevenir, tratar, mejorar o controlar daños, efectos o síntomas debidos a exposición tóxica a productos químicos industriales incluyendo, pero sin limitación, los indicados en la Sección 4.2 (x). Los daños, efectos o síntomas debidos a exposición a un agente de radiación son prevenibles, tratables o gestionables usando los péptidos. Los péptidos pueden prevenir, tratar, mejorar o controlar los daños, efectos o síntomas debidos a agentes radiactivos que incluyen radiación alfa, beta o gamma, y más particularmente pueden incluir, pero sin limitación, <sup>137</sup>Cs, <sup>60</sup>Co, <sup>241</sup>Am, <sup>252</sup>Cf, <sup>192</sup>Ir, <sup>238</sup>Pu, <sup>90</sup>Sr, <sup>226</sup>Ra, <sup>91</sup>Sr, <sup>92</sup>Sr, <sup>95</sup>Zr, <sup>99</sup>Mo, <sup>106</sup>Ru, <sup>131</sup>Sb, <sup>132</sup>Te, <sup>139</sup>Te, <sup>140</sup>Ba, <sup>141</sup>La, <sup>144</sup>Ce, <sup>233</sup>U, <sup>235</sup>U, <sup>238</sup>U, <sup>228</sup>P, <sup>229</sup>P, <sup>230</sup>P, <sup>231</sup>P, <sup>232</sup>P, <sup>233</sup>P, <sup>234</sup>P, <sup>235</sup>P, <sup>236</sup>P, <sup>237</sup>P, <sup>238</sup>P, <sup>239</sup>P, <sup>240</sup>P, <sup>241</sup>P, <sup>242</sup>P, <sup>243</sup>P, <sup>244</sup>P, <sup>245</sup>P, <sup>246</sup>P, <sup>247</sup>P y <sup>131</sup>I. Además, un experto habitual en la técnica reconocerá que los péptidos también pueden usarse para prevenir, mediar, tratar o mejorar los daños, efectos o síntomas debidos al uso acumulativo o sinérgico de estos agentes tóxicos (es decir, el uso de un agente radiactivo antes de dispensar un agente biológico de tal manera que la víctima será más susceptible al agente biológico, administrando un agente vesicante junto con un agente nervioso para impedir que las víctimas busquen efectivamente refugio o ayuda, contaminando las balas o la metralla con agentes biológicos o radiactivos para inhibir o complicar el proceso de curación, etc.). Preferentemente, los péptidos podrán tratar, mediar, mejorar o prevenir efectos tóxicos en diversos tipos diferentes de células, órganos o tejidos, por ejemplo en dos o más de los siguientes sistema nervioso central, nervioso periférico, oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratorio, renal, urinario, reproductor, musculoesquelético, piel, tejido conectivo, gastrointestinal, hematopoyético, endocrino y metabólico. Además, un péptido sería eficaz como agente terapéutico o preventivo para más de un agente tóxico de la misma clase (es decir contra más de un tipo de agente químico, biológico o radiactivo - un preventivo contra un agente vesicante y nervioso por ejemplo) o diferentes clases de agentes tóxicos (es decir un producto terapéutico para exposición a un agente radiactivo y un agente químico). Una utilidad adicional de los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido es en el tratamiento del envenenamiento, tal como envenenamiento por neurotoxina (por ejemplo, intoxicación por ácido domoico de marisco), toxinas (etanol, cocaína, etc.), como resultado de agentes quimioterapéuticos o exposición a radiación; neurolatrismo; enfermedad de Guam; esclerosis amiotrófica lateral; y enfermedad de Parkinson.

Como se ha mencionado anteriormente, se describen péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido para su uso en la potenciación de la función tisular en células, tejidos y órganos sensibles en un mamífero por administración periférica de un péptido protector de tejido como se ha descrito anteriormente. Diversas enfermedades y afecciones son susceptibles a tratamiento usando este método. Por ejemplo este método es útil para potenciar la función en tejidos excitables dando como resultado un aumento de la función cognitiva incluso en ausencia de una afección o enfermedad. Además, las citocinas protectoras de tejido son útiles para mejorar la calidad de la cicatrización, reducir el tiempo requerido para curar, mejorar la calidad de los tejidos curados y reducir la frecuencia de adhesiones resultantes de la herida. Véase el documento PCT/US2004/031789 presentado el 29 de septiembre de 2004 y publicado como WO 2005/032467. Además, los péptidos protectores de tejido pueden ser útiles en el tratamiento, prevención o control de las lesiones de la piel o a lo largo de las rutas respiratorias inducidas por agentes químicos mediante un agente ampollante o vesicante o productos químicos industriales.

Estos usos de los péptidos se describen con mayor detalle más adelante e incluyen la potenciación del aprendizaje y entrenamiento en mamíferos tanto humanos como no humanos.

Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido pueden ser útiles generalmente para la prevención, tratamiento terapéutico, tratamiento profiláctico o control de diversos cánceres o trastornos neoplásicos del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, sistema gastrointestinal/digestivo, sistema genitourinario, adrenal, ginecológico, cabeza y cuello, hematológico/sangre, musculoesquelético/tejido blando, respiratorio y mama. Los ejemplos de uso incluyen, pero sin limitación, protección contra y reparación de lesiones resultantes de cánceres y/o trastornos neoplásicos indicados en la sección 4.2(ix) y (xxv). Además los péptidos pueden usarse para la prevención, tratamiento terapéutico, tratamiento profiláctico o control de diversos síndromes asociados con neoplasmas o cánceres, incluyendo, pero sin limitación los indicados anteriormente en la Sección 4.2 (xxviii). Los péptidos pueden usarse de acuerdo con el método para abordar los síndromes indicados anteriormente. Por ejemplo, los péptidos pueden administrarse para abordar síndromes hereditarios tales como Li Fraumeni, cáncer colorrectal no poliposis hereditario, poliposis adenomatosa familiar y síndrome de Von Hippel-Lindau mediante el retraso de la aparición de los aspectos neoplásicos de la enfermedad, reduciendo el número de crecimientos neoplásicos asociados con el síndrome, o en general potenciando la calidad de vida o la longevidad de los pacientes

que padecen estas afecciones. Los péptidos también pueden administrarse profilácticamente para tratar síndromes relacionados con determinados tratamientos, quimioterapia o radioterapia de los trastornos o cánceres neoplásicos tales como síndrome de privación de andrógeno, síndrome mielodisplásico relacionado con terapia o síndrome de somnolencia, con la esperanza de prevenir los síndromes o reducir la gravedad del síndrome.

- 5 Además, los péptidos pueden usarse para tratar o prevenir caquexia y enfermedades relacionadas con la caquexia. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, caquexia por cáncer, anorexia, astenia, anemia, tuberculosis, SIDA, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, atrofia muscular, diabetes y endotoxemia.

- 10 Las afecciones y enfermedades tratables o prevenibles usando los péptidos protectores y análogos peptídicos protectores de tejido proporcionan el sistema nervioso central incluyen pero sin limitación trastornos anímicos, trastornos de ansiedad, depresión, autismo, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, y disfunción cognitiva. Estas afecciones se benefician de la potenciación de la función neuronal. Otros trastornos tratables incluyen alteración del sueño, por ejemplo, apnea del sueño y trastornos relacionados con los viajes, sangrados subaracnoideos y aneurismales, choque hipotensivo, lesión concusiva, choque séptico, choque anafiláctico y secuelas de diversas encefalitis y meningitis, por ejemplo, cerebritis relacionada con enfermedad tisular conectiva tal como lupus. Otro usos incluyen la prevención de o una protección de envenenamiento por neurotoxinas, tales como intoxicación por ácido domoico de marisco, nerolatirismo y enfermedad de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson; tratamiento postoperatorio para lesión embólica o isquémica; irradiación de cerebro completo, crisis de células falciformes y eclampsia.

- 20 Un grupo adicional de afecciones que pueden tratarse o prevenirse usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido incluyen disfunción mitocondrial de cualquiera de naturaleza hereditaria o adquirida, que es la causa de una variedad de trastornos neurológicos tipificados por lesión neuronal y muerte. Por ejemplo, la enfermedad de Leigh (encefalopatía necrotizante subaguda) se caracteriza por una pérdida visual progresiva y encefalopatía, debido a caída neuronal y miopatía. En estos casos, el metabolismo mitocondrial defectuoso no proporciona los suficientes sustratos de alta energía para administrar el metabolismo de las células excitables. Un péptido o análogo peptídico protector de tejido optimiza la función defectuosa en distintas enfermedades mitocondriales. Como se ha mencionado anteriormente, las condiciones hipóxicas afectan adversamente a los tejidos excitables. Los tejidos excitables incluyen, pero sin limitación, tejidos neuronales tales como tejidos del sistema nervioso periférico (oído y retina) y sistema nervioso central (cerebro y médula espinal); el tejido cardiovascular tal como las células del corazón y nervios asociados; y tejido glandular tal como el páncreas donde los canales de calcio de tipo T junto con las uniones comunicantes de célula a célula participan en la secreción de insulina. Una lista ejemplar de tejidos excitables incluye, pero sin limitación, órganos y tejidos que incluyen nervios, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, útero, sistema nervioso central, médula espinal, cerebro, retina, sistema olfatorio, y sistema auditivo. Además de las afecciones descritas anteriormente, los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido son útiles en el tratamiento de envenenamiento por inhalación tales como inhalación de monóxido de carbono y humo, asma grave, síndrome de distrés respiratorio en adultos, y asfixia y ahogamiento. Más afecciones que crean las condiciones hipóxicas o mediante otros medios inducen tejido sensible, tal como lesión tisular excitable, incluyen hipoglucemia que puede producirse en una dosificación inapropiada de insulina o cuando los neoplasmas producen insulina (insulinoma).

- 40 Diversos trastornos neurofisiológicos que se ha descrito que se originan de lesión tisular excitable son tratables usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejidos. Los trastornos crónicos en los que está implicado el daño neuronal y en los cuales el tratamiento o prevención incluyen trastornos relacionados con el sistema nervioso central y/o sistema nervioso periférico incluyen pérdida de función cognitiva relacionada con la edad y demencia senil, trastornos convulsivos crónicos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, pérdida de memoria, esclerosis amiotrófica lateral, esclerosis múltiple, esclerosis tuberosa, enfermedad de Wilson, parálisis supranuclear cerebral y progresiva, enfermedad de Guam, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedades priónicas, tales como encefalopatías espongiiformes, por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, ataxia de Freidrich y otras ataxias, así como síndrome de Gilles de La Tourette, trastornos de convulsión tales como epilepsia y trastornos convulsivos crónicos, ictus, traumatismo cerebral o espinal, demencia por SIDA, alcoholismo, autismo, isquemia retinal, glaucoma, trastornos de la función autonómica, tales como hipertensión y trastornos del sueño y trastornos neuropsiquiátricos que incluyen, pero sin limitación, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno de déficit de atención, trastorno distémico, trastorno depresivo mayor, manía, trastorno obsesivo compulsivo, trastornos por uso de sustancias psicoactivas, ansiedad, trastorno de pánico, así como trastornos afectivos unipolares y bipolares. Los trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos adicionales incluyen, por ejemplo, los indicados en los listados en la American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM).

- 60 Un grupo adicional de afecciones tratables o prevenibles usando los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido incluyen enfermedades renales tales como disfunción renal, aguda y crónica. El aporte de sangre a los riñones puede limitarse debido a diversas causas que incluyen choque de infecciones que invaden la corriente sanguínea (septicemia), hemorragia interna o externa, pérdida de fluido del cuerpo como resultado de diarrea grave o quemaduras, reacciones a transfusiones, parada cardíaca o arritmias, traumatismo quirúrgico y trasplante renal. El flujo de sangre reducido a los riñones resultantes de las afecciones anteriores puede reducir el flujo sanguíneo a

- 5 niveles peligrosamente bajos durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo como para producir el desarrollo de disfunción renal aguda. El flujo sanguíneo reducido también da como resultado la necrosis o muerte tisular, en los riñones, lesionando las células tubulares renales. La enfermedad renal puede resultar de enfermedades (intersticiales y diabéticas), síndromes nefróticos, infecciones, lesión (inducida por CPB), toxinas (ciclosporina inducida por quimioterapia, inducida por contrastes), inflamación autoinmunitaria (por ejemplo Lupus, eritrocitosis, etc.). Los péptidos y análogos peptídicos de tejido ayudan a reparar o a prevenir esta lesión ayudando a mejorar la disfunción renal aguda. Además, los péptidos pueden usarse para tratar, prevenir o mejorar enfermedades o afecciones del tracto urinario que incluyen, sin limitación, infecciones del tracto urinario, vejiga irritable y traumatismo o lesión por radiación en la vejiga.
- 10 La siguiente tabla enumera indicaciones no limitativas ejemplares adicionales como las diversas afecciones y enfermedades que pueden tratarse con el tratamiento de los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido mencionados anteriormente.

**TABLA I**

Enfermedades y trastornos sensibles a tratamiento mediante los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido

<b>Células, tejido u órgano</b>	<b>Disfunción o patología</b>	<b>Afección o enfermedad</b>	<b>Tipo</b>
Corazón	Isquemia	Enfermedad de arteria coronaria	Agudo, crónico Estable, inestable
		Infarto de miocardio	Síndrome de Dressler
		Angina	
		Enfermedad cardíaca congénita	Cardiomiopatía Valvular
		Angina de Prinzmetal	
		Rotura cardíaca	Aneurismático
		Angiitis	
	Arritmia	Taqui-, bradiarritmia supraventricular, anomalías de la Conducción ventricular	Estable, inestable Hipersensible nodo de seno carótido
		Disfunción cardíaca congestiva	Biventricular, ventrículo derecho, ventrículo izquierdo, sistólico, diastólico
	Lesión por radiación	Miocarditis y pericarditis	Autoinmunitaria, infecciosa idiopática
		Cor pulmonar	
	Traumatismo romo y penetrante	Adhesiones intratorácicas de cirugía, infecciones o inflamación	
	Toxinas	Toxicidad por cocaína, adriamicina, metales pesados (cobalto)	
Vascular	Hipertensión	Primario, secundario	
	Enfermedad por descompresión		
	Hiperplasia fibromuscular		
	Aneurisma	Disección, rotura, dilatación	
	Cáncer	Hemangioma hemangioperictioma	Hemangiosarcoma, angiosarcoma

Células, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
Pulmones	Obstructiva	Asma Bronquitis crónica, Enfisema y obstrucción de las vías respiratorias	
	Enfermedad pulmonar isquémica	Embolia pulmonar, trombosis pulmonar, embolia por grasas	
	Enfermedades pulmonares ambientales		
	Enfermedad pulmonar intersticial	Fibrosis pulmonar idiopática	
	Congénita	Fibrosis quística	
	Cor pulmonar		
	Traumatismo		
	Neumonía y neumonitis	Infecciosa (incluyendo Gripe Aviar), parasitaria, tóxica, traumática, quemaduras, aspiración	
	Sarcoidosis		
	Cánceres y precánceres		Carcinoide bronquial, carcinoma de células de avena
	Lesión por radiación		
Páncreas	Endocrino	Diabetes mellitus, tipo I y II	Disfunción de células beta, neuropatía Diabética por disfunción
		Otras disfunciones celulares endocrinas del páncreas	
	Exocrina	Disfunción del páncreas exocrino	Pancreatitis
	Cáncer y precánceres	Adenoma de las células del islote, Insulinoma, gatrinooma	Carcinoma de Células del Islote
Hueso	Osteopenia	Primaria Secundaria	Hipogonadismo Inmovilización Postmenopausia Hiperparatiroidismo relacionado con la Edad Hipertiroidismo Déficit de calcio, magnesio, fósforo y/o vitamina D
	Osteomielitis		
	Necrosis avascular		
	Traumatismo		
	Enfermedad de Paget		
	Cáncer	Osteoma	Osteosarcoma
Piel	Alopecia	Areata	Primaria
		Totalis	Secundaria Alopecia masculina en patrón

Células, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
	Vitíligo	Localizada Generalizada	Primaria Secundaria
	Ulceración	Diabética Decúbito Isquemia	Llagas por presión, Úlceras por presión, úlceras por estar en la cama
	Enfermedad vascular periférica	Infección, autoamputación	
	Heridas quirúrgicas, laceraciones		
	Lesiones por quemadura		
	Lesiones por radiación	Síndrome de radiación cutánea	
	Cánceres y precánceres	Nevus, papiloma, queratosis seborreica, tumores adnexales de piel	Melanoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma epidermoideo, carcinoma de células basales y tumores adnexales de piel malignos
Trastornos autoinmunitarios	Lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, Artritis Reumatoide, Glomerulonefritis, Angiitis, Fibromialgia, espondilitis Anquilosante		
	Histiocitosis de Langerhans		
Ojo	Neuritis óptica		
	Lesiones romas y penetrantes, heridas quirúrgicas, infecciones, Sarcoide, enfermedad de Células falciformes, desprendimiento de Retina, arteritis Temporal		
	Isquemia retinal, degeneración Macular, Retinitis pigmentaria, retinopatía Arteriosclerótica, retinopatía Hipertensiva, bloqueo de la arteria Retinal, bloqueo de la vena Retinal, Hipotensión, retinopatía Diabética, glaucoma y edema Macular		
Enfermedades embrionarias y fetales	Asfixia		
	Isquemia		
	Cánceres y precánceres	Mixoma, lunar hidatidiforme	Mixosarcoma, cordoma, coriocarcinoma
SNC	Síndrome de fatiga crónica, síndromes hipoosmolar e hiperosmolar agudo y crónico, SIDA, Demencia, Electrocuación		
	Malaria Cerebral		
	Encefalitis	Rabia, Herpes	
	Meningitis		
	Hematoma subdural		
	Adición a la nicotina		

Células, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
	Abuso de fármacos y abstinencia	Cocaína, heroína, crack, marihuana, LSD, PCP, abuso polifarmacológico, éxtasis, opioides, hipnóticos sedantes, anfetaminas, cafeína, alcohol	
	Trastornos obsesivo compulsivos		
	Trastornos psicóticos y depresivos		
	Trastornos de hiperactividad y déficit de atención		
	Estenosis espinal, mielitis Transversal, Guillian Barré, lesión Traumática de nervios periféricos, médula espinal o cerebro, compresión de la raíz Nerviosa, Compresión por tumores o malformaciones vasculares, golpe de calor		
	Cánceres y precánceres	Ganglioneuroma, meningioma, schwannoma, neurilemmoma	Glioma anaplásico (grados I-III), glioblastoma multiforme (Grado IV), neuroblastoma, meduloblastoma, meningioma maligno, schwannoma maligno
ENT	Tinnitus Síndrome de Meunière Pérdida Auditiva		
	Lesión traumática, barotraumas		
Riñón	Disfunción renal	Aguda, crónica	Vascular/isquémica, enfermedad intersticial, enfermedad renal diabética, síndromes nefríticos, infecciones, lesión, inducido por contraste, inducido por quimioterapia, ciclosporina, Inducido por derivación Cardio Pulmonar inducido por radiación
	Lesión por radiación		
	Púrpura de Henoch Schönlein		
	Cánceres o precánceres	Adenoma Tubular Renal	Carcinoma de Células Renales, hipernefoma
Músculo estriado	Trastornos autoinmunitarios	Miastenia grave Dermatomiositis Polimiositis	
	Miopatías	Metabólicas heredadas, endrocinas y tóxicas	
	Golpe de calor		
	Lesión por aplastamiento		
	Rabdomiolisis		
	Enfermedad mitocondrial		
	Infección	Fascitis necrotizante	
	Cánceres o precánceres	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma

ES 2 539 124 T3

Células, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
Disfunción sexual	Central y periférica (por ejemplo disfunción eréctil)	Impotencia secundaria a medicación, (diabetes)	
Hígado	Hepatitis	Viral, bacteriana, parasitaria	
	Enfermedad isquémica		
	Cirrosis, hígado graso		
	Enfermedades infiltrativas/metabólicas		
	Cánceres o precánceres	Adenoma hepático	Hepatoma: carcinoma hepatocelular
Gastrointestinal	Enfermedad intestinal isquémica		
	Enfermedad intestinal inflamatoria		
	Enterocolitis necrotizante		
	Cicatrización postquirúrgica o perforación	adhesiones abdominales debido a cirugía o infecciones	
	Cánceres o precánceres	Carcinoide	Carcinoide Maligno
Trasplante de órganos	Tratamiento de donante, órgano y receptor	Rechazo de trasplante, rechazo de injerto, función de injerto retardada, enfermedad de injerto frente a huésped	
	Crecimiento de cultivos celulares o tisulares para regeneración de tejido, injerto o trasplante		
Tracto reproductor	Infertilidad	Vascular Autoinmunitaria Anomalías uterinas Trastornos de Implante	
	Cánceres o precánceres		Seminoma, disgerminoma, coriocarcinoma, carcinoma embrionario, tumor sinusal endodérmico, teratocarcinoma, tumores de Seroli-Leydig, arrenoblastoma, tumores de células granulosa, tumores de células hiliares, tumores de células lipídicas
Endocrino	Híper e hipofunción glandular		
	Cánceres o precánceres	Adenoma basófilo, adenoma eosinófilo, adenoma cromóforo, adenoma paratiroideo, hiperplasia de células C, Feocromocitoma	Carcinoma Paratiroideo, carcinoma medular de tiroides, y Feocromocitoma Maligno
General	Choque Caquexia, Cáncer Caquexia	Séptico, hemodinámico Anorexia, Astenia, Anemia	
	Parasitemia	Malaria, tripanosomiasis, Leshmaniosis	

Como se ha mencionado anteriormente, estas enfermedades, trastornos o afecciones son exclusivamente informativas de la serie de beneficios proporcionada por los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido. Por consiguiente, se describe un tratamiento preventivo terapéutico o profiláctico de las consecuencias de traumatismo mecánico o de enfermedades humanas. Se contemplan la prevención o tratamiento terapéutico o profiláctico para enfermedades, trastornos o afecciones del SNC y/o sistema nervioso periférico. La prevención o tratamiento terapéutico o profiláctico en enfermedades, trastornos o afecciones que tienen un componente psiquiátrico se proporciona. Se proporciona la prevención o tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades, trastornos o afecciones que incluyen sin limitación los que tienen un componente oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratorio, renal, urinario, reproductor, gastrointestinal, endocrino o metabólico. Los péptidos pueden ser útiles para la prevención, tratamiento terapéutico, tratamiento profiláctico o control de enfermedades o trastornos asociados con lesiones a tejidos así como lesiones, efectos o síntomas de los mismos en uno o más órganos o tejidos, preferentemente al menos dos, incluyendo, pero sin limitación, el cerebro, médula espinal, tejido conectivo, piel, tracto gastrointestinal, órganos reproductores, hígado, corazón, pulmón, riñón, tracto urinario, páncreas, ojos y próstata.

Los métodos pueden excluir péptidos o indicaciones particulares. Por ejemplo, los péptidos de acuerdo con el Motivo Estructural C pueden excluirse en los métodos en las indicaciones desveladas en los documentos WO 2006/119767 y WO 2007/071248 incluyendo: lesión del nervio postoperatorio; lesión nerviosa por traumatismo; lesión de médula espinal, mielinización desmejorada de fibras nerviosas; lesión postisquémica, ictus; enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; esquizofrenia, demencias; esclerosis múltiple, demencias multifarcto; degeneración nerviosa asociada con diabetes mellitus; degeneración neuromuscular, trastornos que afectan al reloj circadiano o conexiones neuromusculares; trasplante de órgano; trastornos musculares atroficos genéticos o traumáticos; afecciones degenerativas de gónadas, páncreas, riñón, corazón, hígado e intestino; diabetes mellitus de tipo I o II; nefrosis, psicosis; trastornos neuróticos; trastornos de la personalidad; desviaciones y trastornos sexuales; retraso mental; enfermedades en el sistema nervioso y órganos sensoriales; anomalías cognitivas; enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central; degeneraciones cerebrales; estimulación de memoria a corto o largo plazo; enfermedades extrapiramidales y trastornos relacionados con movimientos anómalos; enfermedades neuronales motoras; enfermedades de médula espinal; trastornos del sistema nervioso autónomo, enfermedades del sistema nervioso periférico; neuropatías; trastornos que afectan a estructuras múltiples oculares, trastornos del oído y procesos mastoideos; anomalías de órganos y de tejido blando en recién nacidos; complicaciones de la administración de anestesia u otras sedación en el parto y alumbramiento, enfermedades y lesiones de la piel; lesiones a los nervios y médula espinal; envenenamiento por fármacos; sustancias medicinales y biológicas; trastornos metabólicos; trastornos de glándulas endocrinas; trastornos de metabolismo de purinas y pirimidinas; trastornos óseos; neoplasmas; cánceres; infecciones virales del cerebro; síndrome de Gillian-Barre; síndrome de dolor; autismo y estimulación de la capacidad de aprendizaje. Además, por ejemplo, los péptidos de acuerdo con un Motivo Estructural D pueden excluirse en los métodos en las indicaciones desveladas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.571.787, 5.700.909, 5.696.080, 5.714.459, 6.590.074, 6.559.124, 6.271.196, 6.268.347 y 6.849.602 incluyendo: dolor neuropático debido a neuroma (amputación, transacción nerviosa), compresión nerviosa (neuropatías de atrapamiento o compresión por tumor), traumatismo nervioso (transección por aplastamiento, estiramiento o incompleta); diabetes mellitus; irradiación, isquemia, vasculitis, síndrome post-polio, alcohol, amiloide, toxinas, VIH, hipotiroidismo, uremia, déficits de vitamina, quimioterapia, ddC (Zalcitabina), enfermedad de Fabry, compresión (discal, tumoral, tejido cicatricial), avulsión radicular, inflamación (neuralgia postherpética), contusiones de la médula espinal, tumores de la médula espinal, hemisección de la médula espinal e infarto, tumores y traumatismo del encéfalo, tálamo o corteza cerebral; y enfermedades desmielinizantes incluyendo esclerosis múltiple, leucoencefalitis diseminada aguda, leucoencefalitis multifocal progresiva, leucodistrofia metacromática y leucodistrofia adrenal. Para otro ejemplo, los péptidos de acuerdo con el Motivo Estructural E pueden excluirse en los métodos en las indicaciones desveladas en la Patente de Estados Unidos N° 7.259.146 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20030130197, incluyendo: trastornos neurodegenerativos agudos; isquemia cerebral o infarto incluyendo oclusión embólica y oclusión trombótica; reperfusion después de isquemia aguda; lesión por isquemia hipóxica perinatal; parada cardiaca; hemorragia intracraneal; lesiones intracraneales e intravertebrales y síndrome de niño sacudido de latigazo; trastornos neurodegenerativos crónicos: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, parálisis supranuclear progresiva, degeneración multisistémica, afecciones epilépticas crónicas, enfermedades neuronales motoras, enfermedades priónicas, manifestaciones neurológicas y psiquiátricas asociadas con enfermedades periféricas incluyendo déficit de EPO, pérdida de sangre, disfunción renal, enfermedad renal de última fase, trasplante renal, y otras enfermedades asociadas con anemia incluyendo malignidades/tumores hematológicos y no hematológicos, complicaciones asociadas con quimioterapia y otros fármacos, trastornos hematológicos, trastornos inflamatorios e infecciosos, enfermedades autoinmunitarias sistémicas crónicas, Púrpura de Henoch Schonlein, síndrome urémico hemolítico, lesión por productos químicos, tóxicos, infecciosos y radiación del sistema nervioso, y encefalopatías; pexoplátías; neuropatías; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; ataxia de Friedreich; leucodistrofia metacromática; enfermedad de Refsum; adrenomielloneuropatía; Ataxia-telangiectasia; neuropatía de Djerine-Sottas; síndrome de Lambert-Eaton; y trastornos de los nervios craneales. Como un ejemplo adicional, los péptidos de acuerdo con el Motivo Estructural F pueden excluirse en los métodos en las indicaciones desveladas en el documento WO/2007/052154 incluyendo: inflamación mediada por el sistema inmunitario; enfermedades autoinmunitarias incluyendo tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus insulino dependiente, lupus eritematoso sistémico; enfermedad desmielinizante incluyendo esclerosis múltiple, mielitis transversal, síndrome de Guillain-Barre, y leucoencefalopatía multifocal

progresiva y desmielinización resultante de exposición a organofosfato; artritis; lesión cerebrovascular aguda; lesión de la médula espinal aguda; lesión cerebral aguda; lesión cardiovascular aguda; ictus; lesión por traumatismo; rechazo de trasplante y rechazo de injerto.

5 C. Prevención, tratamiento, mejora o control de los daños, efectos o síntomas de enfermedades, trastornos o afecciones.

Además, el método de tratamiento es útil para prevenir, tratar, mejorar o controlar las lesiones, efectos o síntomas de las enfermedades y trastornos indicados anteriormente. En particular, el método actual de tratamiento puede usarse para abordar síntomas que incluyen, pero sin limitación, caquexia, carcinogénesis, esterilización, formación de cataratas, radiodermatitis, quemaduras beta, quemaduras gamma, pérdida de células (en particular de médula ósea, células del tracto digestivo), lesión en el sistema hematopoyético, gastrointestinal, sistema nervioso central, cardiovascular, piel y/o reproductor, síndrome por radiación aguda (sensación de náuseas, vómitos, malestar general y fatiga, depresión del sistema inmunitario, pérdida de cabello, sangrado incontrolable (boca, debajo de la piel, riñones), diarrea masiva, delirio, coma y muerte), síndrome de radiación crónica, síndrome de radiación cutánea (inflamación, eritema, descamación seca o húmeda, pérdida de pelo, ampollamiento, enrojecimiento, úlcera, daños en las glándulas sebáceas y sudoríparas, atrofia, fibrosis, pigmentación dérmica disminuida o aumentada y necrosis), cefaleas, mareos, náuseas, vómitos, irritación mucosa, disnea, consciencia desmejorada, coma, convulsiones, taqui y bradidisritmias, hipotensión, colapso cardiovascular, acianosis, bradicardia, miosis, salivación excesiva, diarrea, micción involuntaria, fasciculación muscular, parálisis flácida despolarizante inicial, descargas punta y convulsiones, síndrome intermedio, inhibición de estearasa neurotóxica, neuropatía retrasada inducida por organofosfato, eritema, edema, necrosis y vesículas, melanoderma, traqueobronquitis, brocoesposmos, obstrucción bronquial, edema pulmonar hemorrágico, disfunción respiratoria, neumonía bacteriana, eritema ocular, lacrimación, molestias en los ojos, dolor grave en los ojos, blefaroespasmo, iritis, ceguera, supresión de médula ósea, choque de lewisita, necrosis hepática, disfunción renal secundaria a hipoperfusión, sensaciones de quemadura (ojos, nasofaringe, orofaringe), lagrimeo profuso, rinorrea, ronquera al toser, disnea, odinofagia, conjuntivitis, lesión corneal, lesión/edema nasofaringeo, distrés respiratorio debido a inflamación de las estructuras glóticas, secreciones y/o laringoesposmos, síndromes respiratorios agudos, desorientación, modificaciones conductuales y síndrome de disfunción de las vías respiratorias reactivas.

Como se ha mencionado anteriormente, estas enfermedades o trastornos asociados con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos son meramente ilustrativos de la serie de trastornos que pueden abordarse mediante los péptidos usados en el método. Por consiguiente, se describe el tratamiento preventivo, terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos.

Las enfermedades o trastornos asociados con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos pueden tratarse o prevenirse por administración de una cantidad eficaz de un péptido. Los métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno descritos en el presente documento comprenden la etapa de administrar a un sujeto que tiene la enfermedad o trastorno una cantidad de un péptido de la invención eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno. En un caso, se administra una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más péptidos, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

D. Tratamiento junto con otros compuestos terapéuticos para un efecto acumulativo o sinérgico.

Los métodos para tratamiento, mediación, mejora o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos, comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un péptido y otro agente terapéutico adecuado, administrándose cada uno de acuerdo con un régimen adecuado para el medicamento. Esto puede realizarse para conseguir un beneficio aditivo, sinérgico, o de compensación (que contrarreste los efectos secundarios de la terapia) de los efectos de los agentes peptídicos y terapéuticos. Esto incluye la administración simultánea, sustancialmente simultánea o no simultánea del péptido y un agente terapéutico adecuado. La administración no simultánea del péptido y un agente terapéutico adecuado incluye la administración secuencial, alterna y aguda frente a crónica de los péptidos y agentes terapéuticos adecuados. Además, el péptido y el agente terapéutico adecuado pueden administrarse en la misma o en distintas composiciones farmacéuticas, y si se administra en distintas puede administrarse mediante la misma vía de administración o diferentes vías. Los métodos y agentes terapéuticos adecuados pueden incluir, sin limitación, carbamatos (piridostigmina, fisostigmina, aminostigmina, neostigmina, sinostigmina, Epastigmina, Mobam, decarbofurán), anticolinérgicos (trihexifenidilo, benacticina, Biperideno, Escopolamina, aprofeno, atropina, hioscina, adifenina, Caramifeno, pentmetonio, Mecamilamina, Trihexifenidilo) PANPAL, aminofenoles (eserolina), organofosfatos (TEPP, Paraxón, Etil-4-nitrofenilfosfato), tacrina, 7-MEO-TA, hupercina A, Colinesterasas (BuChE, AChE, triesterasa, paraoxonasa), oximas/reactivadores (HI-6, PAM, Obidoxima, Trimedoxima, Metoxima, Hlo-7, BI-6, K048, K033, cloruro de pralidoxime (2-PAM Cl), P2S, TMB4, 2-PAMI), Suramina, Benzodiazepinas, tubocurina, Memantina, Proclidina, Nimodipina, Clonidina, pralidoxima, diazepam, encefalinas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, bicarbonato de sodio, análogos de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol succinato,  $\gamma$ -tocotrienol), superóxido dismutasa/imitador de carlatasa (EUK189), selenio, bencil estiril sulfona, flagelina truncada, estatinas, genisteína, galantamina, hipotermia, 5-androstenediol, CpG-oligodesoxinucleótidos, antimicrobianos, trasplantes de células madre, amifostina, Tempol, isoflavonas, análogos de bencilsulfona, GM-CSF, G-CSF, yoduro de potasio, hidróxido de

aluminio, azul de Prusia, agentes quelantes (dietilentiainapentaacetato (Ca-DTPA), dietilentiainapentaacetato de cinc (Zn-DTPA)), factor de crecimiento de queratinocitos, hormonas peptídicas intestinales, beta glucano, octreotida, pentoxifilina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores del receptor de angiotensina II, formadores de metemoglobina (nitrito de amilo, nitrito de sodio), tiosulfato de sodio, compuestos de cobalto (hidroxicobalamina (Vitamina B12a), toxoides, antitoxinas, vacunas, anticuerpo pasivos, agentes quimioterapéuticos incluyendo, sin limitación, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbacina, procarbicina, etopósidos, campatecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel; Radiación: radiación  $\gamma$ ; Agentes alquilantes; mostazas de nitrógeno: ciclofosfamida, Trofosfamida ifosfamida, Clorambucilo; Nitrosoureas: carmustina (BCNU), Lomustina (CCNU), Alquilsulfonatos de busulfán, Treosulfán; Triacenos: Dacarbacina; compuestos que contienen Platino: cisplatino, carboplatino, Alcaloides de la Planta; alcaloides de la vinca: vincristina, Vinblastina, Vindesina, Vinorelbina; Taxoides: paclitaxel, Docetaxol; Inhibidores de la ADN Topoisomerasa Epipodofilinas: etopósido, Tenipósido, Topotecán, 9-aminocamptotecina, irinotecán (Campto .RTM.), crisnatol; Mitomicinas: Mitomicina C, Mitomicina C; Antimetabolitos, Antifolatos: inhibidores de DHFR: metotrexato, Trimetrexato; Inhibidores de IMP deshidrogenasa: ácido micofenólico, Tiazofurina, Ribavirina EICAR; Inhibidores de la Ribonucleótido reductasa: hidroxiurea; deferoxamina; análogos de Pirimidina: análogos de Uracilo, 5-Fluorouracilo, Floxuridina, Doxifluridina, Ratitrexed; análogos de Citosina: citarabina (ara C) fludarabina arabinósido citosina; análogos de Purina: mercaptopurina, Tioguanina; terapias hormonales; antagonistas de Receptores: antiestrógenos, Tamoxifeno, Raloxifeno de megestrol; agonistas de LHRH: goserelina, acetato de Leuprolida; antiandrógenos: flutamida, bicalutamida; Retinoides/Deltoides, análogos de Vitamina D3: EB 1089, CB 1093, KH 1060; Terapias fotodinámicas: vertoporfina (BPD-MA), fotosensibilizador de Ftalocianina, Demetoxi-hipocrelin A Pc4 (2BA-2-DMHA) Citocinas: Interferón- $\alpha$ , Interferón- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral; inhibidores de isoprenilación: Lovastatina; neurotoxinas dopaminérgicas: ión 1-metil-4-fenilpiridinio; inhibidores del ciclo celular: estaurosporina; Actinomicinas: Actinomicina D, Dactinomicina; Bleomicinas: bleomicina A2, Bleomicina B2, Peplomycin; Antraciclina: daunorrubicina, Doxorubicina (adriamicina), Idarrubicina, Epirubicina, Pirarrubicina, Zorubicina, Mitoxantrona; inhibidores de MDR: verapamilo; inhibidores de  $Ca^{2+}$  ATPasa: taspigargina; inhibidores de TNF- $\alpha$ /inhibidores de angiogénesis talidomida 3-(3,4-dimetoxi-fenil)-3-(1-oxo-1, 3-dihidro-isoindol-2-il)-propionamida (SelCIDs™) ImiDs™, Revlimid™, Actimid™. En otro aspecto, una composición farmacéutica puede incluir un péptido en una formulación con al menos una molécula pequeña que muestra funcionalidad protectora de tejido. Las moléculas pequeñas adecuadas incluyen, pero sin limitación, esteroides (por ejemplo, lazaroides y glucocorticoides), antioxidantes (por ejemplo coenzima Q<sub>10</sub>, ácido alfa lipoico y NADH), enzimas anticatabólicas (por ejemplo, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, neutralizantes catalíticos sintéticos, así como miméticos), derivados de indol (por ejemplo, indoleaminas, carbazoles y carbolinas), agentes neutralizantes de ácido nítrico, adenosina / agonistas de adenosina, fitoquímicos (flavonoides), extractos herbáceos (ginkgo biloba y ácido turmérico), vitaminas (vitaminas A, E y C), inhibidores de aceptores de electrones de oxidasa (por ejemplo, inhibidores de electrones de xantina oxidasa), minerales (por ejemplo, cobre, cinc y magnesio), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, naproxeno, e ibuprofeno) y combinaciones de los mismos. Adicionalmente los agentes incluyen, sin limitación, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, corticosteroides, prednisona e hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenaco e inhibidores de COX-2), beta agonistas, agentes anticolinérgicos y metil xantinas), agentes inmunomoduladores (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, moduladores de receptores de linfocitos T, moduladores de receptores de citocina, agentes de agotamiento de linfocitos T, antagonistas de citocinas, antagonistas de monoquina, inhibidores de linfocitos o agentes anticancerosos), inyecciones de oro, sulfasalacina, penicilamina, agentes antiangiogénicos (por ejemplo, angiostatina), antagonistas de TNF- $\alpha$  (por ejemplo, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ ) y endostatina), dapsona, psoralenos (por ejemplo, metoxaleno y trioxsaleno), agentes antimalaria (por ejemplo, hidroxicloroquina), agentes antivirales, antihistaminas y antibióticos (por ejemplo, eritromicina y penicilina) pueden usarse junto con las actuales composiciones farmacéuticas.

Los presentes métodos para el tratamiento, mediación, mejora o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos pueden comprender adicionalmente la administración de los péptidos junto con métodos de tratamiento tales como quimioterapia, radioterapia (radiación de rayos x, megavoltaje de alta energía (radiación mayor de 1 MeV de energía), haz de electrones, ortovoltaje de radiación de rayos x, radioisótopos emisores de rayos gamma (isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos)), cámaras hiperbáricas, máquina de derivación cardiaca, angioplastia, hipotermia, cirugía, angioplastia, etc. para conseguir los efectos aditivos sinérgicos u offsetting (para contrarrestar los efectos secundarios del método terapéutico) de los efectos del péptido y el método terapéutico. Como un ejemplo, puede administrarse un péptido a un paciente que se ha sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer simultáneamente con quimioterapia o radioterapia. Además, puede administrarse un agente quimioterapéutico o radioterapia antes o después de la administración de un péptido, preferentemente al menos al cabo de una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, más preferentemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses). Adicionalmente, se describen métodos de tratamiento de enfermedades de cáncer o enfermedades neoplásicas con un péptido como una alternativa a la quimioterapia o radioterapia en el que la quimioterapia o la radioterapia se ha demostrado o puede demostrarse que es demasiado tóxica, por ejemplo, dando como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el paciente a tratar. Como alternativa, se describen métodos de tratamiento en los que el péptido se administra antes, simultáneamente con o después del tratamiento con quimioterapia o radiación en un esfuerzo

para prevenir o mejorar los efectos secundarios tóxicos del método de tratamiento. Como se demuestra en el Ejemplo 2, los péptidos administrados de acuerdo con el método actual pueden mejorar los efectos secundarios de quimioterapia con cisplatino de una quimioterapia conocida con cisplatino. Aunque los ejemplos anteriores se refieren a tratamiento de cánceres, se entiende que los péptidos pueden administrarse junto con otros métodos de tratamiento de la técnica para enfermedades o trastornos asociados con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos que incluyen inflamación, y exposición a agentes tóxicos para conseguir resultados sinérgicos, aditivos o de compensación.

#### E. Formulación y administración de péptidos

En un caso, el método proporciona que una composición farmacéutica que comprende un péptido pueda administrarse por vía sistémica para proteger o tratar las células, tejidos u órganos diana. Dicha administración puede ser por vía parenteral, mediante inhalación o por vía transmucosa, por ejemplo, por vía oral, bucal, nasal, rectal, intravaginal, sublingual, ocular, submucosa o transdérmica. Preferentemente, la administración es parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, y también incluye, pero sin limitación, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica y subcutánea.

Para otras vías de administración, tales como mediante el uso de un perfusato, la inyección en un órgano, u otra administración local, se proporcionará una composición farmacéutica que dé como resultado niveles similares de un péptido como se describe anteriormente. Se prefiere un nivel de aproximadamente 15 pM-30 nM.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un caso específico, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o uno estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea extranjera generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluyendo aquellas de vaselina, de origen animal, vegetal o sintético tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similar. Se prefiere una solución salina como transportador cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerol en agua también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similar. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y transportadores tradicionales, tales como triglicéridos. Los compuestos pueden formularse en formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados del ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, amoniaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc. Los ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad de transportador adecuada para proporcionar al paciente la forma de administración correcta. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

También se describen formulaciones para aumentar la adsorción transmucosa de péptidos tales como péptidos de acción prolongada. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral pueden proporcionarse como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o sus derivados, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sus sales. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, etc. Las soluciones y los jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

Un agente activo para administración oral puede recubrirse con o mezclarse con un material que retrase la desintegración y/o absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, puede usarse monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo). Por tanto, la liberación prolongada de un agente activo puede conseguirse durante muchas horas y, si fuera necesario, el agente activo puede protegerse de la degradación dentro del estómago. Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse para facilitar la liberación de un agente activo en una localización particular gastrointestinal debido a las condiciones específicas o enzimáticas de pH.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden proporcionarse como parches individuales que se pretende que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un

periodo de tiempo prolongado. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden proporcionarse como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para administración tópica en la piel, boca, ojos u otros tejidos externos se usa preferentemente una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo puede emplearse con una base para pomada parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en el ojo incluyen gotas oculares. En estas composiciones, el ingrediente activo puede disolverse o suspenderse en un transportador adecuado, por ejemplo, en un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y lavados bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal y pulmonar pueden comprender transportadores sólidos tales como polvos (preferentemente que tienen un tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 500 micrómetros). Los polvos pueden administrarse de una manera que se aspira por la nariz, es decir, una inhalación rápida a través de la nariz desde un recipiente de polvo en estrecho contacto con la nariz. Como alternativa, las composiciones adoptadas para administración nasal pueden comprender transportadores líquidos, por ejemplo, pulverizaciones nasales o gotas nasales. Como alternativa, la inhalación de los compuestos directamente en los pulmones puede realizarse por inhalación profunda o instilación a través de una boquilla en la orofaringe. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas u oleaginosas del ingrediente activo. Las composiciones para administración por inhalación pueden proporcionarse en dispositivos especialmente adaptados que incluyen, pero sin limitación, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden construirse para proporcionar dosificaciones predeterminadas del ingrediente activo. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran en la cavidad nasal directamente o en los pulmones a través de la cavidad nasal u orofaringe.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal pueden proporcionarse como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden proporcionarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones pulverizadoras.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor deseado. Pueden estar presentes otros componentes en dichas composiciones que incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones adaptadas para administración parenteral pueden presentarse en envases monodosis o multidosis, por ejemplo ampollas y viales herméticos, y pueden conservarse en un estado criocongelado (liofilizado) que requiere únicamente la adición de un transportador líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Un autoinyector que comprende una solución inyectable de un péptido puede proporcionarse para uso urgente en ambulancias, salas de urgencias y situaciones de campo de batalla e incluso para autoadministración en un entorno doméstico, particularmente cuando puede producirse la posibilidad de una amputación traumática, tal como por el uso imprudente de un cortacésped. La probabilidad de que las células y los tejidos sobrevivan en un pie o dedo cortado después de volver a unirlos puede aumentarse administrando un péptido en múltiples sitios en las partes cortadas tan pronto como sea practicable, incluso antes de que llegue el personal médico al sitio o la llegada del individuo que ha tenido el accidente con el dedo cortado a la sala de urgencias.

Preferentemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios tales como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa en seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, se proporcionan ingredientes por separado o mezclados entre sí en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o un concentrado sin agua en un envase herméticamente cerrado tal como una ampolla o saquito indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición es para administrarse por infusión, esta puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina estéril de manera que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso; las formulaciones orales preferentemente contienen del 10 % al 95 % de ingrediente activo.

Puede proporcionarse una composición perfundida para su uso por perfusión *in situ*. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender niveles de péptidos, o una forma de péptidos no idónea para la administración aguda o crónica, local o sistémica en un individuo, pero realizarán las funciones pretendidas en el presente documento como un baño orgánico, perfundido orgánico, o perfundido *in situ* antes de extraer o reducir los niveles del péptido contenido en su interior antes de exponer o volver a llevar el órgano o tejido tratado a la circulación regular.

Se describe un paquete farmacéutico o un kit que comprende un o más envases cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente asociado con dicho envase (o envases) puede haber un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o comercialización de los productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de fabricación, uso o comercialización para administración a seres humanos.

Por ejemplo, un péptido puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el péptido puede administrarse usando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. Puede usarse una bomba (véase Langer, citado anteriormente; 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). El compuesto puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353-365 (1989); documento WO 91/04014; Patente de Estados Unidos N° 4.704.355; Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; véase en líneas generales *ibid.*). Pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley: Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61, 1953; véase también Levy *et al.*, 1985, Science 228: 190; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71: 105).

Un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca del agente terapéutico, es decir, las células, tejidos u órganos diana, requiriendo de este modo únicamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, páginas 115-138 en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, citado anteriormente, 1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

Un péptido, formulado correctamente, puede administrarse por administración nasal, bucal, oral, rectal, vaginal, ocular, transdérmica, parenteral, por inhalación o sublingual.

Puede ser deseable administrar un péptido localmente en el área que necesite el tratamiento; esto puede realizarse por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje después de la cirugía, por inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas o fibras. Un ejemplo no limitante sería un estent u otro armazón cubierto con un péptido implantado en una parte de la vasculatura, conducto, etc.

La selección de la dosis efectiva preferida será fácilmente determinable por un experto en la técnica basándose en las consideraciones de diversos factores, tales como sabrá un experto en la técnica. Dichos factores incluyen la forma particular del péptido, y sus parámetros farmacocinéticos tales como biodisponibilidad, metabolismo, semivida, etc., que se habrá establecido durante los procedimientos de desarrollo habituales típicamente empleados para obtener la aprobación reguladora de un compuesto farmacéutico. Otros factores a tener en cuenta en la dosis incluyen la afección o enfermedad a tratar o el beneficio a conseguir en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, medicaciones simultáneas y otros factores bien conocidos que afectan a la eficacia de los agentes administrados farmacéuticos. Por tanto, la dosificación exacta debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y de las circunstancias de cada paciente, por ejemplo, dependiendo de la afección y del estado inmunitario del paciente individual, y de acuerdo con las técnicas clínicas convencionales.

En otro aspecto, se proporciona un perfundido o una solución de perfusión para la perfusión y conservación de órganos para trasplante, la solución de perfusión incluye una cantidad de un péptido o análogo peptídico eficaz para proteger células sensibles y células asociadas, tejidos u órganos. El trasplante incluye, sin limitación, alotrasplante, en el que un órgano (incluyendo células, tejido u otra parte del cuerpo) se extrae de un donante y se trasplanta en un receptor distinto, siendo ambos de la misma especie; autotrasplante, en el que el órgano se extrae de una parte de un organismo y se reemplaza en otro, incluyendo procedimientos quirúrgicos de laboratorio, en los que un órgano puede extraerse, y mientras está *ex vivo*, reseccionarse, repararse o de otra manera manipularse, tal como para la extirpación de un tumor y después volver a llevar a la localización original o xenotrasplante, en el que se trasplantan tejidos u órganos entre especies. En un caso, la solución de perfusión es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Patente de Estados Unidos N° 4.798.824) que contiene hidroxietil almidón al 5 % (que tiene un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 300.000 y que carece sustancialmente de etilenglicol, etilen clorohidrina, cloruro de sodio y acetona);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM; glutatión 3 mM; adenosina 5 mM; glucosa 10 mM; tampón HEPES 10 mM; gluconato de magnesio 5 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM; gluconato sódico 105 mM; 200.000 unidades de penicilina; 40 unidades de insulina; 16 mg de dexametasona; 12 mg de Rojo Fenol; y tiene un pH de 7,4-7,5 y una osmolaridad de 320 mOsm/l complementado con una cantidad apropiada de un péptido. Este perfundido particular es únicamente ilustrativo de varias soluciones de este tipo que pueden adaptarse para el uso presente por inclusión de una cantidad eficaz de un péptido. En un caso adicional, la solución de perfusión contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 ng/ml de un péptido, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 320 ng/ml de péptido. Como se ha mencionado anteriormente, puede usarse cualquier forma de péptido en este aspecto.

Aunque el receptor preferido de un péptido para los fines que se indican a lo largo de todo el documento es un ser humano, los métodos en el presente documento se aplican igualmente para otros mamíferos, particularmente animales domésticos, ganado, animales de compañía y de zoológicos. Sin embargo, los beneficios pueden aplicarse a cualquier mamífero.

- 5 En aspectos adicionales del aspecto *ex vivo*, puede emplearse cualquier péptido tal como sin limitación a los descritos anteriormente.

10 En otro aspecto, los métodos y composiciones para la prevención, tratamiento o control de una enfermedad o trastorno asociados con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos en células, tejidos u órganos que no están aislados de la vasculatura mediante una barrera de células endoteliales se proporcionan exponiendo a las células, tejidos u órganos directamente a una composición farmacéutica que comprenda un péptido, o la administración o puesta en contacto de una composición farmacéutica que contenga un péptido con la vasculatura del tejido u órgano.

15 Similar a otros compuestos protectores tisulares basados en eritropoyetina, es posible que los péptidos puedan transportarse desde la superficie luminal a la superficie de la membrana basal de células endoteliales de los capilares de órganos con uniones estrechas de células endoteliales, incluyendo, por ejemplo, el cerebro, la retina y testículos. Por lo tanto, los efectos de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos pueden tratarse en células a través de la barrera. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, después de la transcitosis del péptido puede interactuar con un receptor protector tisular en una célula, por ejemplo, neuronal, ojo (por ejemplo, retinal), adiposa, conectiva, de pelo, de diente, mucosa, pancreática, endocrina, aural, epitelial, dérmica, muscular, cardíaca, pulmonar, hepática, renal, intestino delgado, adrenal (por ejemplo corteza adrenal, médula adrenal), capilar, endotelial, testicular, de ovario, células madre o endometrial, y la unión con el receptor puede iniciar una cascada de transducción de señal resultante de la activación de un programa de expresión de genes dentro de la célula o tejido sensible, dando como resultado la protección de la célula o tejido u órgano de la lesión, tal como exponiendo a un agente tóxico, inflamación, hipoxia, etc. El péptido puede reticularse a un compuesto que puede atravesar la barrera, tal como CEPO, para transportarse a través de la barrera de acuerdo con las enseñanzas de la Solicitud PCT N° PCT/US01/49479, Solicitudes de Patentes de Estados Unidos N° 10/188.905 y 10/185.841.

Por tanto, los métodos para proteger un tejido de una enfermedad o trastorno asociado con daño tisular o daño, efectos o síntomas resultantes de los mismos se describen con detalle en el presente documento más adelante.

30 En la práctica, un paciente mamífero se somete a quimioterapia sistémica para tratamiento del cáncer, incluyendo radioterapia, que comúnmente tiene efectos adversos tales como lesión nerviosa, pulmonar, cardíaca, ovárica o testicular. La administración de una composición farmacéutica que comprende un péptido o análogos peptídico protector tisular como se describe anteriormente se realiza antes y durante la quimioterapia y/o radioterapia, para proteger los diversos tejidos y órganos de las lesiones causadas por el agente quimioterapéutico, tal como para proteger los testículos. El tratamiento puede continuarse hasta que los niveles en circulación del agente quimioterapéutico desciendan por debajo de un nivel del peligro posible del organismo del mamífero.

35 En la práctica, se planea extraer diversos órganos de una víctima de un accidente de automóvil para trasplante en diversos receptores, algunos de los cuales requieren el transporte durante una distancia larga y un periodo de tiempo. Antes de extraer el órgano, al donante se le infunde una composición farmacéutica que comprenda los péptidos protectores tisulares y análogos peptídicos como se describe en el presente documento. Los órganos extraídos para su envío se perfunden con un perfusato que contiene péptidos o análogos peptídicos protectores tisulares como se describe en el presente documento, y se conservan en un baño que comprende los péptidos o análogos peptídicos protectores tisulares. Determinados órganos se perfunden continuamente con un dispositivo de perfusión pulsátil, utilizando un perfusato que contenga péptidos y análogos peptídicos protectores tisulares. El deterioro mínimo de la función orgánica se produce durante el transporte y después del implante y la reperusión de los órganos *in situ*.

40 En otro ejemplo, un participante en una actividad peligrosa que expone al individuo a agentes tóxicos, podría tomar una dosis de composición farmacéutica que contenga un péptido suficiente para impedir (es decir retrasar la aparición de, inhibir o detener), proteger contra o mitigar los efectos de la exposición a un agente tóxico. En particular, este método de tratamiento puede tener aplicaciones en diversas profesiones que impliquen el contacto con agentes tóxicos, tales como mineros, fabricantes químicos, personal militar (soldados, paracaidistas), personal de urgencias (policía, bomberos, EMS y personal de ayuda en caso de desastres), trabajadores de la construcción, manipuladores de alimentos y empleados en reactores de energía.

45 En otro ejemplo, un procedimiento quirúrgico para reparar una válvula cardíaca requiere cardioplegia temporal y oclusión arterial. Antes de la cirugía, al paciente se le infunde un péptido o análogo peptídico protector tisular. Dicho tratamiento impide daño celular isquémico por hipoxia, particularmente después de la reperusión. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden usarse profilácticamente para preparar a un individuo para cirugía para limitar el traumatismo asociado con el procedimiento quirúrgico o ayudar a que el individuo se recupere del procedimiento quirúrgico. Aunque el presente método de tratamiento usando composiciones farmacéuticas que

contienen los péptidos y análogos peptídicos protectores tisulares proporcionan un uso profiláctico para procedimientos quirúrgicos, puede ser particularmente útil en procedimientos que inducen eventos isquémicos temporales incluyendo, sin limitación, procedimientos de derivación (derivación coronaria), procedimientos de angioplastia, amputaciones y trasplantes, así como los realizados directamente sobre células, tejidos u órganos sensibles tales como cirugía cerebral y de la columna vertebral y procedimientos a corazón abierto. Dichos procedimientos pueden implicar el uso de derivación cardiopulmonar (corazón/pulmón).

En otro ejemplo, en cualquier procedimiento quirúrgico, tal como en cirugía de derivación cardiopulmonar, puede usarse un péptido o análogo peptídico protector de tejido. En un caso, la administración de una composición farmacéutica que comprende péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido como se describe anteriormente se realiza antes, durante, y/o después del procedimiento de derivación, para proteger la función cerebral, cardíaca y otros órganos.

En los ejemplos anteriores en los que se usa un péptido para aplicaciones *ex vivo* o para aplicaciones *in vivo* para tratar una enfermedad o un trastorno asociado con daño tisular o daños, efectos o síntomas resultantes de los mismos, se describe una composición farmacéutica en forma unitaria de dosificación para la prevención, tratamiento o control de los daños y efectos de la exposición a un agente tóxico o síntomas de los mismos que comprende una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 pg a 30 mg, 0,5 pg a 25 mg, de 1 pg a 20 mg, de 500 pg a 10 mg, de 1 ng a 10 mg, de 500 ng a 10 mg, de 1 µg a 10 mg, de 500 µg a 10 mg o de 1 mg a 10 mg de un péptido, y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la cantidad del péptido se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,5 pg a 1 mg. Preferentemente, la formulación contiene péptidos que no son eritropoyéticos.

Además, este aspecto restaurativo se dirige al uso de cualquiera de los péptidos del presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para reestablecer la disfunción celular, tisular u orgánica, en el que el tratamiento se inicia después, y bastante después, del daño inicial responsable de la disfunción. Además, el tratamiento usando péptidos puede abarcar el curso de la enfermedad o afección durante la fase aguda así como una fase crónica.

Un péptido puede administrarse por vía sistémica a una dosificación entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 300 µg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 5 -150 µg/kg de peso corporal, más preferentemente aproximadamente 10-100 µg/kg de peso corporal, por administración. Por ejemplo, la administración puede repetirse a cada hora, a cada día, siempre que sea clínicamente necesario, o después de un intervalo apropiado, por ejemplo, cada 1-12 horas, preferentemente cada 6 a 12 horas; cada 2-6 días, preferentemente cada 2-4 días; cada 1 a 12 semanas, preferentemente, cada 1 a 3 semanas. La cantidad eficaz del péptido y transportador farmacéuticamente aceptable puede envasarse en un vial monodosis u otro recipiente. En otro caso, se usan los péptidos, que pueden ejercer las actividades descritas en el presente documento pero sin ocasionar un aumento en la concentración de hemoglobina o hematocrito. Dichos péptidos se prefieren en casos en los que los métodos están destinados para proporcionarse crónicamente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Método de síntesis peptídica.

A. Síntesis del Péptido A (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 38-57 de la EPO) y Péptido B (correspondiente a la secuencia de aminoácidos 58-82 de la EPO).

Se sintetizaron fragmentos de EPO, Péptido A y Péptido B, usando síntesis peptídica en fase sólida gradual con bioquímica Boc de "neutralización *in situ*", como se describe en Band, D., Chopra, N y Kent, S., "Total Synthesis of Crambin", J.AM. CHEM. SOC. 2004, 126, 1377-1383. En resumen, se sintetizaron dos fragmentos correspondientes a la secuencia de aminoácidos 38-57 de la EPO (péptido A), NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG) y la secuencia de aminoácidos 58-82 de la EPO (péptido B, QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV) en resina -OCH<sub>2</sub>-Pam (péptidos "carboxilo libres) o en resina HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Leu-OCH<sub>2</sub>-Pam (péptidos "tioéster). Durante la síntesis las cadenas laterales de diversos aminoácidos se protegieron de la siguiente manera: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(4-CH<sub>3</sub>Bzl) o Cys(ACM), Glu(OcHex), Lys(2-CI-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Br-Z). Después de ensamblar la cadena peptídica, los péptidos se desprotegeron y simultáneamente se separaron del soporte de resina por tratamiento con HF anhidro que contenía *p*-cresol (90:10, v/v) durante 1 h a 0 °C. Después de la evaporación del HF a presión reducida, los productos en bruto se precipitaron y se trituraron con éter dietílico enfriado, y los péptidos se disolvieron en acetonitrilo acuoso al 50 % que contenía TFA al 0,1 % y se purificaron mediante el sistema de HPLC preparativa. Las composiciones peptídicas se confirmaron usando LC-MS.

El péptido ID (UEQLERALNSS) es un péptido lineal de 11 aminoácidos con un extremo N protegido (por la estructura en anillo de 5 miembros del ácido piroglutámico) y un grupo carboxilo libre en el extremo C. Su peso molecular es de 1257 Daltons. Se sintetizó usando síntesis peptídica en fase sólida Fmoc convencional en resina de Wang, se purificó por HPLC preparativa y cromatografía de intercambio iónico y se liofilizó. El acetato y el amoniaco se unieron en forma iónica con grupos básicos y ácidos de la molécula peptídica formando una sal mixta.

**Ejemplo 2. Los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido no son eritropoyéticos.****A. Evaluación *in vitro***

La UT-7epo, una línea celular de leucemia dependiente de eritropoyetina humana, se usó para la determinación de la fuerza eritropoyética de los péptidos. Células UT-7epo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Cat. N° ACC 363) se cultivaron en medio RPMI-1640 completo con FBS al 10 % y eritropoyetina 5 ng/ml. La respuesta de proliferación/supervivencia (= aumento de viabilidad) de las células expuestas a eritropoyetina está mediada por el receptor de eritropoyetina de tipo eritrocitario clásico y es una medida cuantitativa de la capacidad de las variantes de eritropoyetina para estimular el receptor de eritropoyetina clásico.

Las células UT-7epo se transfirieron a medio RPMI 1640 completo reciente que contenía suero de ternero donante al 10 %, L-glutamina 4 mM y complementado con 5 ng/ml de eritropoyetina humana recombinante. Las células se mantuvieron en matraces de 75 cm<sup>2</sup> con 20 ml de medio/matraz en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C durante 48 h. El segundo día del ensayo, es decir, a las 48 h, las células se transfirieron de los matraces a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron dos veces con 10 ml de medio de inanición (suero de ternero donante al 3 %, L-glutamina 4 mM). Después, las células se resuspendieron en medio de inanición, usando una acción con la pipeta hacia arriba y hacia abajo hasta obtener una sola suspensión celular. Las células resuspendidas se diluyeron con medio de inanición hasta obtener una densidad de 4 x 10<sup>5</sup> células/ml, y se sembraron en placa a un volumen de cultivo total de 10 ml por matraz de 25 cm<sup>2</sup>. Después de una incubación de 4 h, las células se transfirieron de nuevo a un tubo cónico de 50 ml. Las células de control se mantuvieron siempre con 5 ng/ml de rhu-eritropoyetina.

Las células se diluyeron a 200.000 células/ml en medio de inanición, se sembraron en placa a 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos y se expusieron a diversas concentraciones de eritropoyetina y péptido ID. Se usó una serie de diluciones de 10 veces en medio RPMI 1640 que contenía suero del 3 % para generar concentraciones de compuestos de ensayo de 5 pM a 50 nM. Después de una incubación adicional durante 48 h, se añadió una solución de Reactivo de Proliferación Celular WST-I 15 ml (Roche) a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 37 °C en CO<sub>2</sub>. Después de mezclar durante 1 minuto, la placa se leyó en un lector de placa (absorción a 450 nm, restada de la absorción de fondo a 650 nm). Como se muestra en la **FIG. 1**, el Péptido ID no tuvo actividad eritropoyética durante el intervalo de dosis en comparación con el fuerte efecto eritropoyético de la EPO. Esto estuvo muy por debajo de lo esperado en el que un péptido o análogo peptídico no eritropoyético no tendrá actividad eritropoyética para una dosis inferior a 1 µg/ml, y más preferentemente para una dosis inferior a 10 µg/ml.

**B. Evaluación *in vivo***

Para evaluar la actividad eritropoyética de los péptidos y análogos peptídicos protectores de tejido, el Péptido ID se administró por vía intravenosa dos veces al día a ratas Sprague Dawley durante 28 días. Nueve ratas macho y nueve hembra se asignaron a grupos de 1-4 que recibieron 0, 60, 180 y 600 µg/kg por dosis (0, 48, 143 y 477 nmol/kg, respectivamente) del Péptido ID en PBS por administración intravenosa en embolada los días 1-28. El día 29 se extrajeron muestras de sangre para ensayar las variables hematológicas. La concentración de hemoglobina se determinó usando un analizador automático (Keska Corporation). Como se muestra en la **FIG. 2**, no hubo diferencias en ninguno de los grupos en cuanto a las concentraciones de hemoglobina.

Además los efectos eritropoyéticos y hematopoyéticos del Péptido ID se evaluaron en conejos. Se extrajeron muestras de sangre de todos los conejos antes de iniciar el estudio para establecer la línea inicial hematológica de los animales. El Péptido ID se administró dos veces al día i.v. a conejos Blancos de Nueva Zelanda durante 28 días. Para este estudio, seis machos y hembras se asignaron a los grupos 1 y 4, y cuatro machos y cuatro hembras se asignaron a los grupos 2 y 3. El Grupo 1 recibió 0, el grupo 2 recibió 30 µg (24 nmol/kg pc), el grupo 3 recibió 90 µg/kg (72 nmol/kg pc) y el grupo 4 recibió 300 µg/kg (240 nmol/kg pc) por dosis de Péptido ID en PBS por administración i.v. en embolada. Las muestras de sangre para ensayar las variables hematológicas se recogieron el día 29. La comparación de los parámetros hematológicos del inicio frente al día 29 mostró que no había diferencias en la concentración de hemoglobina, hematocrito o recuento plaquetario (**FIG 3, a. b. and c.**).

**Ejemplo 3. El péptido o análogo peptídico es protector de tejido en ensayos *in vitro*.**

La protección tisular de los péptidos y análogos peptídicos puede evaluarse fácilmente usando un número variado de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, la protección de la excitotoxicidad puede determinarse usando muerte inducida por kainitina de neuronas motoras de ratón. Se obtuvieron médulas espinales de embriones de rata Sprague-Dawley de 15 días de vida como se ha descrito anteriormente (Siren *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 4044). El cuerno ventral se tripsinizó y se centrifugó a través de un amortiguador de BSA al 4 % durante 10 minutos a 300 X g. Las células (que representaban un cultivo mixto de neuronas-glia) se sembraron en placas de 24 mm pocillos previamente cubiertas con poli DL ornitina y laminina a una densidad de 2.000 células/cm. Las neuronas motoras se purificaron adicionalmente por inmunoselección y las células se sembraron a baja densidad (20.000 células/cm<sup>2</sup>) en placas de 24 pocillos mm previamente cubiertas con poli-DL-ornitina y laminina y que contenían medio de cultivo completo [Neurobasal/B27 (2 %); L-glutamina 0,5 mM; suero de caballo al 2 %; 2 mercaptoetanol 25 mM, glutamato 25 mM; penicilina y estreptomycin al 1%; BDNF 1 ng/ml]. El medio (sin glutamato) volvió a añadirse a los cultivos los

días 4 y 6. La muerte celular se indujo el día 6 en cultivo por incubación durante 48 h con ácido kaínico (5 mM para cultivos mixtos de neurona-glia; 50 mM para cultivos purificados). A los cultivos se añadió Péptido B (5 ng/ml, 1,8 nM), EPO (3,3 nM) o vehículo, 72 h antes de la inducción de la muerte celular y el tratamiento continuó durante 48 h. Después, el medio se desechó y las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (vol/vol) en PBS durante 40 min, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 %, se bloquearon con FCS al 10 % (vol/vol) en PBS, se incubaron con anticuerpos contra neurofilamentos no fosforilados (SMI-32; 1:9.000) durante una noche, y se visualizaron usando el método de avidina-biotina con diaminobencidina. La viabilidad de las neuronas motoras se evaluó morfológicamente contando las células positivas a SMI-32 a través de cuatro lados del cubreobjetos y la tinción para cuerpos apoptóticos se realizó usando H33258. Como se muestra en la **FIG. 4**, el Péptido B protegió a las células contra los efectos neurotóxicos del agonista del receptor de glutamato, el ácido kaínico.

#### Ejemplo 4. Modelo de oclusión de la arteria cerebral media

Ratas Sprague Dawley (8 por grupo) se sometieron al siguiente protocolo MOAC. La cirugía se realizó de acuerdo con las enseñanzas de Brines *et al*, 2000, PNAS USA 97: 10526-10531. En resumen, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg-pc, i.p.), las arterias carótidas se visualizaron y la carótida derecha se ocluyó mediante dos suturas y se separó. Un orificio de Burr adyacente y rostral a la órbita derecha permitió visualizar la arteria cerebral media ("ACM"), que se cauterizó distal a la arteria nasal. Para producir una penumbra (zona limítrofe) rodeando esta lesión de la ACM fija, la arteria carótida contralateral se ocluyó durante 1 hora usando tracción proporcionada mediante un fórceps fino y después volvió a abrirse.

Las ratas recibieron una administración de solución salina, Péptido ID como una sola dosis i.v. (2 µg/kg pc) o Péptido IX, LSEQARNQSEL), una versión mezclada de Péptido B, como una sola dosis i.v. (2 µg/kg pc) después de la reperusión, seguido de tres inyecciones más a intervalos de 2 horas. Para evaluar la herida, las ratas se sometieron a ensayo conductual o el volumen de la lesión se determinó tiñendo con tetrazolio las secciones cerebrales realizadas 24 horas después de cirugía de acuerdo con el protocolo indicado anteriormente.

(a) Volumen de la lesión.

El volumen de la lesión se determinó después tiñendo con tetrazolio secciones cerebrales realizadas 24 horas después de la cirugía. El Péptido ID demostró una reducción significativa en el volumen de infarto a las 24 horas ( $225 \pm 20 \text{ mm}^3$ ) en comparación con las ratas tratadas con solución salina ( $291 \pm 23 \text{ mm}^3$ ).

(b) Ensayo conductual.

Las ratas también se sometieron a ensayo en un protocolo conductual de fallo de apoyo de pata. Las ratas se sometieron a ensayo en un suelo de rejilla de acero inoxidable elevado de 30 cm x 30 cm con un tamaño de rejilla de 30 mm de acuerdo con el protocolo de Markgraf *et al.*, 1992, Brain Research 575: 238-246. Cuando se colocan en la rejilla, la rata intentará moverse alrededor y ocasionalmente pondrá una pata a través de una abertura de la rejilla ("fallo de apoyo pata") en lugar de en la rejilla. Durante un periodo de 1 minuto se mide el número de fallos de apoyo de pata.

El número de fallos de apoyo de pata es indicativo del deterioro cognitivo de las ratas debido al MOAC, cuanto menor es el número de fallos de apoyo de pata menor es el deterioro cognitivo. Como se muestra en la **FIG. 5**, el Péptido ID mejoró significativamente el comportamiento de las ratas en el protocolo de fallo de apoyo de pata (11,2 ± 1,1 fallos de apoyo de pata) en comparación con las ratas tratadas con solución salina (20,2 ± 0,8 fallos de apoyo de pata) y con las ratas tratadas con el Péptido IX (20,1 ± 2,1 fallos de apoyo de pata).

#### Ejemplo 5: ensayo de isquemia renal bilateral

Sesenta ratones C57/BL6 macho (~25 g; Charles River Laboratories) se anestesiaron con quetamina (150 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg) i.p. Cada animal se colocó en una manta homeotérmica ajustada a 37 °C y después de una laparotomía en la línea media, los pedículos renales se pinzaron durante 30 minutos usando pinzas vasculares no traumáticas. El Péptido ID se administró a la dosis indicada mediante inyección i.p. 1 minuto, 6 horas y 12 horas después de la reperusión. En un estudio de una sola dosis, los ratones recibieron control (PBS), 1 µg/kg de Péptido IG a 1 minuto, 1 µg/kg de Péptido IG a los 30 minutos, 1 µg/kg de Péptido ID a las 6 horas o 10 µg/kg de Péptido ID a las 6 horas (12 ratones por grupo). En un estudio de dosis múltiple, los ratones recibieron dosis múltiples de un control (PBS), 0,1 µg/kg de Péptido ID, 1 µg/kg de Péptido ID o 10 µg/kg de Péptido ID a 1 minuto, 6 horas y 12 horas en reperusión.

Veinticuatro horas más tarde, los ratones volvieron a anestesiarse y se obtuvo sangre por punción cardiaca. La creatina y la urea plasmática se usaron como indicadores de disfunción renal y la aspartato aminotransferasa se usó como un indicador de lesión renal. Los datos se analizaron usando ANOVA seguido por comparación de ensayo *post hoc* de Dunnett.

Como se muestra en cada una de las gráficas de la **FIG. 6** y **FIG. 7**, 1 µg/kg de Péptido ID o 10 µg/kg de Péptido ID produjeron una reducción en estos marcadores bioquímicos de disfunción renal.

**Ejemplo 6: cicatrización**

Para evaluar el Péptido ID se usó un modelo de biopsia en sacabocados de espesor total. En este experimento, se colocaron heridas cutáneas de espesor total de 3,5 mm de diámetro en los ángulos de un cuadrado de 3 cm de achura en la región escapular rasurada y depilada de ratas Sprague-Dawley. Diariamente se administró Péptido ID (24 nmol/kg de pc, 9 ratas) o PBS (9 ratas) por vía subcutánea durante 10 días. El área de la herida abierta, medido de manera oculta a partir de fotografías digitales en serie, presentó una curación más rápida en los animales que recibieron Péptido ID como se muestra en la **FIG. 8**.

**Ejemplo 7: potenciación de la cognición**

Se usó un nuevo paradigma de reconocimiento de objetos para evaluar su recuerdo de objetos previamente experimentados. Específicamente, ratas Wistar adultas se expusieron a nuevos objetos de ensayo y después volvieron a exponerse a ellos 24 horas más tarde. Los animales se dividieron en 5 grupos que recibieron: (1) vehículo, (2) galantamina (3 mg/kg i.p.) 1 h antes del ensayo como control positivo, (3) Péptido ID (24 nmol/kg pc i.p.) 3 horas después de la primera exposición a los nuevos objetos, (4) Péptido ID (24 nmol/kg pc i.p.) dos veces al día durante 5 días antes del aprendizaje y continuaron durante el día inmediatamente después del aprendizaje y (5) Péptido ID (24 nmol/kg pc i.p.) 1 hora antes de la primera exposición al nuevo objeto.

Como se muestra en la **FIG. 9**, las ratas de los grupos 2-4 presentaron reconocimiento mejorado de los nuevos objetos en el ensayo en comparación con las ratas de los grupos 1 y 5. Estos resultados sugieren que el Péptido ID puede ejercer influencia sobre la fase de consolidación de adquisición de memoria.

**Ejemplo 8: nefropatía inducida por cisplatino**

Se sabe que los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, tales como el cisplatino (CDDT), inducen lesión renal entre otras toxicidades. La capacidad del Péptido IC para proteger a las ratas de la nefropatía inducida por cisplatino se evaluó administrando por vía intraperitoneal 2 mg/kg de CDDT dos veces a la semana durante 5 semanas. El Péptido IC se administró simultáneamente a una dosis de 0,4 µg/kg, tres veces a la semana durante 5 semanas. La función renal se evaluó midiendo el volumen de producción de orina. Como se muestra en la **FIG. 10**, el tratamiento simultáneo con el Péptido IC protegió contra la disfunción renal debido al CDDT.

Además, se sabe que el CDDT induce neuropatía periférica, entre otras toxicidades. Después del diseño experimental descrito anteriormente para la función renal, también se evaluó la capacidad del Péptido IC para proteger contra la neuropatía periférica. Se administraron 2 mg/kg de CDDT por vía intraperitoneal, dos veces a la semana durante 5 semanas. El Péptido IC se administró simultáneamente a una dosis de 0,4 µg/kg, tres veces a la semana durante 5 semanas. La neuropatía se evaluó por latencia en placa caliente, el periodo de retraso entre el contacto de la pata de la rata con una superficie caliente y la retracción de la pata. Como se muestra en la **FIG. 11**, el tratamiento simultáneo previno la aparición de neuropatía periférica.

**Ejemplo 9: implante de tumor cortical.**

Se realizó un estudio de implante de tumor cortical de acuerdo con el protocolo de Lampson *et al.* Cancer Res. 53: 176-82: 1993 para determinar el efecto del Péptido ID sobre el crecimiento del tumor.

De acuerdo con el protocolo, ratas Fisher CD macho se anestesiaron y su cuero cabelludo de la parte derecha se rasuró y se lavó con desinfectante. Después se realizó una pequeña incisión en el cuero cabelludo por encima de la corteza cerebral temporal derecha. Se perforó un orificio de 1 mM a través de la bóveda craneal, sin puncionar la duramadre. En condiciones asépticas, 50.000 células vivas de gliosarcoma 9L/LacZ en 5 µl se inyectaron lentamente a través de una aguja de calibre 22 unida a una jeringa de precisión Hamilton. Después se aplicó cera ósea en el sitio de trepanación, la piel se suturó y por vía i. p. se administró una dosis profiláctica de antibiótico. Las ratas de control recibieron inyecciones i. p. de solución salina diarias. Las ratas se trataron con Péptido ID recibieron inyecciones diarias de 30 µg/kg i.p. diariamente durante un periodo de 25 días. Veinticinco días después del implante, el animal se anestesió y el cerebro se fijó-perfundió con paraformaldehído al 2 %. Después, se extirpó el cerebro y se cortó sobre un dispositivo de matriz cerebral en secciones coronales de 1 mm de espesor y el grado de masa tumoral se determinó por metodología planimétrica.

La **FIG. 12** demuestra que el Péptido ID inhibió el crecimiento adicional del tumor cortical en este modelo. Aunque el volumen relativo del tumor en las ratas tratadas con solución salina creció a más de 0,4 cm<sup>2</sup>, los tumores en las ratas tratadas con Péptido ID no experimentaron crecimiento de volumen tumoral.

**Ejemplo 10: modelo de implante de gliosarcoma 9L.**

De acuerdo con el acuerdo del protocolo de Lampson *et al.* Cancer Res. 53: 176-82: 1993 descrito anteriormente, ratas Fisher CD recibieron implantes de células de gliosarcoma 9L transfectadas con el gen LacZ usando una jeringa Hamilton. Se inyectaron 100.000 células en 10 microlitros en el caudal derecho.

Dos semanas después del implante, los animales se dividieron en tres grupos para inyecciones diarias intraperitoneales: un grupo recibió un Péptido ID con una semivida plasmática corta, otro recibió el Péptido IW (forma pegilada del Péptido IC) y el tercer grupo recibió solución salina. Los péptidos se proporcionaron a una dosis de 25 nmol/kg de peso corporal. Tres semanas después, los animales se sacrificaron y secciones coronales gruesas en serie de 1 mm se cortaron a través del cerebro y se incubaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-[beta]-D-galactopiranosido (Xgal). Las células tumorales (que contenían el gen LacZ) metabolizaron Xgal en una tinción azul oscuro, localizando el grado de tumor. Se obtuvieron imágenes digitales de alta resolución y las áreas teñidas de azul se determinaron usando metodología planimétrica. Los datos se expresan como área total de infiltración tumoral.

Los resultados, como se representa en la **FIG. 13**, muestran una reducción marcada en el tamaño del tumor en el grupo tratado con el Péptido con semivida más larga (Péptido IW) en un área total igual a la obtenida cuando los animales se trataban diariamente con el péptido con semivida más corta (Péptido ID) comenzando el día del implante y continuando duramente hasta el sacrificio. Por el contrario, aunque el área media del grupo que recibió el péptido de acción más corta (Péptido ID) a las dos semanas después del implante era más pequeña que la del grupo tratado con solución salina, esta no fue significativamente diferente.

Además, la **FIG.14** representa fotografías comparativas de los cerebros de las ratas tratadas con solución salina, Péptido ID y Péptido IW. Como puede observarse claramente, el tumor más grande (área oscura) está presente en las ratas tratadas con solución salina. Las ratas tratadas diariamente con Péptido ID tuvieron tumores sustancialmente más pequeños, sin embargo las ratas tratadas con Péptido IW después de dos semanas presentaron los mejores resultados.

Estos hallazgos son coherentes con la capacidad de los péptidos para ocasionar la regresión de la línea celular de gliosarcoma 9L.

#### **Ejemplo 11: (Profético) tratamiento en caquexia por cáncer.**

La capacidad de los péptidos para tratar la caquexia sintomática del cáncer puede verificarse mediante el siguiente protocolo.

Ratas con un peso de aproximadamente 200 g se inocularían por vía intraperitoneal con  $10^8$  células de Hepatoma AH-130. Simultáneamente, un grupo de ratas se trataría con un péptido de interés tal como, Péptido ID o Péptido IW, a una dosis que estaría en un intervalo terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0,10 a 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ . Un segundo grupo se trataría con un placebo. El día 16, las ratas se sacrificarían. La ingesta de alimento y la actividad locomotora de las ratas sujeto se evaluaría antes de la inoculación y el día 11. El peso y la composición corporal se evaluarían mediante exploración NMR el día 0 y el día 16 después del sacrificio.

En comparación con las ratas tratadas con placebo, podría esperarse que las tratadas con un péptido mostrasen menos consumo de grasa y masa magra. Además, la ingesta de alimento y la actividad locomotora de las ratas tratadas con péptido mejorarían.

#### **Ejemplo 12: inflamación en la oreja inducida por histamina.**

La capacidad de los péptidos útiles en el método terapéutico actual para antagonizar los efectos proinflamatorios de la histamina se evaluó en un modelo de ratón de edema inducido por histamina desvelado en Brand *et al.* "Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears", *Inflamm. Res.* 51 (2002) 283-289. En resumen, 24 ratas Sprague Dawley (macho, 250 gm) se usaron en el estudio. Antes de la exposición a histamina, cada rata se anestesió y el espesor de la oreja de la rata se midió usando un micrómetro accionado por resorte. Se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  de solución de difosfato de histamina 60 mg/ml por vía intradérmica en una oreja de la rata y 30 segundos más tarde la rata recibió (1) Péptido ID 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  IV (12 ratas) o (2) solución Salina IV (12 ratas). Después, 20  $\mu\text{l}$  de la solución de difosfato de histamina 60 mg/ml se inyectaron por vía intradérmica en la otra oreja de la rata. El grosor de las orejas de las ratas se midió después usando un calibrador a los 15, 30, 45 y sesenta minutos después de la exposición a histamina.

Como puede observarse en la **FIG. 15**, el Péptido ID redujo la cantidad de edema asociado con la exposición a histamina en comparación con la solución salina.

#### **Ejemplo 13: formación de ronchas inducidas por histamina**

La capacidad del Péptido ID para reducir el extravase plasmático (ronchas) inducido por administración intradérmica de histamina se evaluó en ratas. Los animales recibieron una administración previa de colorante Azul Evans (que se une estrechamente a la albúmina) para proporcionar un marcador visual de filtración vascular. Para determinar la persistencia de la actividad del Péptido IG, a diversos periodos de tiempo después de la administración del péptido ID (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , administrado por vía intravenosa), se administró una dosis intradérmica de 0,12  $\mu\text{g}$  de histamina, y se cuantificó el grado de filtración del colorante por planimetría realizada en fotografías digitales obtenidas 15 minutos después de la colocación de la histamina, momento en el cual es mayor el área de superficie de la roncha. Cada animal se ensayó únicamente en un solo momento para impedir la influencia de la administración de histamina en

respuestas posteriores. Se descubrió que la administración de una sola dosis del péptido ID suprimía la formación de ronchas, y el efecto supresor fue detectable hasta 24 horas después de una sola dosis, como se muestra en la **FIG. 16**, que muestra la diferencia en el área de los animales tratados con solución salina frente a los tratados con Péptido ID.

#### 5 **Ejemplo 14: formación de ronchas inducidas por histamina**

Con anestesia de isoflurano, los abdómenes de 12 ratas Sprague-Dawley se rasuraron y depilaron. A cada rata se le administró después por vía intravenosa (mediante la yugular interna) una solución diluida de Azul Evans (30 mg/ml en solución salina, 1 ml/kg pc). Después de 5 minutos, se administraron 6 dosis pequeñas de histamina (difosfato de Histamina, 20 microlitros administrados por vía intradérmica) en un patrón rectangular en el abdomen de cada rata. Después de cincuenta minutos, cuando la roncha alcanzaba su tamaño máximo se fotografió y el área ampollada se determinó por planimetría digital. Para analizar la eficacia de diversos péptidos, el péptido de interés se administró a las ratas por vía intravenosa brevemente después de la inyección de histamina. Los péptidos se analizaron y los resultados se indican a continuación.

A. Eritropoyetina.

15 Las ratas recibieron solución salina o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de EPO en el momento de exponerse a la histamina. La **FIG.17** ilustra que el área de la roncha (área de la lesión) de las ratas tratadas con EPO (aproximadamente 0,4  $\text{cm}^2$ ) era la mitad del área de lesión de los animales tratados con solución salina (aproximadamente 0,8  $\text{cm}^2$ ).

B. Péptido ID, Péptido IW y Péptido ID mezclado (Péptido IY, GLpLSEARNQSEL).

20 Las ratas recibieron solución salina Péptido IY (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), Péptido ID (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o Péptido IW (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en el momento de la exposición a histamina. La **FIG. 18** ilustra que el área de la roncha (área de la lesión) de las ratas tratadas con Péptido ID y Péptido IW (aproximadamente 0,35  $\text{cm}^2$  y 0,3  $\text{cm}^2$  respectivamente) tenían la mitad del área de lesión de los animales tratados con solución salina y Péptido IY (aproximadamente 0,6  $\text{cm}^2$  cada una). Esto no solo demuestra la eficacia de los Péptidos ID e IW en la modulación de la histamina y en la respuesta inflamatoria asociada con la histamina sino la importancia de los motivos desvelados anteriormente con respecto a la eficacia de los péptidos dado que el Péptido IY no presentó actividad antiinflamatoria.

C. Péptido IW, Péptido IC retroinverso (Péptido IZ SSNLAQRELQEQ), Péptido ID y Péptido IZ mezclado (Péptido JA LSEQARNQSEL).

30 Las ratas recibieron solución salina, péptido JA (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), péptido IZ (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), péptido IW (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o péptido ID (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en el momento de exponerse a la histamina. La **FIG. 19** ilustra que el área de la roncha (área de la lesión) de las ratas tratadas con péptido IW, ID e IZ (aproximadamente 0,3  $\text{cm}^2$ , 0,35  $\text{cm}^2$  y 0,4  $\text{cm}^2$  respectivamente) tenían un área de lesión menor que la de los animales tratados con solución salina y péptido JA (aproximadamente 0,6  $\text{cm}^2$  cada una).

#### **Ejemplo 15: ensayo de úlcera de decúbito**

35 Se realizó un ensayo de úlcera de decúbito (úlceras por presión) en 24 ratas Sprague-Dawley adultas de acuerdo con la descripción de Pierce *et al.*, Selective A2A adenosine receptor activation reduces skin pressure ulcer formation and inflammation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 67-74, 2001. En resumen, se implantó una placa ferromagnética de acero bajo una región dorsal de la piel de las ratas. Se aplicó un imán rectangular permanente en el área de la piel bajo el cual se implantó la placa para comprimir la piel entre la placa y el imán. Esta compresión redujo el flujo sanguíneo de la piel causando isquemia. Las ratas se sometieron a un ciclo de isquemia-reperusión (2 horas de isquemia con 0,5 horas de reperusión) durante un periodo de 72 horas. El área de la herida en cada rata se midió y, posteriormente, las ratas se trataron con solución salina, Péptido ID 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  administrado sc dos veces: una vez al inicio del primer periodo de isquemia y una segunda vez después de 24 horas, Péptido ID 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  administrado sc diariamente, o EPO diariamente. Diariamente el área de la herida de cada rata se midió durante un periodo de 12 días. La **FIG. 20** demuestra que el Péptido ID y la EPO reducen el tamaño de la herida, y que la administración diaria del Péptido IG da como resultado un tamaño de herida más pequeño.

#### **Ejemplo 16 (ejemplo profético): prueba de punción cutánea**

50 Para determinar una línea basal se realizó una prueba inicial de punción cutánea con histamina. La prueba de punción cutánea se realizó en un paciente en una posición semi-clinostática en el lado palmar de ambos antebrazos (a más de 5 cm por encima del pliegue cutáneo distal de las muñecas). El antebrazo se desinfectó con alcohol y se dejó secar. Usando un bolígrafo, se marcaron los posibles sitios de la prueba cutánea, para histamina y control negativo, y se etiquetaron con una separación entre sí de al menos 2 cm. Se colocó una gota de hidrocloreuro de histamina (10 mg/ml) o control negativo en la marca apropiada y después se introdujo una lanceta estéril a través de cada gota en un ángulo de 90° y se retiró. Después, los sitios se observaron para detectar la presencia de eritema y formación de ronchas, 15 minutos después de la administración. Se tomó una fotografía de las ronchas y después se determinó el tamaño de la roncha usando planimetría digital.

55

La prueba de punción cutánea se realizó de nuevo a un periodo de tiempo de al menos 3 horas después usando el protocolo anterior. Uno de los péptidos indicados anteriormente puede administrarse al paciente a un periodo de 15 minutos a 2 horas antes de la administración de la exposición a histamina, en el momento de la administración de la exposición a histamina, o de 1 a 60 minutos después de la exposición a histamina, para determinar la capacidad del péptido para prevenir, controlar/mejorar o tratar la inflamación inducida por histamina, respectivamente. Por ejemplo, en el momento de la punción de histamina el paciente puede recibir una dosis de Péptido ID por inyección iv o sc. Se espera que el área de la roncha sea aproximadamente 50 % menor después del tratamiento con el Péptido ID.

#### **Ejemplo 17: actividad radiomitigadora en ensayo de exploración hematopoyético.**

La capacidad de los péptidos útiles en el método terapéutico actual para mitigar los efectos de un agente radioactivo en el sistema hematopoyético se evaluó en un modelo murino de lesión por radiación. En resumen, se usaron 80 ratones C57BL/6 (50 % hembra y 50 % macho, 15-28 gm) en el estudio dividido en dos grupos.

En ambos grupos la radiación se administró a los ratones como una sola dosis corporal total uniforme de radiación gamma de una fuente de radiación de <sup>137</sup>Cs (GammaCell 40; Nordion International, Kanata, Ontario, Canadá) a una tasa de exposición de 65-69 cGy/minuto +/- 2,5 cGy.

El Grupo A recibió una dosis de radiación DL70/30 (796 cGy) y después a 20 de los ratones se les administró el Péptido ID (30 ug/kg por vía subcutánea) 24 h después de la irradiación y después una vez al día durante 29 días. Los 20 ratones restantes (grupo control) recibieron PBS (por vía subcutánea) 24 h después de la irradiación y después una vez al día durante 29 días.

El Grupo B recibió una dosis de radiación DL90/30 (831 cGy) y después a 20 de los ratones se les administró el Péptido ID (30 ug/kg por vía subcutánea) 24 h después de la irradiación y después una vez al día durante 29 días. Los 20 ratones restantes (grupo control) recibieron PBS (por vía subcutánea) 24 h después de la irradiación y después una vez al día durante 29 días.

La supervivencia de los ratones se controló una vez al día hasta aparecer síntomas de eutanasia precoz, después dos veces/día hasta el día 30.

Como se muestra en la **FIG. 21**, la supervivencia al cabo de treinta días y el tiempo de supervivencia global de los ratones que recibieron el Péptido ID administrado por vía subcutánea aumentó significativamente en comparación con los ratones que recibieron PBS. En particular, a 796 cGy el tratamiento de los ratones presentó un índice de supervivencia del 45 % en comparación con el índice de supervivencia del 10 % del grupo de control, y a 831 cGy el tratamiento de los ratones presentó un índice de supervivencia del 20 % en comparación con el índice de supervivencia del 5 % del grupo de control.

#### **Ejemplo 18: actividad radiomitigadora en un ensayo de exploración gastrointestinal.**

La capacidad de los péptidos útiles en el método terapéutico actual para mitigar los efectos de un agente radioactivo sobre el sistema gastrointestinal se evaluó en un modelo murino de lesión por radiación. En resumen, 30 ratones C57BL/6 (macho, 20-30 gm) se usaron en este estudio.

La radiación se administró a los ratones usando rayos X Pantak HF320 (Agfa NDT Ltd., Reading, RU), activado a 300 kV, 10 mA. El tubo de rayos X tenía una filtración adicional que proporcionaba una calidad de radiación de 2,3 mm de capa de semiatenuación (HVL, *Half-Value Layer*) de Cu. La cabeza, el tórax y las patas delanteras de los ratones se cubrieron para proteger su médula ósea y se seleccionaron para la respuesta GI. Los ratones se sujetaron en un bastidor y se colocaron a una distancia foco de 700 mm del foco del tubo de rayos X. La radiación se administró a una tasa de dosis de 75,5 cGy/min (no cubiertos) y 70,0 cGy/min (cubiertos) durante un periodo de tiempo suficiente para exponer a los ratones a 15 Gy de radiación.

Veinticuatro horas después de la radiación, a 15 de los ratones se les administró Péptido ID (30 ug/kg por vía subcutánea) y después una vez al día durante el estudio y a los 15 ratones restantes (grupo control) se les administró PBS (por vía subcutánea) y después una vez al día durante el estudio.

Los ratones se pesaron y se monitorizaron una vez al día hasta que aparecieron síntomas de diarrea y de eutanasia precoz, después dos veces al día.

Como se muestra en la **FIG. 22**, la supervivencia a los veinte días de los ratones que recibieron el Péptido ID administrado por vía subcutánea fue significativamente mayor que la de los ratones que recibieron PBS (6 ratones en el grupo de tratamiento frente a 1 en el grupo control).

50

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido purificado y un transportador farmacéuticamente aceptable, en la que el péptido purificado consiste en la secuencia de aminoácidos UEQLERALNSS, en la que U es piroglutamato.
- 5 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho péptido purificado se produce por síntesis química y tiene menos de aproximadamente 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos al péptido purificado.
3. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1 o 2 que tiene actividad protectora tisular en una célula tejido u órgano sensible, en la que la actividad protectora tisular es proteger, mantener, potenciar o reestablecer la función o viabilidad de dicha célula, tejido u órgano.
- 10 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad asociada con daño tisular.
5. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular está causada por cáncer, lesiones isquémicas, traumáticas, tóxicas o inflamatorias.
- 15 6. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad cardiovascular, enfermedad cardiopulmonar, enfermedad respiratoria, enfermedad renal, enfermedad del sistema urinario, enfermedad del sistema reproductor, enfermedad ósea, enfermedad de la piel, enfermedad gastrointestinal, anomalía endocrina, anomalía metabólica, disfunción cognitiva, o una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central o periférico.
- 20 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un método de prevención, tratamiento, mejora o control del cáncer, un trastorno neoplásico, inflamación o exposición a un agente tóxico en un sujeto que lo necesite.
8. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central.
- 25 9. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular es una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso periférico.
10. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular es disfunción cognitiva.
- 30 11. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones inflamatorias.
12. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 4, en la que la enfermedad asociada con daño tisular está causada por lesiones isquémicas.

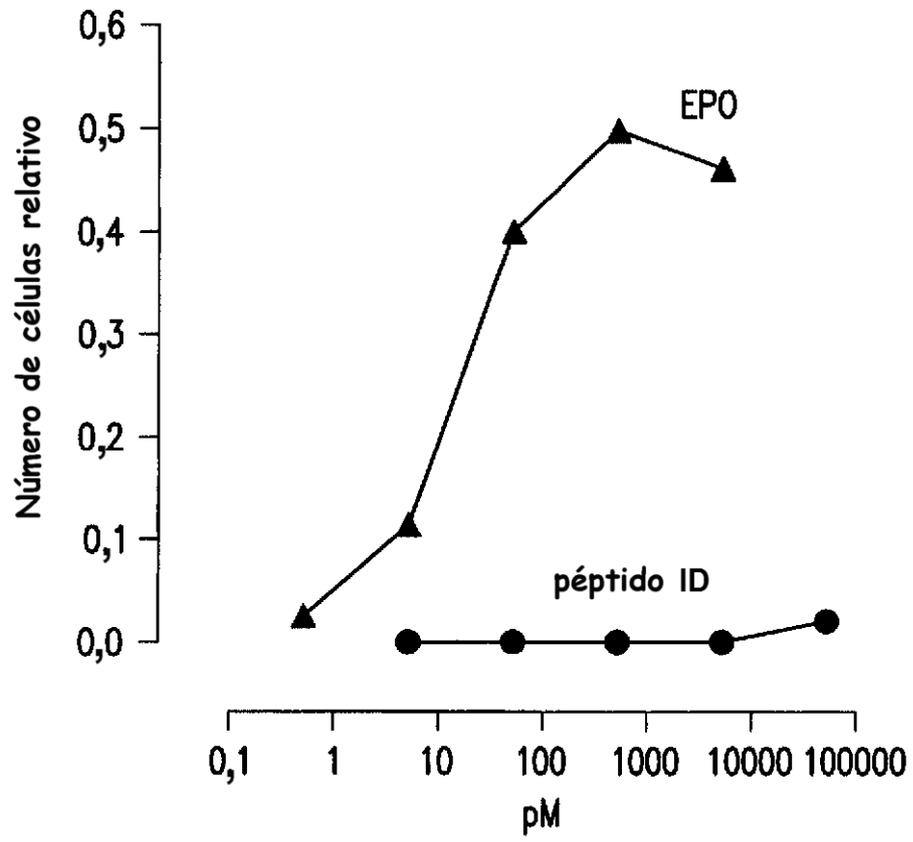


FIG. 1

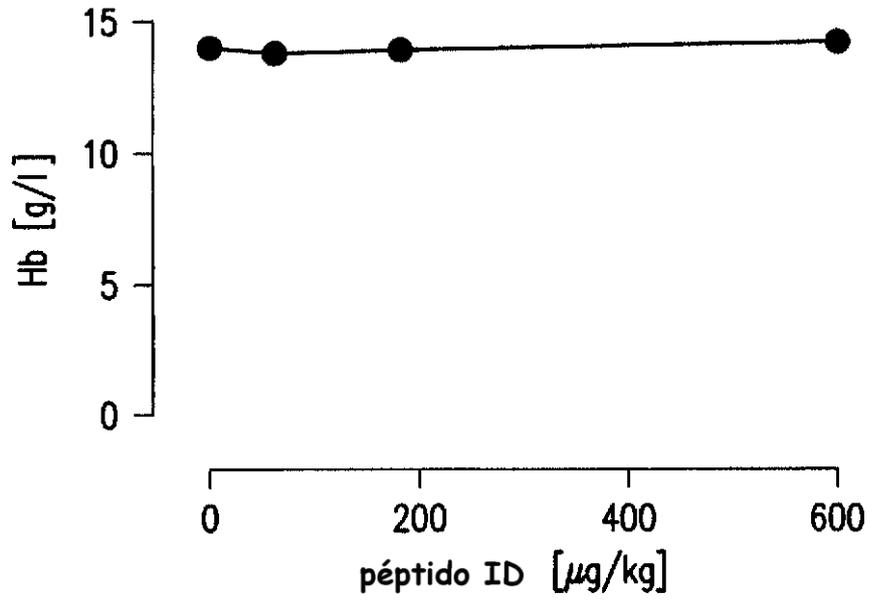


FIG.2

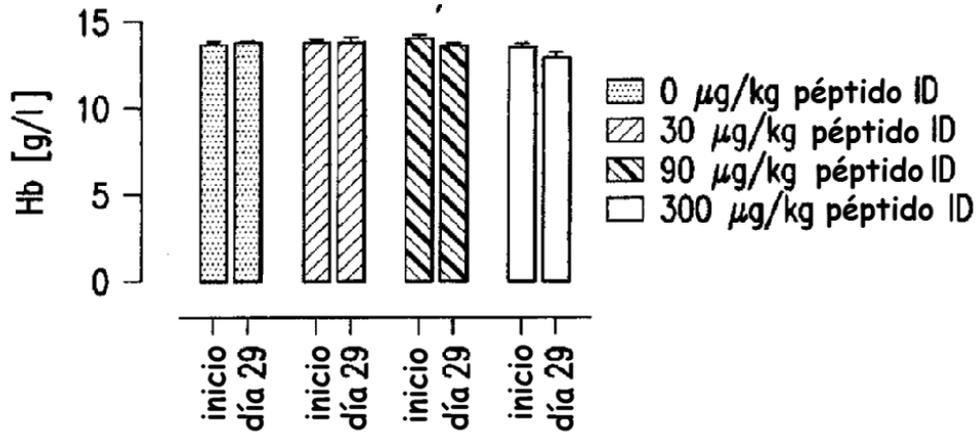


FIG.3A

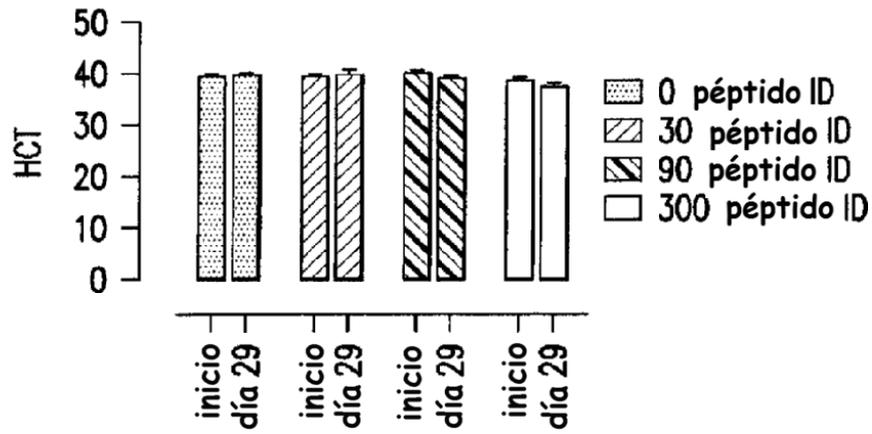


FIG.3B

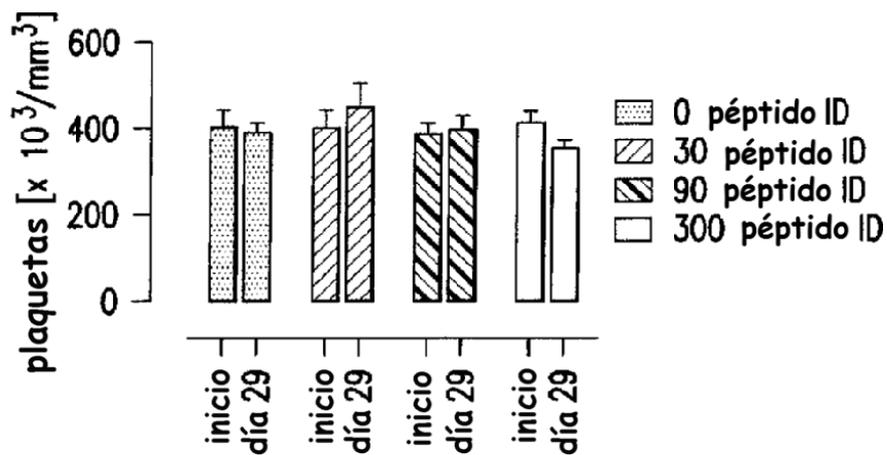


FIG.3C

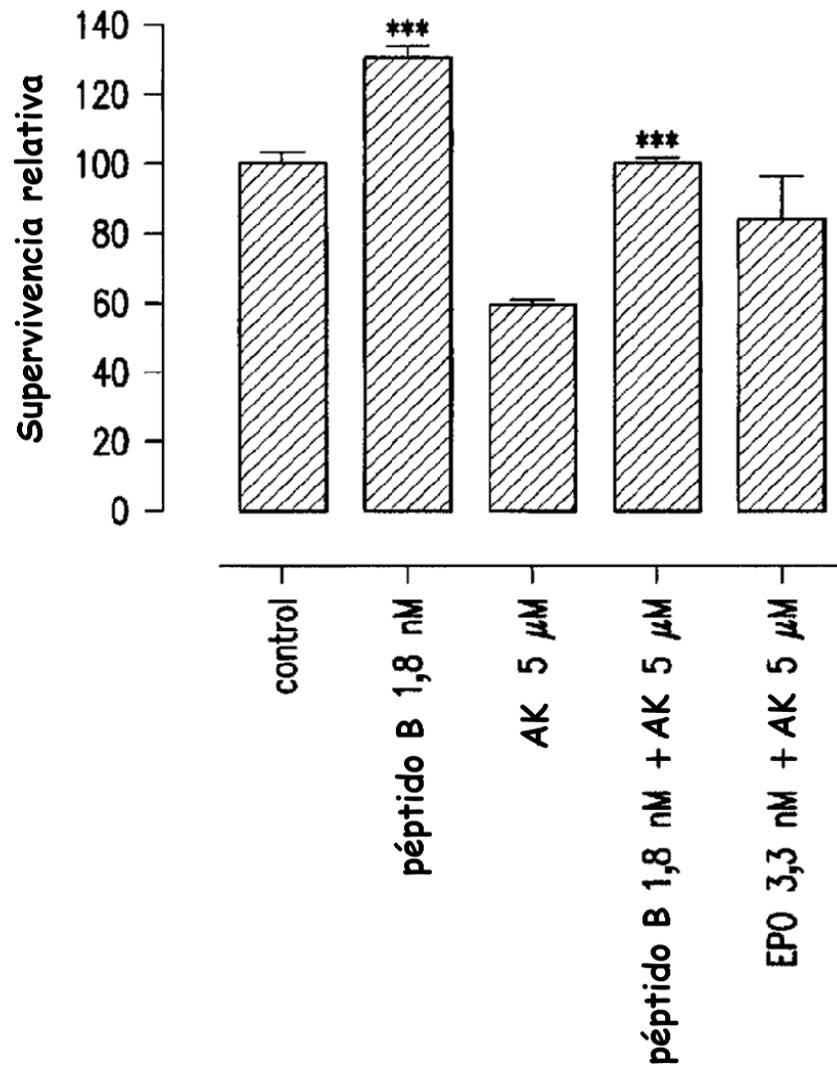


FIG.4

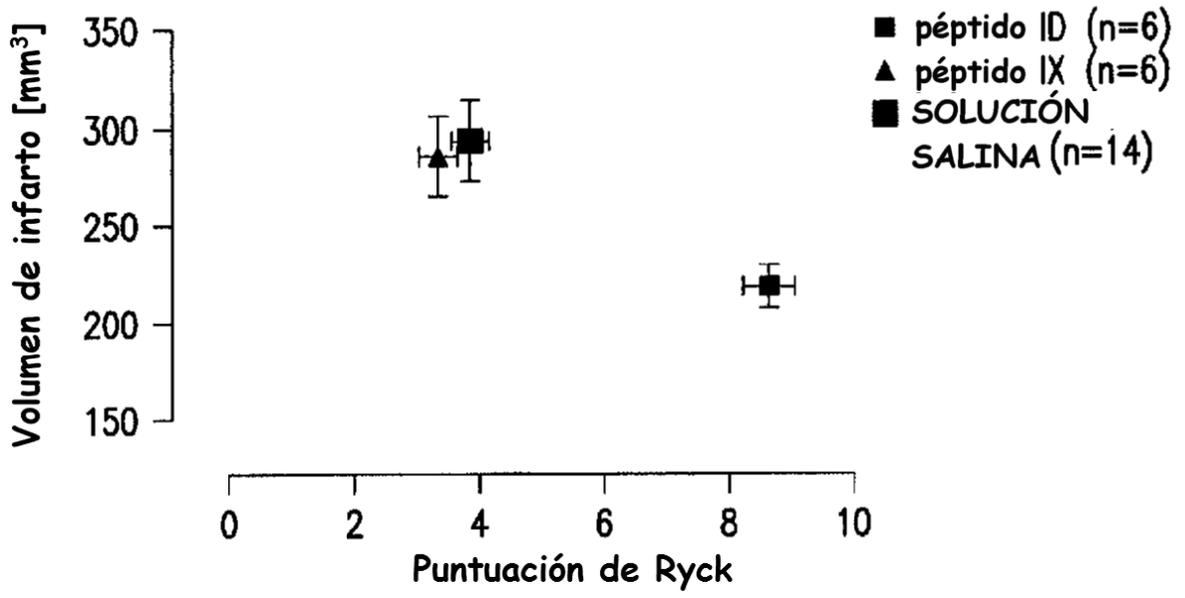


FIG.5

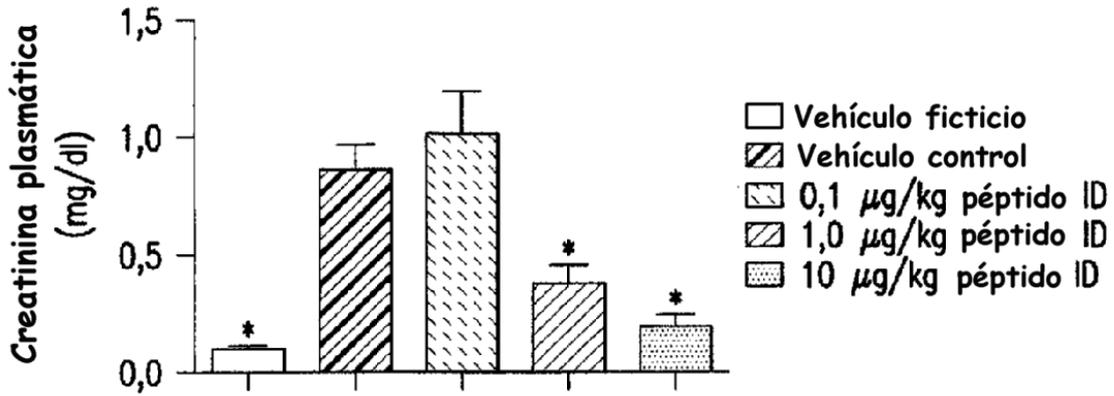


FIG.6A

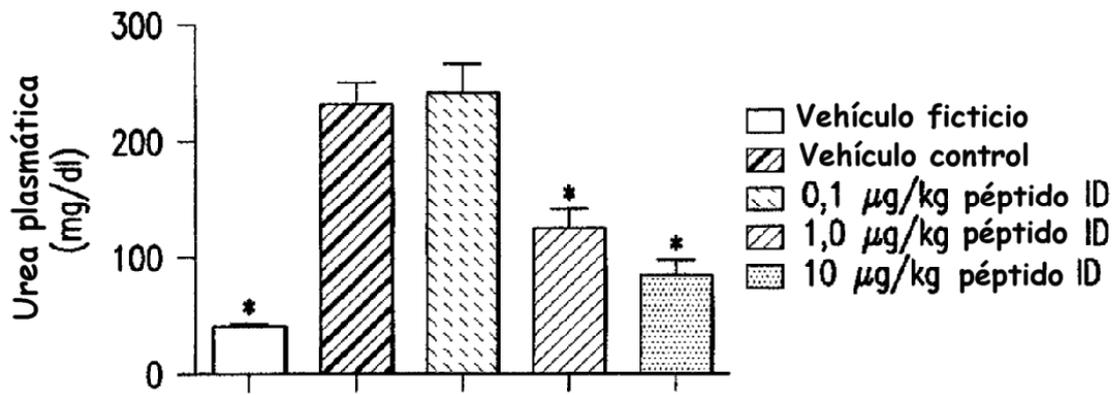


FIG.6B

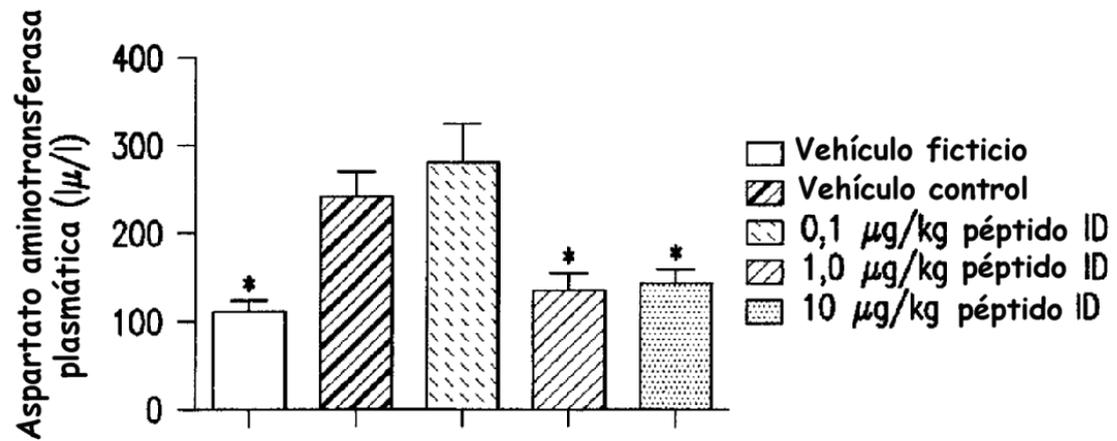
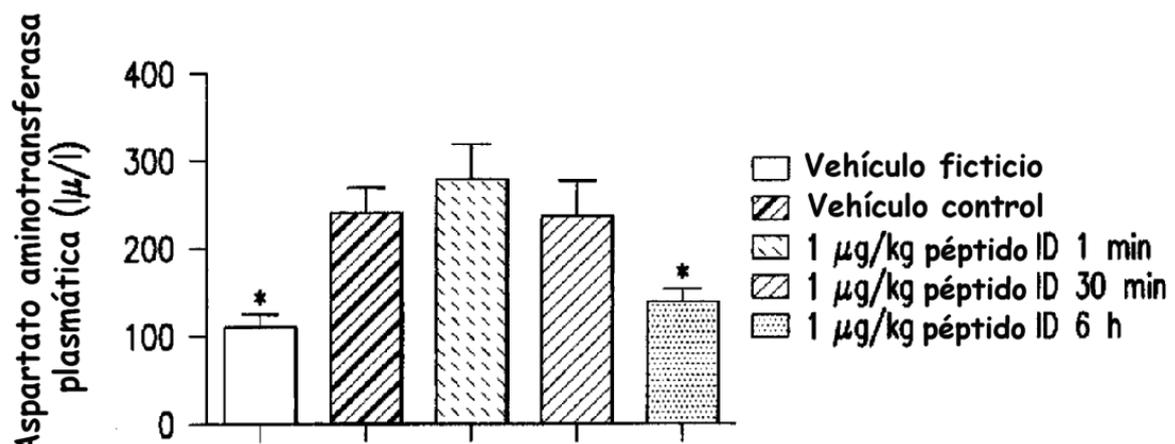
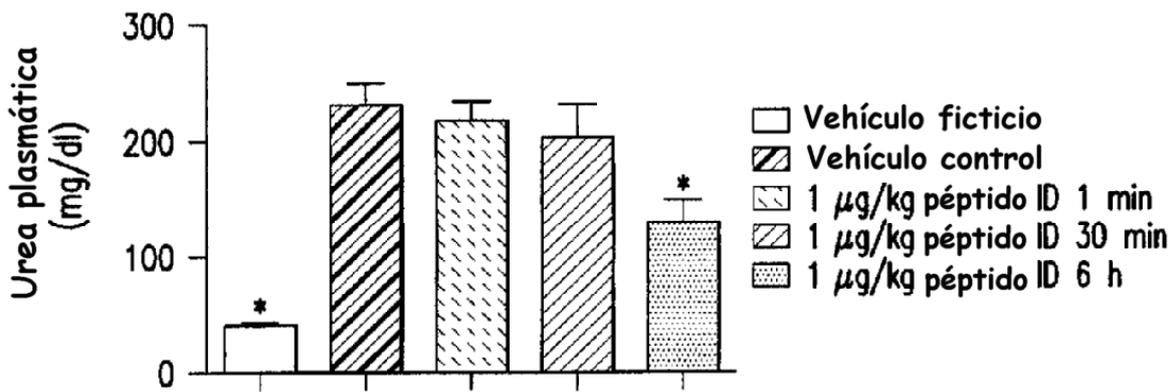
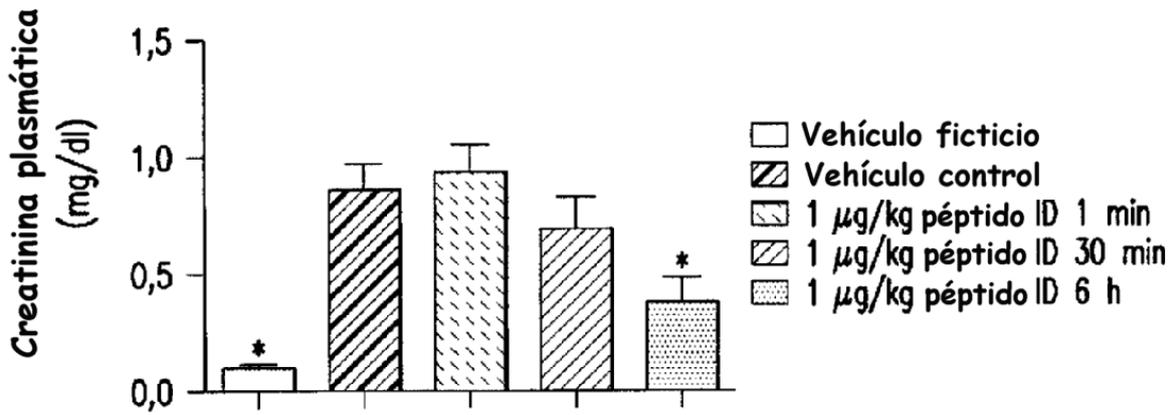


FIG.6C



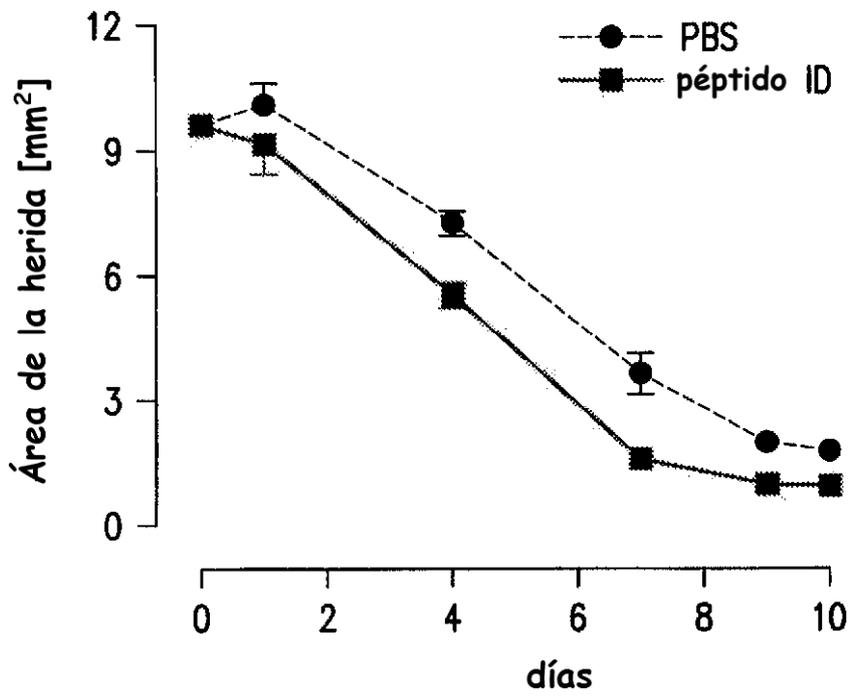


FIG.8

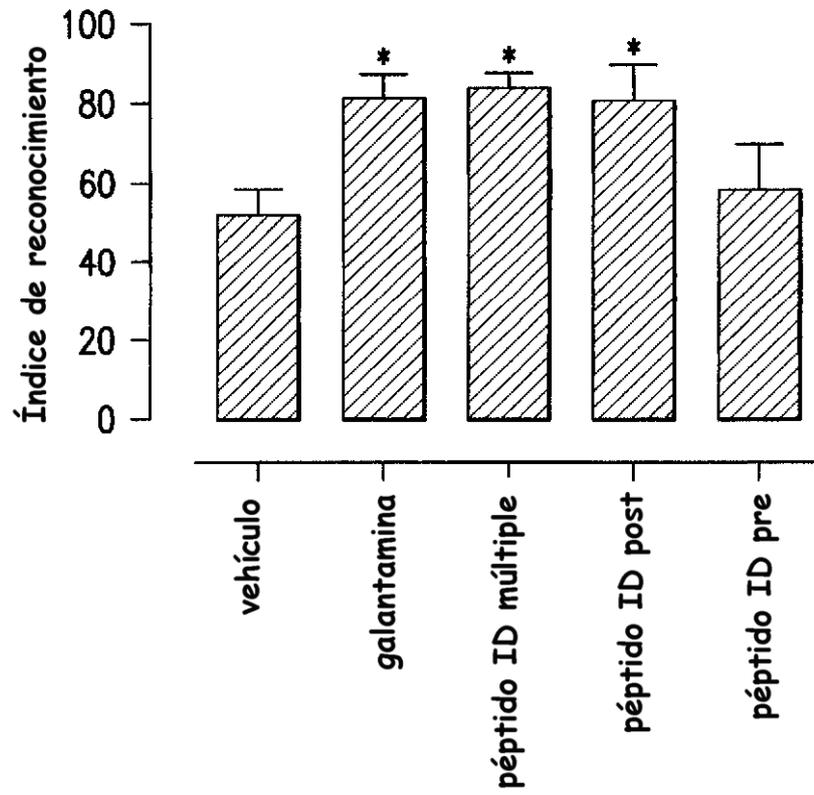


FIG.9

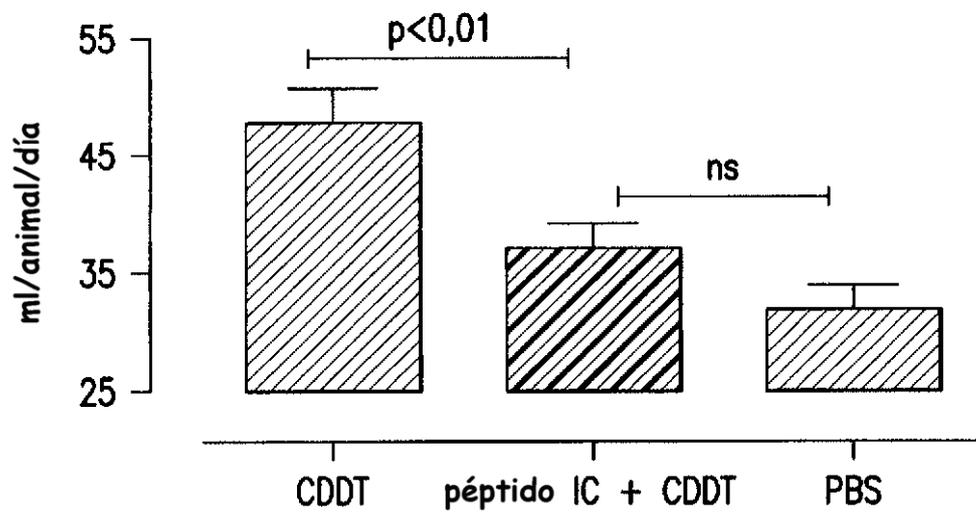


FIG.10

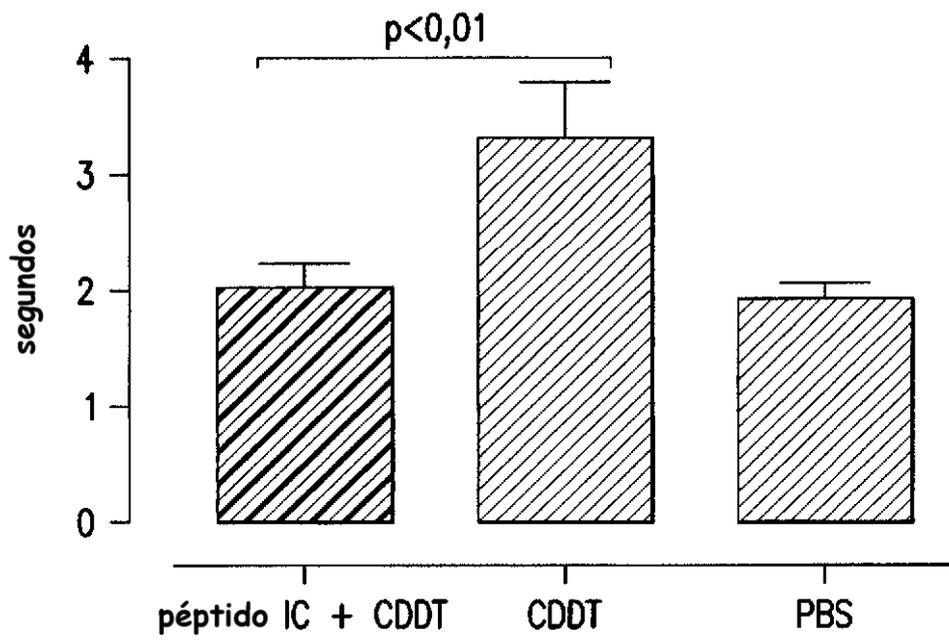


FIG. 11

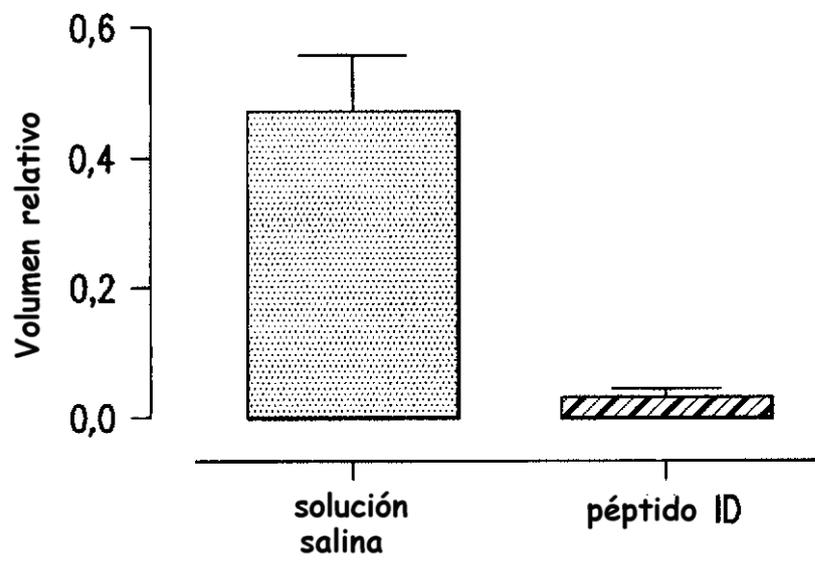


FIG.12

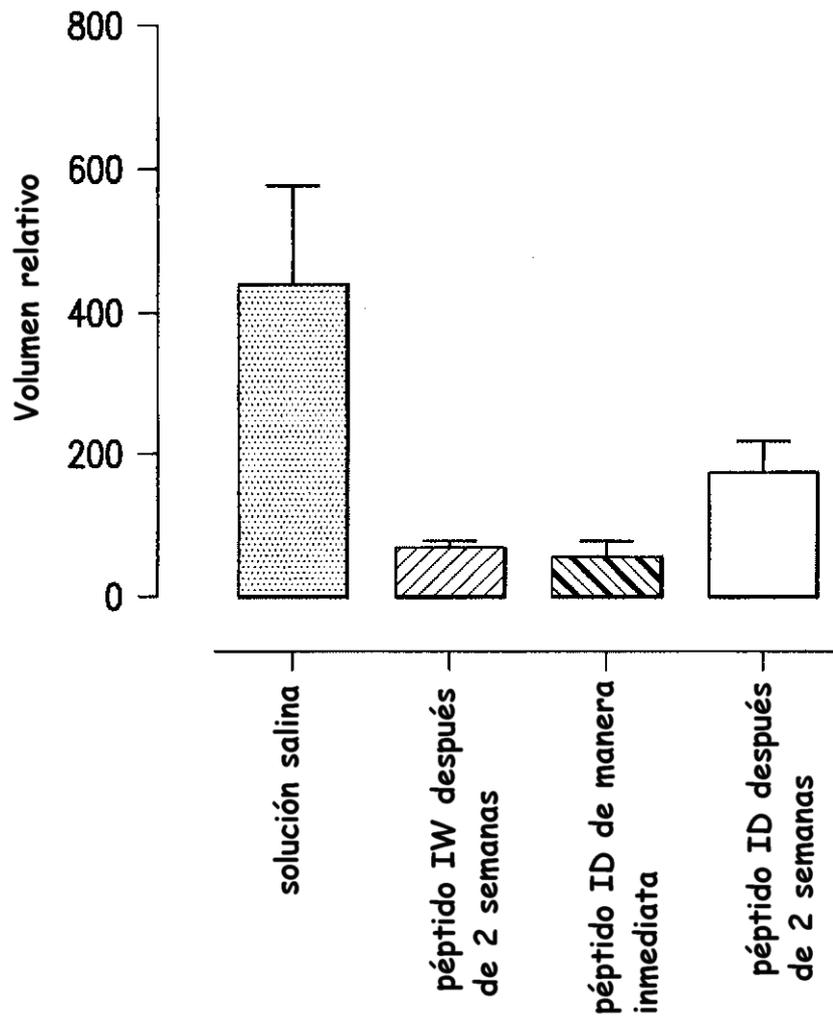


FIG. 13

4 semanas después del implante de  $10^5$  células de gliosarcoma 9L/LacZ

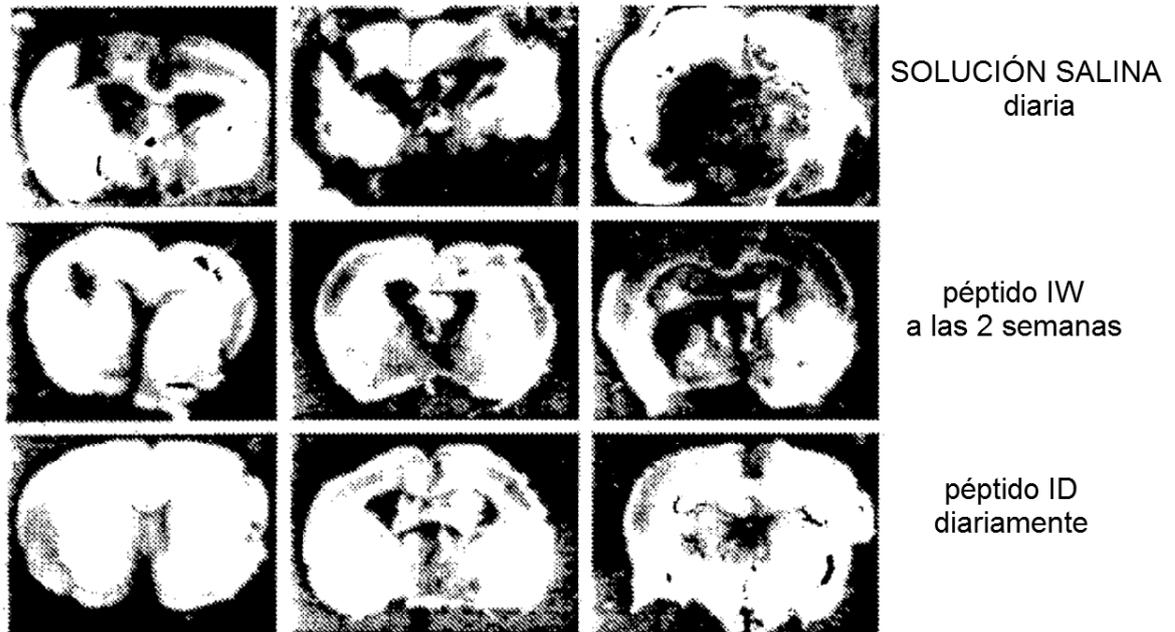


FIG. 14

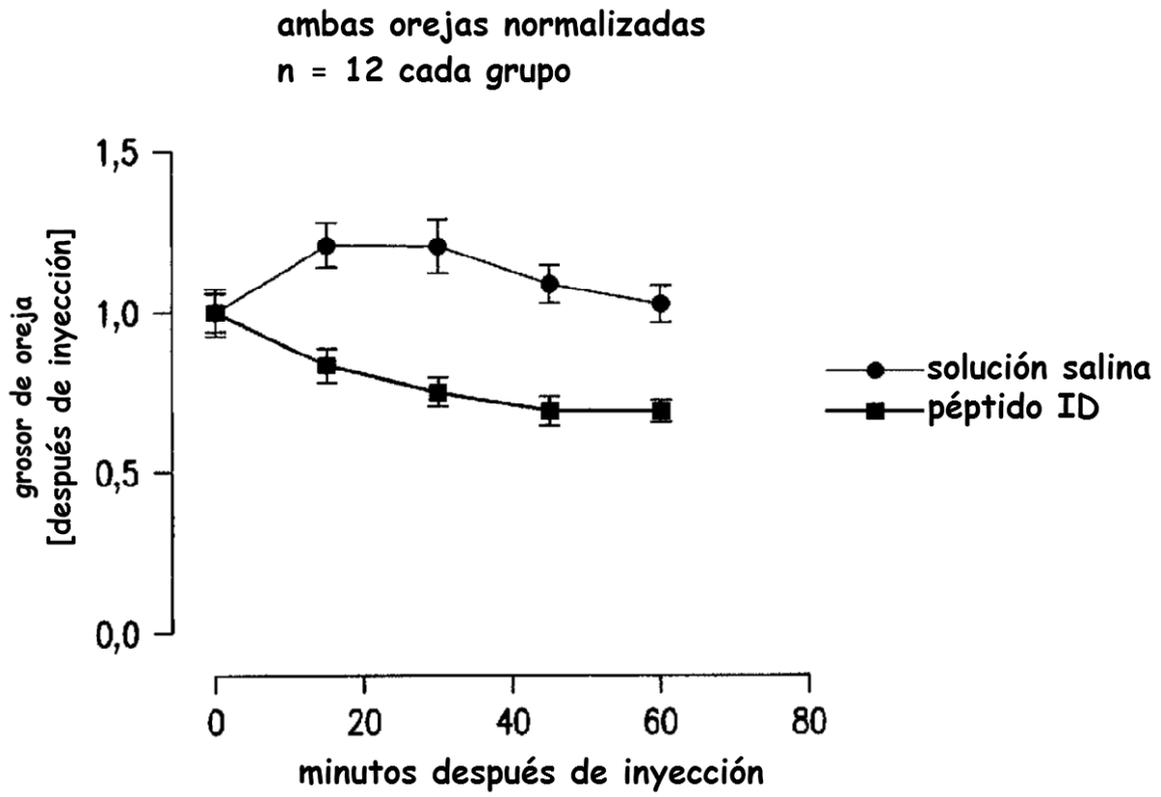


FIG.15

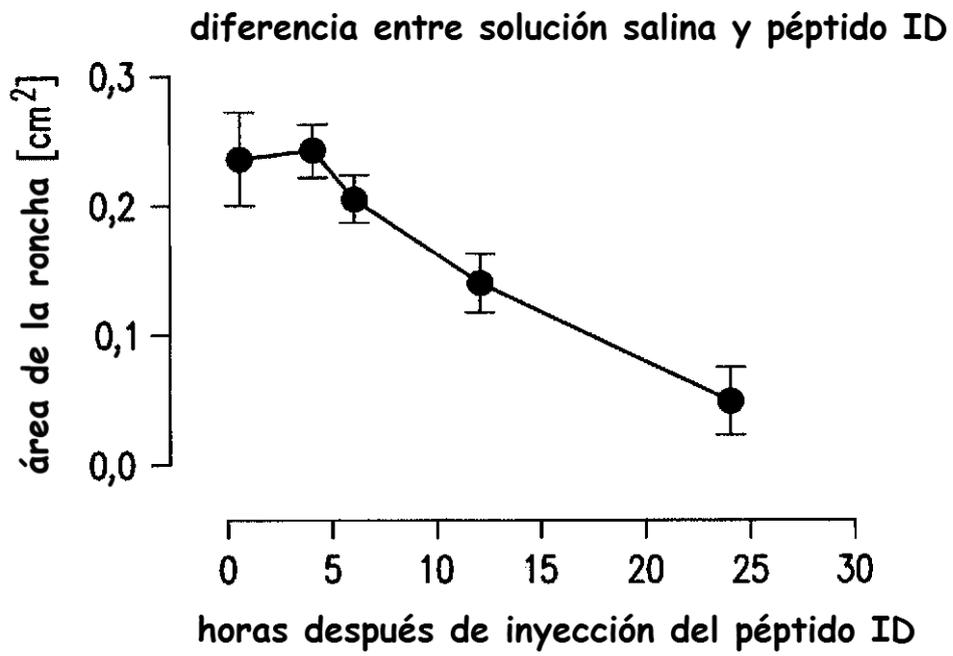


FIG.16

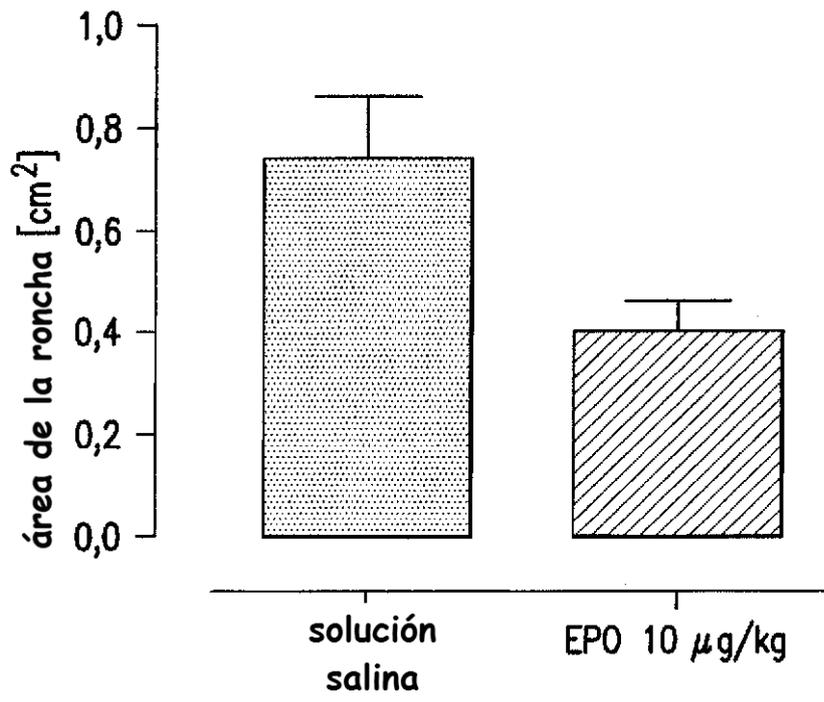
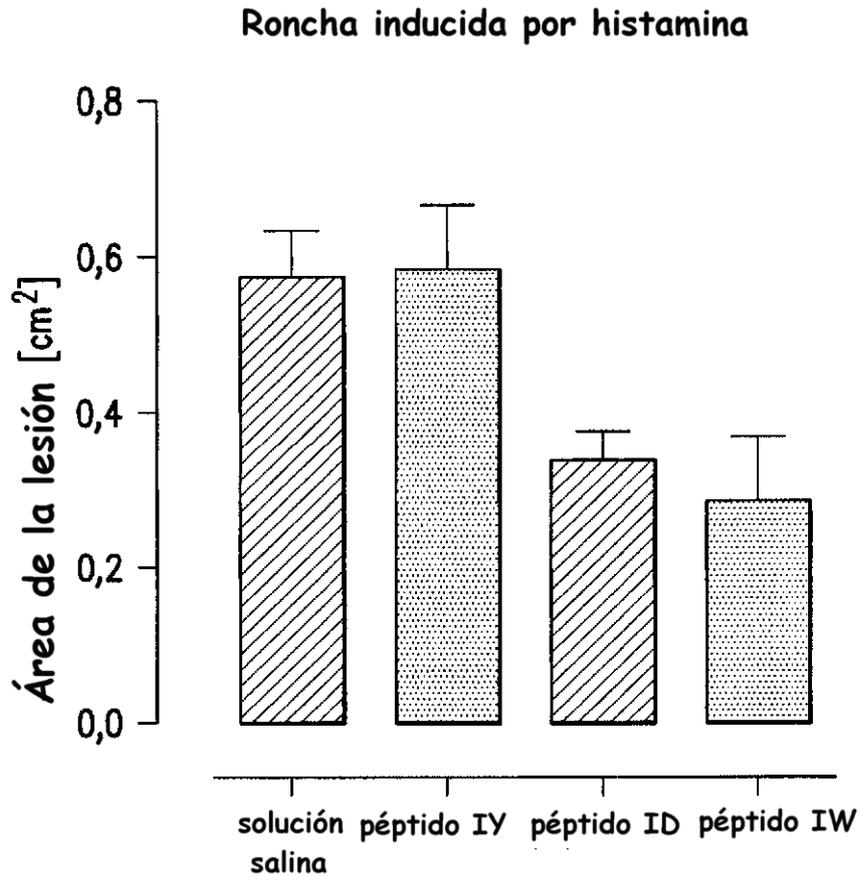


FIG. 17



**FIG.18**

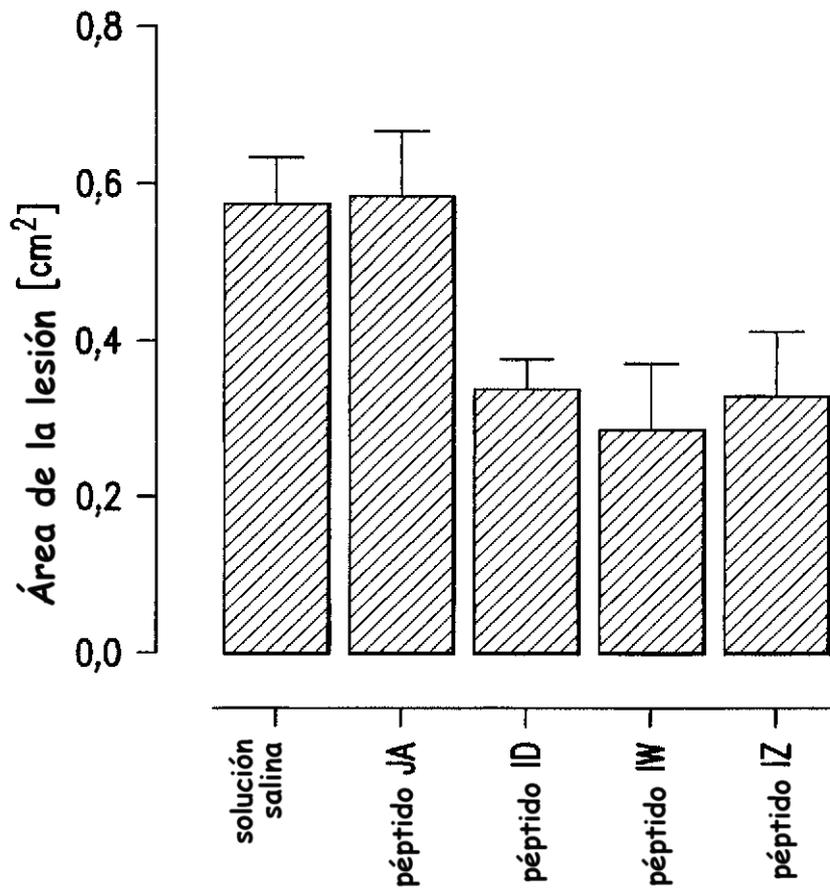


FIG. 19

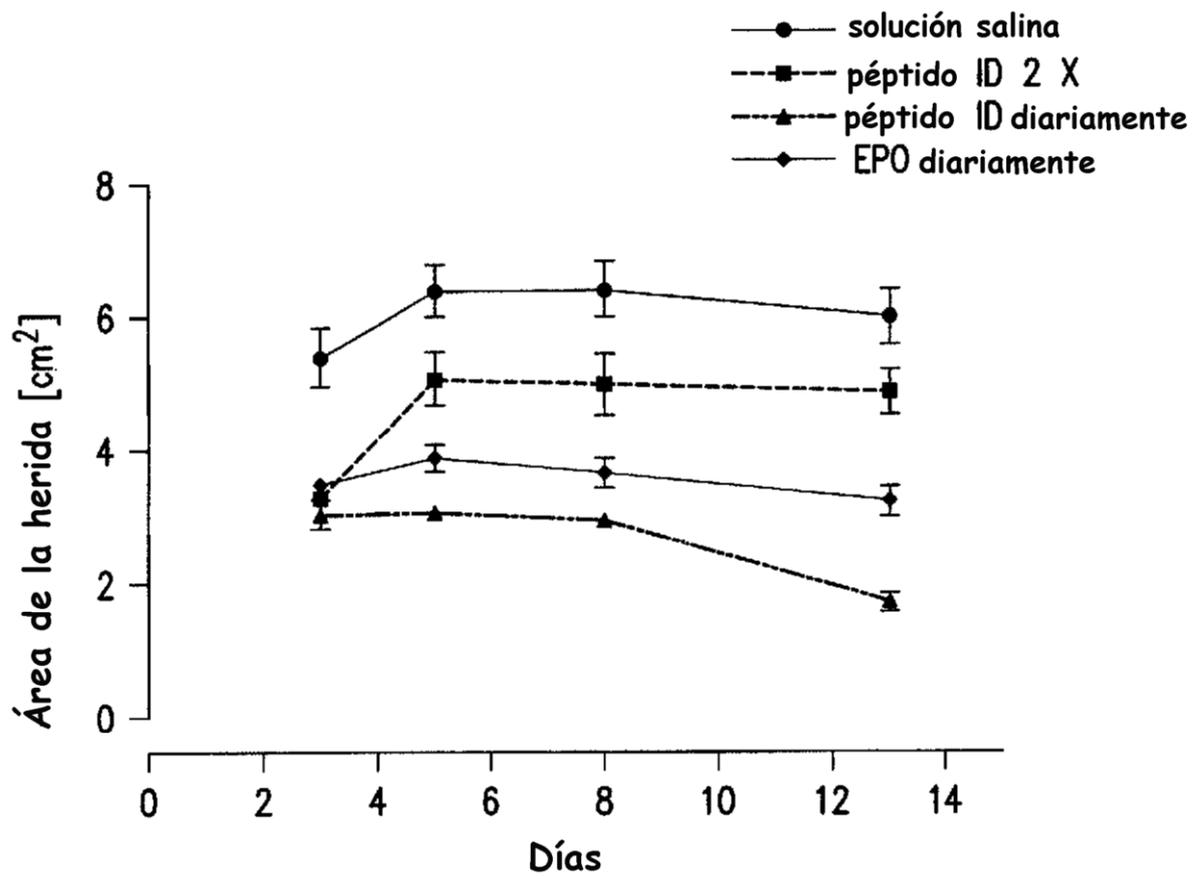


FIG.20

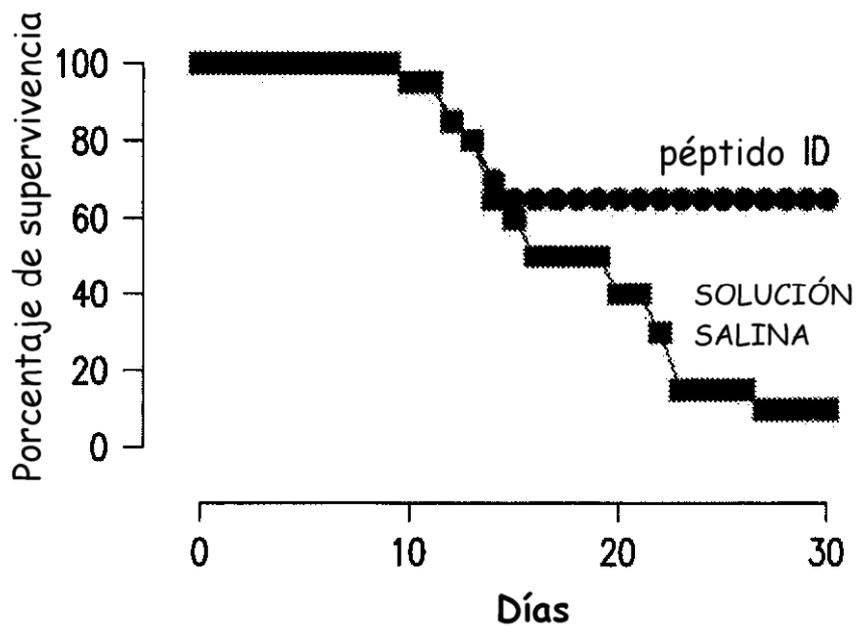


FIG.21

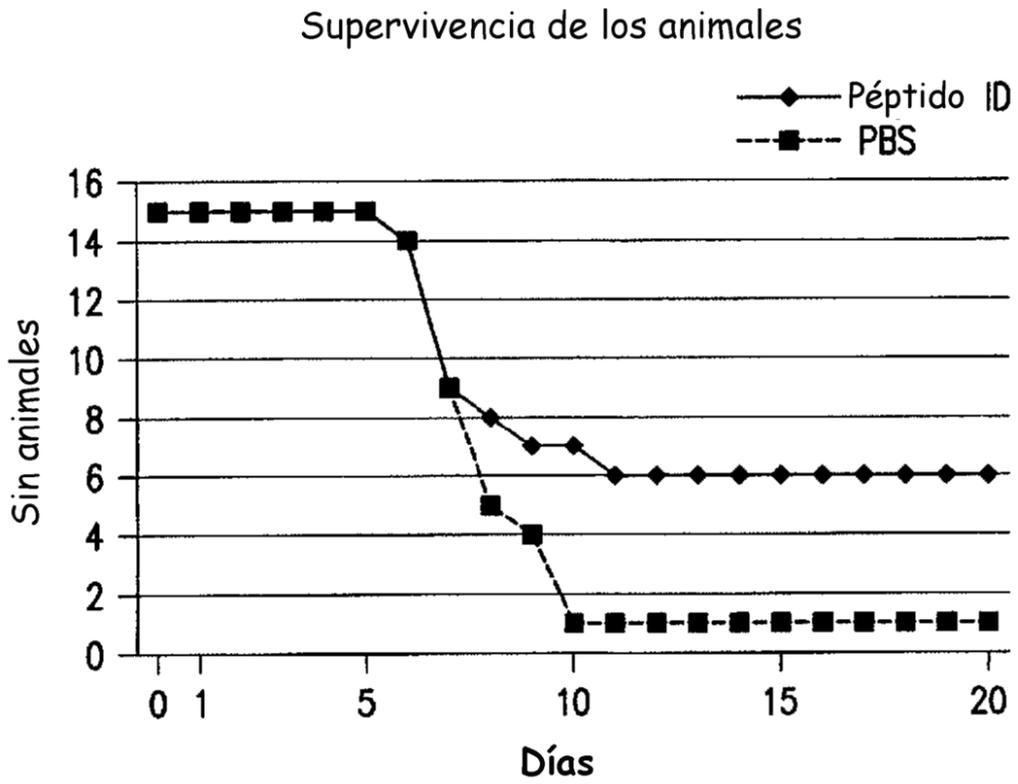


FIG.22