

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 864**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2006 E 12175352 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2540309**

54 Título: **Péptidos protectores de tejido y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**05.08.2005 US 705741 P**

**08.08.2005 US 706276 P**

**18.07.2006 US 831737 P**

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

**09.02.2018**

73 Titular/es:

**ARAIM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**580 White Plains Road, Suite 210**

**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**CERAMI, ANTHONY;**

**BRINES, MICHAEL y**

**COLEMAN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 653 864 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 protectores de tejido y usos de los mismos.

### 1. Introducción

5 La presente invención está dirigida a nuevos péptidos protectores de tejido. Los péptidos protectores de tejido de la invención pueden unirse a un complejo receptor de protección de tejido. En particular, la presente invención se refiere a péptidos protectores de tejido derivados de o que comparten secuencias de consenso con porciones de ligandos de receptores de citoquinas, incluyendo la eritropoyetina (EPO), que no están implicadas en la unión del ligando al complejo receptor, por ejemplo, al homodímero receptor de EPO. En consecuencia, los péptidos protectores de tejido de la invención se derivan de las secuencias de aminoácidos de regiones de ligandos de receptores de citoquina que generalmente se encuentran en o están dentro de la región de la proteína del ligando que se encuentra frente al complejo receptor, es decir, se derivan generalmente de secuencias de aminoácidos de regiones de la proteína de unión que se enfrentan a distancia del complejo receptor mientras que el ligando se une al receptor. La invención además está dirigida a las secuencias de consenso para su uso en la ingeniería de un péptido protector de tejido sintético. Estos péptidos protectores de tejido también incluyen fragmentos, quimeras, así como péptidos diseñados para imitar la localización espacial de los principales residuos de aminoácidos dentro de los ligandos del receptor de protección de tejido, por ejemplo, EPO.

La invención también contempla los péptidos protectores de tejido de la invención para su uso en procedimientos para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno y o tratar, restaurar o mejorar una lesión tisular. La invención también abarca péptidos protectores de tejido de la presente invención para su uso en procedimientos para mejorar la función tisular excitable.

### 2. Antecedentes de la invención

La eritropoyetina ("EPO") es una hormona glicoproteica comúnmente asociada con el mantenimiento de hematocrito y, más recientemente, la protección de tejido. La proteína EPO humana madura comprende 165 aminoácidos y tiene un peso molecular de 34 kDa, con residuos de glicosilo que contribuyen con aproximadamente 40% del peso de la molécula. La molécula EPO comprende cuatro hélices que interactúan a través de sus dominios hidrófobos para formar una estructura predominantemente globular dentro del ambiente acuoso (Cheetham et al, 1998, Nat Struct Biol 5:861-866). Wen et al., 1994, The Journal of Biological Chemistry Vol. 269, No. 36, 22839-22846, dirigido a la delineación de dominios funcionalmente importantes en EPO y ha preparado y probado una serie o sustituciones de aminoácidos en 51 sitios conservados que se predice que estarán en la superficie o en la molécula de EPO. Los experimentos de mutagénesis de Wen identificaron dominios funcionales en la superficie de EPO, en sitios comparables con los establecidos para otras citoquinas. La invención deriva del descubrimiento de que ciertos aminoácidos frente al ambiente acuoso (es decir, lejos del núcleo central globular, hidrófobo) median la protección de tejido. Los péptidos se pueden obtener o diseñar a partir de una comprensión de las regiones de protección de tejido que han sido identificadas por los solicitantes.

35 Como se señaló anteriormente, la EPO es pluripotente. En su función hormonal, EPO regula el hematocrito a través de su papel en la maduración de células progenitoras eritroides en los eritrocitos. EPO actúa como un agente antiapoptótico durante el proceso de maduración de las células progenitoras eritroides, permitiendo que las células progenitoras maduren generando eritrocitos. La disminución de niveles de oxígeno del tejido (hipoxia) desencadena un aumento de la producción de eritropoyetina por el riñón, lo que resulta en un aumento de la eritropoyesis. Dado que el riñón normalmente produce la mayoría de la eritropoyetina en suero, la pérdida de la función renal, tal como en la insuficiencia renal crónica, se traduce en la disminución de la producción de EPO y a menudo anemia. Del mismo modo, la anemia puede ser el resultado de otras afecciones crónicas, tal como cáncer, o tratamientos asociados a estas enfermedades, tal como quimioterapia, que suprimen directamente la producción de EPO. La eritropoyetina recombinante comercialmente disponible ha estado disponible bajo las marcas comerciales de PROCRIT, disponible en Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ, EPOGEN y, disponible en Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA y se ha utilizado para tratar la anemia resultante de la enfermedad renal en etapa final, terapia con AZT (zidovudina) en pacientes infectados por el VIH, pacientes oncológicos, y quimioterapia. Actualmente una eritropoyetina hiperglucosilada, ARANESP™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), está disponible para el tratamiento de la anemia. Además, estos compuestos se han utilizado para aumentar los hematocritos de pacientes sometidos a cirugía para reducir la necesidad de transfusiones sanguíneas alogénicas.

Recientemente, varias líneas de evidencia han sugerido que la EPO también funciona localmente de una manera autocrina y paracrina para minimizar el daño del tejido. Por ejemplo, la EPO mejora el microambiente de hipoxia celular y disminuye la muerte celular programada causada por el estrés metabólico. Ambas actividades son moderadas, en parte, a través de la interacción de la EPO con un receptor de superficie celular específico, en parte, comprendido por el receptor de la proteínaeritropoyetina ("EPOR"). EPOR es una proteína de aproximadamente 66 kDa y es un miembro de la familia de receptores de citoquinas de tipo 1. Esta familia comprende receptores que se agrupan en base a la homología compartida de sus dominios extracelulares e incluye receptores para interleuquina IL-2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL9, IL11, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF),

trombopoyetina, hormona del crecimiento y prolactina. El dominio extracelular conservado de estos receptores tiene una longitud de aproximadamente 200 aminoácidos, comprende cuatro residuos conservados de cisteína posicionalmente en la región amino-terminal (Cys 294, Cys 283, Cys 248, y Cys 238, que parece ser crítico para el mantenimiento y la integridad estructural de los receptores (Murray, 1996, Harpers Biochemistry 24<sup>o</sup> edición, páginas 524-526, Appilion & Lange, Ltd.; Caravella et al, 1996, Protein. Struct Funct Gen. 24: 394-401), y TPS-Ser-X-Trp-Ser (SEC ID NO: 58) motivo situado proximal al dominio de transmembrana.

En relación con la eritropoyesis, EPOR funciona de una manera similar a otros receptores dentro de la familia de receptores de citoquinas de tipo 1. En primer lugar, el ligando del receptor, por ejemplo EPO, se une a un dímero preformado de EPOR, (EPOR)<sub>2</sub>. Se ha determinado que EPO interactúa con el dominio extracelular del clásico receptor homodímero (EPOR)<sub>2</sub> a través de dos regiones distintas en la superficie del ligando: un sitio de unión del receptor de alta afinidad (sitio 1) y un sitio de unión del receptor de baja afinidad (sitio 2). Las secuencias de aminoácidos de EPO asociadas con el sitio 1 son TKVNFY, SEC ID NO: 2, correspondiente a los aminoácidos 44-49 de la SEC ID NO: 1, y SNFLRG, SEC ID NO: 3, correspondiente a los aminoácidos 146-151 de la SEC ID NO: 1; las secuencias asociadas con el sitio 2 son VLERY, SEC ID NO: 4, correspondiente a los aminoácidos 11-15 de la SEC ID NO: 1, y SGLRS, SEC ID NO: 5, correspondiente a los aminoácidos 100-104 de la SEC ID NO: 1. (Cheetham et al, 1998, Nature Structural Biology 5: 861-866). La activación del homodímero EPOR conduce a la fosforilación de tirosina de las proteínas de señalización que se asocian con EPOR, por ejemplo, tirosina quinasas Jak2, que a su vez pueden activar varias vías diferentes, incluyendo, por ejemplo, la vía de fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa, vía quinasa Ras/MAP, y/o la vía STAT. Estas vías desencadenan las funciones antiapoptóticas necesarias para la eritropoyesis que están mediadas por la eritropoyetina (Kiritto et al, 2002, Blood 99: 102-110; Livnah et al, 1999, Science 283: 987-990; Naranda et al, 2002, Endocrinology 143: 2293-2302 mil; Remy et al, 1999, Science 283:990-993; y Yoshimura et al, 1996, The Oncologist 1: 337-339).

Recientemente, los solicitantes han descubierto que las propiedades protectoras de tejido de EPO están mediadas por un receptor que comprende no sólo EPOR sino también otra proteína del receptor, el receptor común beta ("βc"). El receptor EPOR/βc es, en contraste con el homodímero (EPOR)<sub>2</sub>, un heterocomplejo (ver más abajo) y se sabe que juega un papel en la protección de tejido excitables. Véase, por ejemplo, WO 2004/096148 y PCT no. PCT/US01/49479, presentada el 28 de diciembre de 2001, Solicitud de Patente Estadounidense No. 09/753.132, presentada el 29 de diciembre de 2000, y 10/188.905, presentada el 3 de julio de 2002. Aunque los solicitantes habían establecido que el receptor βc es central para las vías de protección de tejido en estos tejidos excitables, la estructura de los ligandos activadores para los receptores era aún desconocida.

### 3. Compendio

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que consisten en no más de 15 residuos de aminoácidos y que comprende la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO: 35), donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular. La actividad protectora celular se determina in vivo en un modelo animal de protección contra lesión del nervio ciático, o en el que la actividad protectora celular comprende neuroprotección, se determina in vitro mediante un método que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto un cultivo de prueba de neuronas de hipocampo primarias con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y

(b) determinar la viabilidad celular a las 48 horas después de dicho contacto, de manera que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que la de un cultivo control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado, que consiste en la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEQ ID NO: 35).

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO: 35) donde un residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos es reemplazada con una sustitución de aminoácido conservadora o no conservadora o un equivalente de aminoácido, que tiene una modificación de la cadena lateral o una sustitución de la cadena lateral y en el que dicho polipéptido tiene actividad protectora celular. La actividad protectora celular se determina in vivo en un modelo animal de protección contra lesión del nervio ciático, o en el que la actividad protectora celular comprende neuroprotección, se determina in vitro mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un cultivo de prueba de neuronas de hipocampo primarias con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y

(b) determinar la viabilidad celular a las 48 horas después de dicho contacto, de manera que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que la de un cultivo control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular. En una realización preferida, dicho residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza con una sustitución de aminoácidos conservadora o no conservadora. En otra realización preferida, dicho residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza por un aminoácido

equivalente que tiene una modificación de cadena lateral o sustitución de cadena lateral.

En algunas realizaciones, el polipéptido aislado de la invención se modifica con una adición de polietilenglicol.

5 En ciertas realizaciones, el polipéptido aislado de la invención tiene la actividad protectora celular en tejido excitable que se selecciona del grupo que consiste en tejido del sistema nervioso central y tejido del sistema nervioso periférico.

10 En ciertas realizaciones, el polipéptido aislado de la invención es capaz de atravesar una barrera de células endoteliales seleccionada del grupo que consiste en la barrera hematoencefálica, la barrera de sangre-ojo, la barrera de sangre-testículos, la barrera de sangre-ovario, la barrera de sangre-nervio y la barrera de sangre-médula espinal.

15 La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido aislado de la invención y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración oral, intranasal, ocular, por inhalación, transdérmica, rectal, sublingual, o parenteral. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como una solución de perfusión.

La presente invención además proporciona un procedimiento *in vitro* para proteger, mantener, o potenciar la viabilidad de una célula neuronal, tejido u órgano sensible aislado de un cuerpo de mamífero que comprende exponer dicha célula neuronal, tejido u órgano *in vitro* al polipéptido aislado de la invención o a la composición farmacéutica de la invención. En ciertas realizaciones el cuerpo de mamífero es un cuerpo humano.

20 La presente invención también proporciona el polipéptido aislado de la invención para su uso en un procedimiento de prevención, tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central o periférico en un sujeto que lo necesita. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado de la invención.

25 También en la presente memoria se proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico. Este vector puede ser un vector de expresión.

También se proporciona una célula huésped que contiene dicho vector de expresión.

30 Además en la presente memoria se proporciona un procedimiento para producir en forma recombinante el polipéptido aislado que comprende (a) cultivar en un medio la célula huésped de la presente invención, en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido, y (b) recuperar y aislar dicho polipéptido de dicho medio.

35 La presente invención en general se refiere a polipéptidos aislados que tienen al menos una actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible, cuyos polipéptidos contienen motivos de aminoácidos que comprenden la secuencia de consenso (a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; (b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , donde es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; (c)  $L_1-N_1 (X)_n-N_2-H_1$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; (d)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1; o (e)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1, y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa,  $X$  es cualquier aminoácido,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva. Estos péptidos pueden carecer actividad eritropoyética por ejemplo, no incrementan la hemoglobina o hematocrito en un receptor. Los polipéptidos aislados pueden consistir en no más de 10, no más de 15, no más de 20, o no más de 30 aminoácidos. El péptido aislado puede tener menos de 90 %, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%,  
40 menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55%, menos de 50%, menos de 45%, menos de 40%, menos de 35%, menos de 30%, o menos de 20 por ciento de identidad de secuencia con cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de eritropoyetina humana madura ("EPO") expuesta en la SEC ID NO:1, donde dicha porción de EPO contiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho péptido.

45 En el polipéptido aislado que comprende el motivo estructural (a)  $H_1-N_1(X)_n-N_2-H_2$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5 (contenido por los identificadores de secuencia 6-11, respectivamente, debatidos más abajo); (b)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1 (contenido por los identificadores de secuencia 24-25, respectivamente, debatidos más abajo); o (e)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1 (contenido por los identificadores de secuencia 26-27, respectivamente, debatidos más abajo),  $H_1$  y  $H_2$  pueden ser el mismo aminoácido hidrofóbico. En el polipéptido aislado que comprende los motivos estructurales (a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; (d)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1; o (e)  $H_1-P_1(L)_n-N_1-H_2$ , donde  $n$  es 0 o 1,  $H_1$  y  $H_2$  pueden ser aminoácidos hidrofóbicos diferentes. También se describe un polipéptido aislado que comprende el motivo de aminoácido (a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; (b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; (c)  $L_1-N_1 (X)_n-N_2-H_1$ , donde  $n$  es 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y donde  $N_1$  y  $N_2$  pueden ser aminoácidos con carga negativa iguales o diferentes.

55 En los polipéptidos aislados que comprenden los motivos de aminoácido descritos anteriormente, dichos motivos pueden estar formados por aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido. En ejemplos específicos dicho un polipéptido aislado comprende el motivo de aminoácido  $H_1-N_1-N_2-H_2$  (SEC ID NO:6),  $H_1-N_1-X-N_2-H_2$  (SEC ID NO:7),  $H_1-N_1-X-X-N_2-H_2$  (SEC ID NO:8),  $H_1-N_1-X-X-X-N_2-H_2$  (SEC ID NO:9),  $H_1-N_1-X-$

X-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:10), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:11), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:12), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:13), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:14), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:15), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:16), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-X-N<sub>2</sub>-L<sub>1</sub> (SEC ID NO:17), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:18), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:19), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:20), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:21), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:22), L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-X-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:23), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:24), H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:25), H<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:26), o H<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:27), donde H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> son aminoácidos hidrofóbicos, N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> son aminoácidos con carga negativa, X es cualquier aminoácido, L<sub>1</sub> es un aminoácido polar, y P<sub>1</sub> es un aminoácido con carga positiva. En ciertos aspectos, donde el polipéptido aislado comprende un motivo que tiene los residuos de aminoácidos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> pueden ser iguales o pueden ser diferentes aminoácidos hidrofóbicos. En otros aspectos, donde el polipéptido aislado comprende un motivo que tiene los residuos de aminoácidos N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>, N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> pueden ser aminoácidos con carga negativa iguales o diferentes.

Además se describen polipéptidos aislados donde el motivo de aminoácido se forma debido a la organización espacial de aminoácidos dentro de la estructura terciaria de un polipéptido, es decir, los aminoácidos que forman el motivo son espacialmente adyacentes entre sí en la estructura tridimensional, es decir, la estructura terciaria, del polipéptido pero pueden estar separados por 1 o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos primaria de la cadena de polipéptidos. En un ejemplo específico, el motivo de aminoácido que comprende los residuos de aminoácidos H<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub> análogos a la SEC ID NO:6, debatida más arriba, pueden formar como resultado de la estructura terciaria adoptada por, es decir, el plegamiento de proteínas de péptidos que comprenden, por ejemplo, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, SEC ID NO:10 o SEC ID NO:11, donde los residuos de aminoácidos entre N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>, por ejemplo (X)<sub>n</sub>, se pliegan de manera tal que N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> se vuelven linealmente adyacentes. Por consiguiente se describen péptidos aislados que comprenden el motivo de aminoácido H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>L<sub>1</sub>; L<sub>1</sub>N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>H<sub>1</sub>; H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>(L)<sub>n</sub>P<sub>1</sub>H<sub>2</sub>, donde n es 0 o 1; o H<sub>1</sub>P<sub>1</sub>(L)<sub>n</sub>N<sub>1</sub>H<sub>2</sub>, donde n es 0 o 1, cuyos motivos se forman como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido. Donde el motivo de aminoácido comprende N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>, las estructuras terciarias se forman de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å, preferentemente aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å, y más preferentemente aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å. Donde el motivo de aminoácido comprende N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub>, las estructuras terciarias se forman de manera tal que la distancia entre N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> se limitan espacialmente de manera tal que la separación de carga, por ejemplo, las cadenas laterales cargadas, de las dos está entre aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å. N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> de ese modo están limitadas espacialmente como resultado de estar en una secuencia de aminoácidos que forma la totalidad o una porción de una hélice alfa, y pueden estar separadas por 1, 2, o más de 2 aminoácidos en la secuencia de dichos aminoácidos que forman dicha hélice. Donde el motivo de aminoácido comprende N<sub>1</sub> y P<sub>1</sub>, las estructuras terciarias se forman de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de N<sub>1</sub> y P<sub>1</sub> es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å, preferentemente aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å, y más preferentemente aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å. Donde el motivo de aminoácido comprende N<sub>1</sub> y P<sub>1</sub>, las estructuras terciarias se forman de manera tal que la distancia entre N<sub>1</sub> y P<sub>1</sub> están espacialmente limitadas de manera tal que la separación de carga, por ejemplo, las cadenas laterales cargadas, de las dos está entre aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å. N<sub>1</sub> y P<sub>1</sub> están limitadas espacialmente como resultado de estar en una secuencia de aminoácidos que forma la totalidad o una porción de una hélice alfa, y pueden estar separadas por 1, 2, o más de 2 aminoácidos en la secuencia de dichos aminoácidos que forman dicha hélice. Los aminoácidos que forman el motivo dentro de la estructura terciaria de dicho polipéptido están separados entre sí por un número igual de residuos de aminoácidos intervinientes en la secuencia de aminoácidos lineal de dicho polipéptido. Los aminoácidos que forman el motivo dentro de la estructura terciaria de dicho polipéptido están separados entre sí por un número diferente de residuos de aminoácidos intervinientes en la secuencia de aminoácidos lineal de dicho polipéptido. A veces, el polipéptido aislado forma una estructura terciaria regular, por ejemplo, α-hélice o hoja plisada β, de manera tal que la superficie de dicha estructura presenta los aminoácidos que comprenden dicho motivo, y de ese modo el motivo mismo, respecto de la interfaz de la estructura de proteínas y el medio acuoso, es decir, presenta el motivo sobre la superficie del polipéptido plisado. Las estructuras terciarias de los polipéptidos de la invención preferentemente se forman en un medio acuoso en condiciones fisiológicas, por ejemplo, PBS (13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, pH 7,4) a 37 °C.

La invención proporciona polipéptidos aislados que comprenden un motivo de aminoácido según lo descrito anteriormente en este documento, es decir péptido K (WEHVNAIQEARRLL, SEC ID NO:35). También se describen polipéptidos aislados que comprenden los motivos de aminoácidos descritos anteriormente en este documento, por ejemplo, péptido A (APRLICDSRVLERYLLEAKEAE, SEC ID NO:32), péptido C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEC ID NO:29), péptido D (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEC ID NO:30), péptido E (GCAEHCSLNENITVPTKVN, SEC ID 146-31), péptido F RYLLEAKEAENITTGC, SEC ID NO:33), péptido G (QEQLERALNSS, SEC ID NO:40), péptido I (CSLNENIQQLERA, LNSS, SEC ID NO:43), péptido J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTP, SEC ID NO:41), o péptido L (KIRSDLTALTESYVKH, SEC ID NO:37).

Se describen polipéptidos aislados que comprenden 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, o más de 6 motivos de aminoácidos que se describen en el presente documento. En aspectos específicos, donde el polipéptido aislado comprende al menos dos de los motivos de aminoácidos descritos anteriormente en este documento, dichos al menos dos motivos pueden ser el mismo motivo o pueden ser motivos diferentes.

En ciertos aspectos, los polipéptidos aislados de la invención que carecen de una actividad eritropoyética, por ejemplo, que incrementan la hemoglobina en un receptor. Preferentemente, los polipéptidos aislados carecen de otras actividades incluyendo, pero sin limitarse a, acción vasoactiva (por ejemplo, vasoconstricción), hiperactivación de plaquetas, actividades pro-coagulantes y estimulación de la proliferación y/o producción de trombocitos y/o células dependientes eritropoyéticas (véase, Coleman et al., 2006, PNAS 103:5965-5970). En otros aspectos, los polipéptidos aislados de la invención comprenden al menos una actividad protectora celular. Dicha actividad protectora celular incluye, pero sin limitarse a, proteger, mantener, potenciar o restaurar la función o viabilidad de una célula, tejido u órgano sensible de mamífero. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención está dirigida al uso de un polipéptido aislado de la invención para la preparación de composiciones farmacéuticas para proteger, mantener, potenciar, o restaurar la función o viabilidad de células sensibles de mamíferos y sus células, tejidos, y órganos asociados. En realizaciones relacionadas, las composiciones son para la administración a un sujeto que la necesita. En realizaciones preferentes, dicho sujeto es un mamífero y, preferentemente, un ser humano.

En otros aspectos, la presente invención está dirigida al uso de un polipéptido aislado de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la protección contra y/o prevención de una lesión de tejido sensible, para la restauración de, o para el rejuvenecimiento de tejido sensible y/o función del tejido sensible en un sujeto que lo necesita. En un aspecto particular, las células de mamífero sensibles y sus células, tejidos, u órganos asociados son distales a la vasculatura en virtud de una barrera estrecha de células endoteliales. En otro aspecto particular, las células, tejidos, órganos u otras partes corporales se aíslan de un cuerpo de mamífero, tal como los destinados a trasplante. A modo de ejemplos no limitativos, una célula o tejido sensible puede ser célula o tejido neuronal, ocular (por ejemplo, retinal), adiposo, conectivo, de cabello, dientes, mucosal, pancreático, endocrino, de oído, epitelial, de piel, muscular, cardíaco, pulmonar, hepático, renal, intestinal, adrenal (por ejemplo, corteza adrenal, médula adrenal), capilar, endotelial, testicular, ovárico, óseo, de piel, o del endometrio. Además, los ejemplos no limitativos de células sensibles incluyen fotorreceptoras (bastones y conos), de ganglio, bipolares, horizontales, amacrinas, de Müller, de Purkinje, de miocardio, marcapasos, nodo sinatrial, nódulo sinusal, tejido de articulación, nódulo auriculoventricular, haz de His, hepatocitos, estrelladas, Kupffer, mesangial, epitelial renal, intersticial tubular, células calciformes, glándula intestinal (criptas), endocrino enteral, glomerular, fasciculada, reticular, cromafines, pericitos, Leydig, de Sertoli, esperma, folículo Graffian, folículo primordial, islotes de Langerhans, células alfa, células beta, células gamma, células F, osteoprogenitoras, osteoclastos, osteoblastos, estroma endometrial, endometriales, madre y endoteliales. Estos ejemplos de células sensibles son meramente ilustrativos. En un aspecto, la célula sensible o sus células asociadas, tejidos, u órganos son células, tejidos, u órganos excitables, o comprenden predominantemente células o tejidos excitables. En ciertos aspectos de la invención, el tejido excitable es tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, tejido cardíaco o tejido retinal. En otro aspecto, la célula sensible o sus células, tejidos, u órganos asociados no son células, tejidos, u órganos excitables, tampoco comprenden en forma predominante células o tejidos excitables.

La actividad protectora celular y/o eritropoyética del polipéptido aislado de la invención en células sensibles puede ser evaluada y/o determinada por cualquier procedimiento que se describe en el presente documento y o es conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, La actividad protectora celular y/o eritropoyética se determina en un ensayo in vitro. En otras realizaciones, la actividad protectora celular y/o eritropoyética se determina en un ensayo in vivo. En una realización relacionada, cuando la actividad protectora celular se determina en un ensayo in vivo, se puede determinar en un modelo animal de protección contra lesiones del nervio ciático. En una realización relacionada, donde la actividad protectora celular es neuroprotección, la invención proporciona un procedimiento para evaluar dicha actividad in vitro mediante (a) el contacto de un cultivo de ensayo de las neuronas primarias del hipocampo con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y (b) la determinación de la viabilidad celular 48 horas posteriores a dicho contacto, de manera tal que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que aquella de un cultivo de control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular.

En una realización particular, la célula, tejido u órgano de mamífero para el que se utiliza el péptido aislado mencionado más arriba son aquellos que se han pasado o pasarán un período de tiempo en al menos una condición adversa para la viabilidad de la célula, tejido u órgano. En conformidad con la presente realización, los péptidos aislados de la invención proporcionan protección contra y/o prevención de una lesión de tejido resultante de dichas afecciones, proporcionan la restauración de, o proporcionan el rejuvenecimiento de tejido y/o función del tejido en un sujeto que lo necesita antes, durante o después de que surgen dichas afecciones. Dichas afecciones incluyen hipoxia traumática in situ o disfunción metabólica, quirúrgicamente inducida por hipoxia in situ o disfunción metabólica, o exposición a tóxicos in situ, este último puede estar asociado con quimioterapia o radioterapia. En otras realizaciones, los péptidos aislados de la invención proporcionan protección contra y/o prevención de una lesión de tejido resultante de una enfermedad o trastorno, proporcionan la restauración de, o proporcionan el rejuvenecimiento de tejido y/o función del tejido en un sujeto que lo necesita antes, durante o después de que surjan dichas afecciones. En realizaciones relacionadas dicha lesión es causada por un trastorno convulsivo, esclerosis múltiple, derrame cerebral, hipotensión, paro cardíaco, isquemia, infarto de miocardio, inflamación, pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad, daño por radiación, parálisis cerebral, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad mitocondrial, demencia por SIDA, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, trastorno del estado de ánimo, trastorno de ansiedad, trastorno de déficit de atención, autismo, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, traumatismo cerebral o de la médula espinal o isquemia, derivación corazón-pulmón, insuficiencia cardíaca crónica, degeneración macular, neuropatía diabética,

5 retinopatía diabética, hepatitis, pancreatitis, glaucoma, isquemia retiniana, trauma de la retina, enfermedad cardiovascular, enfermedad cardiopulmonar, enfermedad respiratoria, enfermedad renal, enfermedad del sistema urinario, enfermedad del sistema reproductor, enfermedad ósea, enfermedad de la piel, enfermedad del tejido conectivo, enfermedad gastrointestinal, anormalidad endócrina, anormalidad metabólica, o una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central o periférico. En aún otras realizaciones, las condiciones adversas son resultado de un bypass cardiopulmonar (máquina de corazón-pulmón), que se utiliza para ciertos procedimientos quirúrgicos. Aún en otras realizaciones, dicha lesión es disfunción cognitiva. En una realización en particular, la célula, tejido u órgano de mamífero para la cual se utiliza un péptido aislado antes mencionado expresan el receptor βc..

10 En ciertas realizaciones, la invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos aislados mencionados más arriba para la administración a un sujeto que lo necesita. En aspectos específicos en conformidad con la presente realización, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo aceptable para uso farmacéutico. Dichas composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración oral, intranasal, ocular, por inhalación, transdérmica, rectal, sublingual, vaginal, o parenteral, o en la forma de una solución de perfusión para mantener la viabilidad de células, tejidos, u órganos ex vivo. En 15 realizaciones relacionadas de la invención el sujeto es un animal mamífero, preferentemente un ser humano.

20 En otros aspectos, los polipéptidos aislados de la invención pueden utilizarse en un procedimiento para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un sujeto que lo necesita que comprende la administración a dicho sujeto de una composición que comprende dicha molécula en asociación con un péptido aislado de la invención descrito anteriormente. En una realización relacionada, la asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de unión para dicha molécula.

25 De acuerdo a otro aspecto, el péptido aislado de la invención, según lo descrito anteriormente en este documento, es capaz de atravesar una barrera de células endoteliales. La barrera de células endoteliales puede comprender la barrera hemato-cerebral, la barrera hemato-ocular, la barrera hemato-testicular, la barrera hemato-ovárica, la barrera hemato-placenta, la barrera hemato-cardíaca, la barrera hemato-renal, la barrera hemato-nerviosa, o hemato-espinal.

De acuerdo a un aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido aislado de la invención.

30 En otra realización de la invención, se proporciona un molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos (es decir, un ADNc, una secuencia de nucleótidos interrumpida por intrones, o no interrumpida por intrones), que codifica un polipéptido que comprende o que consiste en el polipéptido aislado de la invención según lo descrito anteriormente en este documento. En una realización, la secuencia de nucleótidos, que codifica el polipéptido aislado de la invención, es sintetizada utilizando codones preferentes que facilitan la expresión óptima en una célula huésped particular. Dichos codones preferentes pueden ser óptimos para la expresión en 35 células de una especie de planta, bacteria, levadura, mamífero, hongo, o insecto.

40 La invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico. La invención también proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico y al menos una región reguladora operativamente unida a la molécula de ácido nucleico. En otra realización, la invención proporciona una célula que comprende el vector de expresión. En aún otra realización, se proporciona una célula manipulada genéticamente que comprende la molécula de ácido nucleico.

45 En otra realización, la invención proporciona para un procedimiento para producir en forma recombinante el péptido aislado de la invención, descrito anteriormente en este documento, que comprende cultivar en un medio una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención, en condiciones apropiadas para la expresión de dicho péptido, y recuperar y/o aislar el polipéptido expresado de dicho medio.

### 3.1 Terminología

Como se utiliza en el presente documento, los términos "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se utilizan junto con un número se refieren a cualquier número dentro de 1, 5, o 10% del número de referencia.

50 El término "administrado en combinación con" en el contexto de los procedimientos de la invención significa administrar un compuesto antes de, al mismo tiempo que, y/o posterior a la aparición de una enfermedad, trastorno, o afección.

55 El término "aminoácido" o cualquier referencia a un aminoácido específico pretende incluir aminoácidos proteogénicos de origen natural así como aminoácidos no naturales tal como análogos de aminoácidos. Los expertos en la técnica sabrían que esta definición incluye, a menos que se indique específicamente lo contrario, (L)-aminoácidos proteogénicos de origen natural, sus isómeros (D) ópticos, aminoácidos químicamente modificados, incluyendo análogos de aminoácidos tal como penicilamina (3-mercapto D-valina), aminoácidos no proteogénicos de origen natural tal como norleucina y proteínas químicamente sintetizadas que tienen propiedades conocidas en la

técnica que son características de un aminoácido. Como se utiliza en el presente documento, los aminoácidos estarán representados por su acrónimo de tres letras o símbolo de una letra de la siguiente manera: alanina = Ala o A, arginina = Arg o R, asparagina = Asn o N, ácido aspártico = Asp o D, cisteína = Cys o C, ácido glutámico = Glu o E, glutamina = Gln o Q, glicina = Gly o G, histidina = Su o H, isoleucina = Ile o Yo, leucina = Leu o L, lisina = Lys o K, metionina = Met o M, fenilalanina = Phe o F, prolina = Pro o P, serina = Ser o S, treonina = Thr o T, triptófano = Trp o W, tirosina = Tyr o Y, y valina = Val o V. Además, el término "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 manera tal que pueden ser sustituidos dentro de un péptido, que conserva su actividad biológica a pesar de la sustitución. De ese modo, por ejemplo, los equivalentes de aminoácidos pueden incluir aminoácidos que tienen modificaciones de cadena lateral o sustituciones, y también incluyen ácidos orgánicos relacionados, amidas o similares. El término "aminoácido" pretende incluir equivalentes de aminoácido. El término "residuos" se refiere tanto a aminoácidos como equivalentes de aminoácidos. Los aminoácidos pueden también clasificarse en los siguientes grupos como se conoce comúnmente en la técnica: (1) aminoácidos hidrofóbicos: His, Trp, Tyr, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala; (2) aminoácidos hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr; (3) aminoácidos polares: Ser, Thr, Asn, Gln; (4) Aminoácidos con carga negativa /ácidos: Asp, Glu; (5) aminoácidos con carga: Asp, Glu, Arg, Lys, His; (6) aminoácidos con carga positiva: Arg, Lys, His; y (7) aminoácidos básicos: His, Lys, Arg.

Como se utiliza en el presente documento, "tejido excitable" significa tejido que contiene células excitables. Las células excitables son células que responden activamente a un estímulo eléctrico y tienen un diferencial de carga eléctrica a través de sus membranas celulares. Las células excitables son generalmente capaces de experimentar un potencial de acción. Dichas células suelen expresar canales, tal como canales dependientes de voltaje, dependientes de ligandos, y estrechos que permiten el flujo de iones (potasio, sodio, calcio, cloruro, etc.) a través de la membrana. El tejido excitable incluye tejido neuronal, tejido muscular, y tejido glandular. El tejido excitable incluye, pero no se limita a, tejidos neuronales tal como tejido del sistema nervioso periférico (oído y retina) y del sistema nervioso central (cerebro y médula espinal); tejido cardiovascular tal como las células del corazón y de los nervios asociados; y tejido glandular tal como el páncreas donde canales de calcio T-tipo, junto con uniones de separación de célula a célula participan en la secreción de insulina. Una lista de ejemplos de tejido excitable incluye órganos y tejidos que incluyen nervios, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, útero, sistema nervioso central, médula espinal, cerebro, retina, sistema olfativo, sistema auditivo, etc.

El término "célula huésped" como se utiliza en el presente documento se refiere a la célula de sujeto particular transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de una célula puede no ser idéntica a la célula madre transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en las generaciones venideras o la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" esta sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de tejido o célula de la que se deriva la proteína o polipéptido, o sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones del polipéptido en las que el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células de las que se encuentra aislada o es producido de manera recombinante. De ese modo, un polipéptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en este documento como una "proteína contaminante"). Cuando el polipéptido se produce de forma recombinante, preferentemente también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el polipéptido se produce por síntesis química, preferentemente está sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos, es decir, que está separado de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente tales preparaciones del polipéptido tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferente, los polipéptidos de la invención están aislados o purificados.

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. Por otra parte, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización específica, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención es aislada o purificada.

Como se utiliza en el presente documento en referencia a una estructura dentro de un polipéptido, el término "motivo" se refiere ya sea a un conjunto de aminoácidos consecutivos dentro de la secuencia de aminoácidos de la cadena de polipéptidos y/o a un conjunto de aminoácidos linealmente adyacentes dentro de la estructura terciaria de dicho polipéptido. Porque el motivo puede formarse todo o en parte, como resultado del plegamiento de proteínas, 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 polipéptido.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a la secuencia de aminoácidos restringida (es decir, que tiene algún elemento de estructura como, por ejemplo, la presencia de aminoácidos que inician un giro  $\beta$  o lámina plegada  $\beta$ , o por ejemplo, ciclado por la presencia de residuos de Cys unidos a disulfuro) o no restringida (por ejemplo, lineal). En general, el péptido de la invención consiste en menos de 30 aminoácidos. Sin embargo, tras la lectura de la presente descripción, el experto reconocerá que no es la longitud de un péptido particular sino su capacidad de unirse a un complejo receptor de protección de tejido y/o competir con la unión de un péptido que se describe en el presente documento lo que distingue al péptido de la invención. Los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" también se refieren a compuestos que contienen equivalentes de aminoácidos u otros grupos distintos de aminoácidos, al tiempo que conserva la actividad funcional deseada de un péptido. Los equivalentes peptídicos pueden diferir de péptidos convencionales mediante la sustitución de uno o más aminoácidos con ácidos orgánicos relacionados (tal como PABA), aminoácidos o similares o la modificación o sustitución de cadenas laterales o grupos funcionales.

El término "prevención de una enfermedad, trastorno, o afección" significa retrasar el comienzo, dificultar el avance, dificultar la aparición, protección contra, inhibir o eliminar la aparición, o reducir la incidencia, de tal enfermedad, trastorno, o afección. El uso del término "prevención" no pretende dar a entender que todos los pacientes en una población de pacientes a los que se les administra una terapia preventiva nunca desarrollarán la enfermedad, trastorno, o afección específica que se busca prevenir, sino más bien que la población de pacientes exhibirá una reducción en la incidencia de la enfermedad, trastorno, o afección. Por ejemplo, muchas vacunas contra la gripe no son 100% efectivas en la prevención de la gripe en aquellos a los que se administra la vacuna. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente los pacientes y situaciones para quienes la terapia preventiva sería beneficiosa, tal como, pero sin limitarse a, los individuos que están por participar en actividades que pueden llevar a un traumatismo y lesiones (por ejemplo, soldados que participan en operaciones militares, pilotos de carrera de automóviles, etc.), pacientes en los que se planea cirugía, pacientes con riesgo de enfermedades hereditarias, trastornos o afecciones, pacientes con riesgo de enfermedades, trastornos o afecciones precipitadas por factores ambientales, o porciones de la población con riesgo de determinadas enfermedades, trastornos o afecciones tal como ancianos, niños o personas con sistemas inmunes debilitados, o aquellos pacientes con genética u otros factores de riesgo para una enfermedad, trastorno o afección.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Como se utiliza en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" hacen referencia a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, y ratón) y un no primate (por ejemplo, un mono o un ser humano), y más preferentemente un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, el término "actividad protectora de tejido" o "protección de tejido" se refiere al efecto de inhibir o retrasar el daño o muerte de una célula, tejido u órgano. A menos que se indique lo contrario, el "retraso" en el daño o la muerte de una célula, tejido u órgano se evalúa con respecto a una condición de control en ausencia de un péptido de la invención. La actividad protectora de tejido es útil en diversas afecciones, enfermedades y daño de célula, tejido y/u órgano, por ejemplo, en las que se describen en la sección 5.3. La actividad protectora de tejido es específica de tejido, células, y/u órganos que expresan un complejo receptor de protección de tejido (por ejemplo, una célula tejido y u órgano sensible, respectivamente), tal como, pero sin limitarse a, los tejidos del sistema nervioso central. En realizaciones específicas, las células sensibles no son células progenitoras de eritrocitos

El término "complejo receptor de protección de tejido" como se utiliza en el presente documento significa un complejo que comprende al menos una subunidad del receptor de eritropoyetina y al menos una subunidad del receptor común beta. El complejo receptor de protección de tejido puede contener múltiples subunidades del receptor de eritropoyetina y/o subunidades del receptor común beta, así como otros tipos de receptores o proteínas. Véase el documento WO 2004/096148.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima. Los residuos de aminoácidos en posiciones correspondientes de aminoácidos se comparan entonces. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones X 100%). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En una realización 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 porción de la secuencia más larga, donde dicha porción tiene la misma longitud que dicha secuencia más corta.

#### 4. Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 representa los resultados de un modelo de lesión de nervio ciático in vivo para comparar la eficacia del péptido J (SEC ID NO:41) con la molécula protectora de tejido EPO carbamilada (CEPO), donde el péptido J, SEC ID NO:41, es un péptido quimérico que consiste en los aminoácidos enfrentados externos de hélice B de EPO (es decir, péptido G, SEC ID NO:40) combinados con una hélice anfipática de polipéptido pancreático (LRRYINMLTRP, SEC ID NO:28)

La FIG.2 representa los efectos de protección de tejido de los péptidos de la invención según lo probado en un modelo de lesión de nervio ciático in vivo. En el ensayo, el nervio ciático derecho de ratas (n = 6 por grupo) se lesionó y el animal inmediatamente fue dosificado con PBS, o PBS que contenía concentraciones molares iguales de EPO carbamilada, EPO péptido A (SEC ID NO: 32, correspondiente a los aminoácidos 1-23 de la SEC ID NO: 1), péptido D (SEC ID NO: 30, correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO: 1), o péptido G (SEC ID NO: 40). Péptido G (SEC ID NO: 40) se basa en aquellos aminoácidos dentro de la hélice B de EPO que se enfrentan hacia el exterior desde el centro globular de la molécula EPO en el medio hidrofílico, es decir, presentes en la superficie del polipéptido. Además, un 20-mer construido a partir de una región del factor derivado del epitelio pigmentario que se sabe que es protector de tejido a través de otro receptor se incluyó como un control negativo. La recuperación de la lesión durante los próximos 4 días demuestra que el péptido G, SEC ID NO: 40, y péptido D, SEC ID NO: 30, exhiben un efecto protector de tejido en este ensayo de modelo in vivo que es equivalente a o mejor que la EPO carbamilada (CEPO).

La FIG. 3 representa los efectos eritropoyéticos del péptido D, SEC ID NO: 30, y CEPO, conocidos por carecer de actividad eritropoyética, según lo probado en un ensayo UT-7 para la actividad eritropoyética. Los resultados de este ensayo in vitro demuestran que ni el péptido D, SEC ID NO: 30, ni CEPO exhiben actividad eritropoyética en dosis de hasta 10 000 pM.

La FIG. 4 representa los resultados de un ensayo in vivo para determinar si el péptido F (SEC ID N°: 33, correspondiente a los aminoácidos 14-29 de la SEC ID NO: 1) y péptido G (SEC ID NO: 40) son eritropoyético o provocan anticuerpos neutralizantes contra EPO. Los resultados demuestran que ninguna la proteína aumentó los niveles de hemoglobina en las ratas cuando se administró en 0,8 mg/kg, 3 días/semana por vía subcutánea (sc) en el transcurso de 130 Días. Además, ningún péptido provoca una respuesta de anticuerpos, en contraste con la administración de EPO.

La FIG. 5 representa los resultados de estudios in vitro que demuestran que péptido D, SEC ID NO: 30, protege las neuronas motoras contra la muerte inducida por kainato.

La FIG. 6 muestra que el péptido D, SEC ID NO: 30, en dosis de 0,1 ng/ml y 1 ng/ml protege las células P-19 contra apoptosis asociada con la privación de suero.

Las FIGS. 7 A-B representan los resultados de un ensayo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas. La FIG. 7A representa un gráfico que demuestra que el péptido D (SEC ID NO: 30, correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO: 1) en una dosis única de 4,4 ug/kg es capaz de reducir el volumen del infarto en el cerebro tan fuertemente como cuatro dosis de 4,4 ug/kg administradas con 2 horas de diferencia. La FIG. 7B representa los resultados de un ensayo de falla de pata para determinar el déficit de comportamiento causado por la oclusión de la arteria cerebral media. La FIG. 7B muestra que las ratas demostraron mejoras de comportamiento cuando se les administró el péptido D, SEC ID NO: 30, en un programa de dosis simple (1 x 4,4 ug/kg) y un programa de dosis múltiple (4x 4,4 ug/kg).

Las FIGS. 8 A-B representan los resultados de un ensayo in vivo de un ensayo de neuropatía diabética. La diabetes es inducida en ratas mediante estreptozotocina. Después de la verificación de la diabetes inducida, las ratas fueron tratadas con péptido D, SEC ID NO: 30, o PBS cinco veces a la semana en una dosis de 4 ug/kg de peso corporal i.p. por un período de dos semanas. Se observó la velocidad de conducción nerviosa y latencia en placa caliente de las ratas. La FIG. 8A demuestra que las ratas tratadas con péptido D, SEC ID NO: 30 mostraron velocidades de conducción mejoradas en comparación con las ratas no tratadas. La FIG. 8B demuestra que la latencia en placa caliente para las ratas tratadas se redujo en relación a las ratas no tratadas, demostrando además la mejora en la velocidad de conducción.

Las FIGS. 9 A-B representan los resultados de tratamiento de neuropatía y nefropatía inducida por cisplatino con quimera Hélice B EPO. La FIG. 9A demuestra que los animales tratados con péptido G (SEC ID NO: 40, una quimera hélice B) mostraron mejores resultados cuando se probaron en un ensayo de latencia en placa caliente. La FIG. 9B demuestra que la producción de orina, una medida de la función renal, se mantuvo normal en animales tratados con el péptido G (SEC ID NO: 40).

La FIG. 10 representa los efectos del péptido D (SEC ID NO:30) en la fuga retinal asociada a la retinopatía diabética. La figura demuestra que el péptido D (SEC ID NO: 30) fue capaz de reducir sustancialmente las fugas de retina en los animales tratados.

La FIG. 11 representa los resultados del péptido F (SEC ID NO: 33) o péptido G (SEC ID NO: 40) en un modelo de isquemia-reperfusión renal. La figura demuestra que ambos péptidos redujeron la puntuación de lesión resultante de una lesión por isquemia-reperfusión de 60 minutos cuando se evaluó después de 72 horas.

5 La FIG. 12 ilustra que la administración del péptido F (SEC ID NO: 33) protege a los ratones de malaria cerebral experimental.

10 La FIG. 13 Puntuación clínica en el modelo de EAE murino tratado con péptido E, SEC ID NO: 31. La FIG. 13 representa el curso clínico de la función neurológica en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental. Se administraron 4,4 mg/kg de péptido E i.p. diariamente. La administración del péptido E mejoró significativamente la función neurológica en relación con el control. La etapa clínica 1, cola flácida; 2, ataxia y/o paresia de extremidades posteriores, o reflejo de avistamiento lento; 3, parálisis de las extremidades posteriores y/o paresia de las extremidades anteriores; 4, paresia de la extremidad anterior; 5, moribundo o muerte.

## 5. Descripción detallada de la invención

### 5.1 PÉPTIDOS PROTECTORES DE TEJIDO

15 La actividad eritropoyética de la eritropoyetina ("EPO") ha sido bien caracterizada en la técnica (véase, por ejemplo, Cheetham et al, 1998, Nat Struct Biol 5;861-866). EPO inicia la eritropoyesis mediante la unión a la porción extracelular de un homodímero de receptor de eritropoyetina preformado (EPOR) (es decir, (EPOR)<sub>2</sub>) de una manera que tiende un puente entre ubicaciones específicas en las subunidades EPOR individuales. Cuando EPO se une a las grandes porciones (EPOR)<sub>2</sub> del ligando globular están alejadas de las regiones de unión y miran hacia afuera, lejos del complejo de EPO y (EPOR)<sub>2</sub> en medio acuoso. Los solicitantes han determinado que la protección de tejido, a diferencia de la eritropoyesis, está mediada a través de un receptor distinto de (EPOR)<sub>2</sub>, que consiste en un monómero EPOR en conjunción con otro receptor, CD 131 (también conocido como subunidad del receptor común β (βc)). EPOR y βc interactúan para formar el heterodímero receptor, EPOR-βc. Actualmente se desconoce si otras proteínas están involucradas en esta interacción. La presente invención da a conocer péptidos protectores de tejido obtenidos de la estructura tridimensional de EPO, y en particular, de las porciones de EPO que se enfrentan lejos de los sitios de unión EPOR, es decir, que no interactúan con el clásico homodímero EPOR eritropoyético (EPOR)<sub>2</sub>. Sin estar ligados a ninguna teoría en particular, los solicitantes creen que esta porción de la molécula EPO interactúa con el receptor de protección de tejido y con ello media la protección de tejido.

20 La estructura tridimensional de EPO es aceptada según lo descrito por Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5; 861-866, y según lo expuesto en SEC ID NO: 1 (también disponible como datos registrados en el Banco de Datos de Proteínas del Centro Nacional de Información de Biotecnología como registro "1BUY"). Las porciones de la molécula EPO que se enfrentan lejos de la porción proximal a la membrana del homodímero EPOR cuando se unen a dicho receptor (es decir, lejos de la membrana celular cuando el homodímero (EPOR)<sub>2</sub> se expresa en la superficie de una célula) se componen de las siguientes estructuras secundarias: bucle AB (correspondiente a los aminoácidos 29-55 de la SEC ID NO:1), hélice B (correspondiente a los aminoácidos 56-82 de la SEC ID NO:1), bucle BC (correspondiente a los aminoácidos 83-92 de la SEC ID NO:1) y bucle CD (correspondiente a los aminoácidos 112-138 de la SEC ID NO:1). En una realización de la invención, los péptidos protectores de tejido consisten en las secuencias de aminoácidos correspondientes a estas diferentes estructuras de la molécula EPO.

30 Sin estar ligados a ninguna teoría particular, los solicitantes consideran que el receptor protector de tejido se preforma, es decir que EPOR y las subunidades de proteína βc se asocian funcionalmente antes de su interacción con EPO. EPO es un miembro de la superfamilia de citoquinas de tipo 1. Los miembros de la superfamilia de citoquinas de tipo 1 se caracterizan por cuatro hélices que interaccionan hidrofólicamente para formar una proteína globular cuya superficie exterior interactúa con el medio acuoso y se denomina "enfrentada externamente". Inesperadamente, los solicitantes han determinado que más de un péptido obtenido de la porción enfrentada externamente de la molécula de EPO es protector de tejido. Otro sorprendente descubrimiento es que los péptidos obtenidos de porciones de la molécula EPO que están enterrados dentro del complejo EPO: (EPOR)<sub>2</sub> y los péptidos que pueden también contener porciones de sitios de unión de eritropoyesis 1 o 2 son también altamente potentes en la protección de tejido. Para tener en cuenta estos descubrimientos, los solicitantes proponen que la correcta activación del receptor protector de tejido se debe a una configuración de carga espacialmente compacta apropiada dentro del ligando peptídico. Además, esta configuración de carga compacta se realiza mediante dos distintos motivos estructurales: (1) dos aminoácidos con carga negativa adyacentes entre sí, y flanqueados por aminoácidos hidrófobos; o (2) un aminoácido positivo y negativo (es decir, básico y ácido) inmediatamente adyacentes entre sí, y flanqueados por residuos de aminoácidos polares o hidrófobos simples. La proximidad de estas cargas se puede producir a través de la estructura lineal impuesta por la unión de péptidos, es decir, la estructura puede estar formada por aminoácidos consecutivos en una cadena de polipéptidos, o alternativamente, la proximidad puede también ocurrir a través de una relación espacial entre las diferentes partes de la molécula EPO (u otras moléculas de citoquinas de tipo 1 relacionadas) impartida por la estructura terciaria de la proteína, es decir, estructura tridimensional. Sin estar ligado a ninguna teoría específica, los solicitantes consideran que, en general, este requisito dicta que un péptido protector de tejido tendrá una estructura terciaria distinta (por ejemplo, hélices o láminas plisadas) que proporciona la ubicación espacial requerida del par de aminoácidos cargados (es decir, los aminoácidos con carga negativa y/o aminoácido negativo y positivo). Una simple excepción es un péptido lineal

donde el par de aminoácidos está inmediatamente adyacente uno con el otro, con la rigidez requerida impartida por la estructura principal peptídica. Por consiguiente, el motivo estructural (1), está abarcado por una secuencia lineal de residuos de aminoácidos, por ejemplo, H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:6), o por una secuencia lineal de residuos de aminoácidos donde N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> están separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más residuos intervinientes, por ejemplo, H<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>-X-X-X-X-X-N<sub>1</sub>-H<sub>2</sub> (SEC ID NO:11).

Para la protección de tejido, el par de aminoácidos cargados debe estar espacialmente orientado de manera tal que los carbonos de carbonilo estén alejados aproximadamente 3 Angstroms (Å) a aproximadamente 5 Å, preferentemente, aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å, y más preferentemente aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å. Esto se puede lograr en un número de maneras, por ejemplo, por aminoácidos cargados adyacentes en un péptido lineal simple (véase, por ejemplo, Ejemplo 2 y péptido G, SEC ID NO: 40, Tabla 1) o para péptidos que pueden formar aminoácidos cargados de hélice alfa, separados por un residuo de aminoácido que interviene (véase, por ejemplo, Ejemplo 2 y Péptido F, SEC ID NO: 33, Tabla 1). Debe observarse que la estructura terciaria (por ejemplo, una hélice alfa en péptidos anfipáticos) puede también ser impartida cuando el péptido está dentro de un microambiente específico, tal como en la interfaz de membrana de la superficie de célula extracelular (véase, Segrest, 1,990, Proteins 8:103-117).

Además, la actividad protectora de tejido está prevista para péptidos que contienen pares de aminoácidos cargados de manera tal que las cadenas laterales cargadas (ya sean positiva y negativa o dos negativas) estén restringidas espacialmente a dentro de aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å entre sí. Esto puede ser proporcionado en una hélice alfa por el par cargado que está separado por uno o dos aminoácidos, que proporcionará que las cargas estén más o menos en el mismo lado de la hélice con la separación requerida de aproximadamente 6,5 Å a aproximadamente 9 Å. Un ejemplo no limitante de un péptido tal se encuentra en el péptido F (véase, Ejemplo 2, SEC ID NO: 33, Tabla 1). Un experto en la técnica puede idear una estructura terciaria para el péptido que por lo general se requiere que obtenga la ubicación tridimensional apropiada de los aminoácidos cargados, así como el diseño de moléculas pequeñas para imitar la separación de carga dentro del péptido.

Las distancias espaciales entre los carbonos de carbamilo de cualquier de dos aminoácidos o entre las cadenas laterales de cualquiera de dos aminoácidos pueden ser deducidas por cualquier procedimiento conocido en la técnica o que se describe 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 de carbamilo dentro de una porción de interés de dicha proteína puede estimarse a partir de la coordenadas tridimensionales publicadas o de lo contrario aceptadas en la técnica, de los residuos de aminoácidos en dicha porción de interés. Cuando se desconoce la estructura tridimensional de la proteína y, por lo tanto, la porción de interés o cuando un péptido totalmente sintético se construye sobre la base de las enseñanzas del presente documento, cuya estructura tridimensional es desconocida, la separación de carga de dos cadenas laterales o la distancia espacial entre dos carbonos de carbamilo dentro de dicho péptido puede estimarse utilizando la estructura tridimensional predicha por el software de modelado de proteína como es conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes de este tipo de software son MOE™ del Chemical Computing Group (Quebec, Canadá) y Modeler por Accelrys (San Diego, California). Del mismo modo dicho software predictivo, disponible en las empresas indicadas anteriormente, así, es también conocido en la técnica para el diseño de moléculas pequeñas tal como y, por consiguiente, un experto en la técnica, en base a las enseñanzas de este documento, sería capaz de hacer pequeñas moléculas que emulan los motivos estructurales revelados.

Los péptidos quiméricos o de origen natural pueden diseñarse de manera que imiten las proximidades espaciales críticas descritas anteriormente en este documento a través de una secuencia lineal de aminoácidos. La presente invención, por ello, está dirigida a nuevos péptidos protectores de tejido, incluyendo aquellos que exhiben estos motivos estructurales que impulsan la protección de tejido.

Los fragmentos de protección de tejido pueden también obtenerse de otras citoquinas de tipo 1, incluyendo, pero sin limitarse a, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-3 (IL-3), Trombopoyetina (TPO), Factor neurotrófico ciliar (CNTF) y Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), que son estructuralmente homólogas con las secuencias de aminoácidos de EPO de presentación externa indicadas más arriba y/o contienen los motivos estructurales que se describen más arriba.

Además, los péptidos protectores de tejido pueden ser compuestos quiméricos basados en motivos estructurales que se describen más arriba combinando elementos estructurales no adyacentes y aminoácidos de presentación en superficie exclusivamente. En particular, los solicitantes han determinado que la adición de una hélice de péptido anfipático con las secuencias indicadas anteriormente aumenta la potencia del péptido.

Además, los péptidos protectores de tejido de la presente invención incluyen péptidos de fusión que resultan de la combinación de dos o más de los péptidos indicados anteriormente, o con una macromolécula relacionada o no relacionada de transporte específico, tal como EPO, insulina o leptina nativa.

#### 5.1.1 Fragmentos

##### A. Fragmentos de péptidos obtenidos de EPO

La presente invención se refiere a nuevos péptidos protectores de tejido que en una realización están comprendidos por fragmentos de las secuencias de aminoácidos de EPO, obtenidos de la estructura tridimensional de la proteína EPO, y en particular, fueron obtenidos de aquellas regiones de EPO que se enfrentan lejos de los sitios de unión al ligando y/o la porción interna del homodímero EPOR. Estos fragmentos se obtienen de las siguientes estructuras EPO: (1) bucle AB y porción terminal N de hélice B (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEC ID NO:29, correspondiente a los aminoácidos 38-57 de la SEC ID NO:1); (2) porción terminal C de hélice B (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEC ID NO:30, correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO:1), y (3) una porción del bucle A-B que consiste en un pequeño bucle de cisteína y una lámina plisada  $\beta$  (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEC ID NO:31, correspondiente a los aminoácidos 28-47 de la SEC ID NO:1). Estos fragmentos de péptido mostraron todos en el Ejemplo 2 (véase la FIG. 1 y Tabla 1) que exhibían las propiedades protectoras de tejido.

Inesperadamente, algunos péptidos obtenidos de otras regiones de la molécula EPO que están enterrados y otros péptidos que incluyen porciones de los sitios de unión a (EPOR)<sub>2</sub> también son protectores de tejido. Por ejemplo, un péptido que consiste en la porción N-terminal de la hélice A (APRLICDSRVLERYLLEAKEAE, SEC ID NO: 32, correspondiente a los aminoácidos 1 a 23 de la SEC ID NO: 1) que contiene una porción de sitio de unión a EPOR<sub>2</sub> (subrayada) es protector de tejido (véase el Ejemplo 2 y Tabla 1). Sin embargo, la presencia de aminoácidos de sitio 2 no tiene en cuenta la actividad protectora de tejido, como un péptido que consiste en aminoácidos 14-29 de la SEC ID de NO: 1 (RYLLEAKEAENITTGC, SEC ID NO: 33) y que carece de aminoácidos 11 a 13 de la SEC ID NO: 1 (es decir, VLE; aminoácidos de sitio 2 que se requieren para la unión de EPO al dímero EPOR, (EPOR)<sub>2</sub>, también es protector de tejido (véase, Ejemplo 2 y la Tabla 1, también Elliott et al, 1997, Blood 89: 493) Los solicitantes han demostrado previamente que las mutaciones dentro de los sitios de unión de eritropoyesis que suprimen la eritropoyesis no modifican las propiedades protectoras de tejido de EPO (Leist et al Science (2004). 305: 239).

Un experto en la técnica reconocerá que los fragmentos de diferentes longitudes pueden formar un péptido protector de tejido, aunque el fragmento tiene una longitud de preferentemente menos de 30 aminoácidos. Además, la selección juiciosa de otras moléculas para la inclusión, por ejemplo, D-aminoácidos o polietilenglicol, también constituirá un péptido protector de tejido, pero con vidas medias biológicas mejoradas.

#### A. Motivos estructurales

En concreto, se han identificado los siguientes: motivos estructurales que desencadenan el complejo receptor de protección de tejido:

(a) Una configuración de carga negativa ("motivo estructural A").

En este motivo estructural, el péptido posee dos aminoácidos con carga negativa, que se pueden separar en hasta 5 aminoácidos, flanqueados por aminoácidos hidrófobos. Estructuralmente esto se puede representar como:

(a1) HNNH;

(a2) HNXNH;

(a3) HNXXNH;

(a4) HNXXXNH;

(a5) HNXXXXNH; o

(a6) HNXXXXXNH

donde H representa aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, los aminoácidos moderadamente hidrófobos: glicina, prolina, cisteína, tirosina, y triptófano, y preferentemente los aminoácidos altamente hidrófobos: alanina, valina, isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina), N representa un aminoácido con carga negativa tal como glutamato o aspartato, y X representa cualquier aminoácido, aunque preferentemente uno hidrófilo. En ciertas realizaciones, los aminoácidos hidrofóbicos de flaqueo son los mismos. En otras realizaciones, los aminoácidos de flaqueo son diferentes.

Una variación de este motivo estructural implica un péptido donde uno de los aminoácidos hidrófobos de flaqueo ha sido reemplazado por un aminoácido polar tal como una serina, treonina, asparagina o, glutamina.

Como una alternativa a las uniones peptídicas constitutivas de la proximidad mutua de las dos cargas negativas en una secuencia lineal, la proximidad de carga necesaria también puede llevarse a cabo mediante una estructura tridimensional como se ha debatido anteriormente en este documento, (sección 5.1). Por Ejemplo, los aminoácidos con carga negativa pueden estar espacialmente inmediatamente adyacentes en la superficie externa de una hélice, pero estarán separados por aminoácidos adicionales en la secuencia de péptidos lineal. Por ejemplo, en hélice A de EPO (correspondiente a los aminoácidos 10-28 de la SEC ID NO: 1), E18 y E21 son adyacentes en la estructura tridimensional, pero tienen dos aminoácidos intervinientes entre ellos en la secuencia de péptidos lineal. Como un

ejemplo adicional, en la hélice B (péptido D, SEC ID NO:30; correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO:1) E62 y E72 están separados por dos aminoácidos (Q65 y L69) sobre la superficie de la hélice, pero tienen 9 aminoácidos entre ellos dentro del péptido lineal. Los péptidos construidos a partir de la hélice A o hélice B son protectores de tejido (Véase el Ejemplo 2 y la Tabla 1, más adelante). En contraste, el péptido B (NITGCAEHCSLNE, SEC ID NO: 34) de un péptido con las cargas negativas duales (subrayadas) a la distancia apropiada, pero que carece de un aminoácido hidrofóbico de flaqueo, no es protector de tejido (Véase el Ejemplo 2 y la Tabla 1, más abajo).

(b) Configuración de aminoácido negativo/positivo ("Motivo estructural B").

En este motivo estructural, el péptido tiene un aminoácido positivo al lado de un aminoácido negativo y ambos aminoácidos con carga están flanqueados por aminoácidos hidrofóbicos individuales. Estructuralmente esto se puede representar como:

(b1) HNPH; o

(b2) HPNH,

donde P representa aminoácidos con carga positiva tal como arginina, lisina o histidina y N representa los aminoácidos con carga negativa glutamato o aspartato. Al igual que con el primer motivo, la proximidad mutua de las dos cargas opuestas se puede realizar mediante la estructura tridimensional. Por ejemplo, un aminoácido con carga positiva y negativa puede estar espacialmente adyacente en la superficie de una hélice, pero estarán separados por uno o más aminoácidos en la secuencia de péptidos lineal. Por ejemplo, en hélice B (correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO: 1) E72 y R76 son inmediatamente adyacentes entre sí en la superficie externa de la hélice y un péptido construido a partir de esta hélice es protector de tejido (véase el Ejemplo 2 y Tabla 1)

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

(b3) HNLPH;

(b4) HPLNH,

donde L representa un aminoácido polar tal como serina, treonina, asparagina, o glutamina. Un ejemplo de este motivo es el péptido E (GCAEHCSLNNITVPTDKVN, SEC ID NO: 34), que es protector de tejido (véase el Ejemplo 2 y la Tabla 1).

Dado que el núcleo del motivo estructural anterior tiene una longitud de cuatro aminoácidos, un péptido de este motivo estructural central puede activar el receptor protector de tejido. En ciertas realizaciones los polipéptidos de la invención comprenden 1 motivo estructural. En realizaciones alternativas, los polipéptidos de la invención comprenden más de 1, más de 2, más de 3 o más de 4 de los motivos estructurales. En ciertas realizaciones, donde el polipéptido comprende al menos dos motivos estructurales, los motivos son iguales. En realizaciones alternativas, donde el polipéptido comprende al menos dos motivos estructurales, los motivos son diferentes. Preferentemente, los múltiples péptidos de la presente invención que un experto en la técnica puede generar tienen menos de 30 aminoácidos de longitud.

Un experto en la técnica reconocerá que los motivos estructurales indicados más arriba, en oposición a la secuencia de aminoácidos real de EPO, son importantes para la presente invención. De ese modo un experto en la técnica reconocería que el péptido aislado puede tener menos de 90 %, menos de 85%, menos de 80%, menos de 75%, menos de 70%, menos de 65%, menos de 60%, menos de 55%, menos de 50%, menos de 45%, menos de 40%, menos de 35%, menos de 30%, o menos de 20 por ciento de identidad de secuencia con cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de eritropoyetina humana madura ("EPO") que se expone en la SEC ID NO:1, donde dicha porción de EPO contiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho péptido.

Adicionalmente, la patente estadounidense No. 5.700.909 para O'Brien et al. da a conocer una secuencia peptídica de 17 aminoácidos de EPO (SEC ID NO: 11 de O'Brien), que induce la actividad biológica en células NS20Y, SK-N-MC, y PC 12 incluyendo la brotación, diferenciación, neuroprotección, y prevención de la muerte celular neuronal. La SEC ID NO: 11 de O'Brien (epopéptido diseñado AB), aunque se describió proféticamente que tenía actividad eritropoyética, de hecho carece de tal actividad eritropoyética y posteriormente se encontró que carece de actividad in vivo. Cuando el epopéptido AB se inyectó en el músculo de ratones, la frecuencia de la placa final motora que brotaba en los músculos adyacentes aumentó de manera similar a la inducida por el factor neurotrófico ciliar. Estos datos se interpretan dentro del concepto de que las células neuronales (pero no hematológicas) responden a una secuencia peptídica dentro de EPO y que EPO puede tener dominios separados para la actividad neurotrófica y hematotrofica (Campana et al., Int. J. Mol. Med. (1998) 1(1): 235-241; JS O'Brien en Patente Estadounidense No. 5.700.909, expedida el 23 de diciembre de 1997; JS O'Brien en Patente Estadounidense No. 5.571.787, expedida el 05 de noviembre de 1996; JS O'Brien en Patente Estadounidense No. 5.714.459, expedida el 03 de febrero de 1998; y JS O'Brien y Y. Kashimoto en Patente Estadounidense No. 5.696.080, expedida el 9 de diciembre de 1997).

Sin embargo, O'Brien no apreció los actuales motivos estructurales basados en la proximidad de los aminoácidos con carga en la estructura terciaria del péptido.

### C. Fragmentos de citoquina de tipo 1.

5 Dada la configuración de carga espacialmente compacta capaz de activar el receptor protector de tejido, los solicitantes han descubierto que se espera que ciertos fragmentos de citoquinas de tipo 1 reaccionen en forma cruzada con el receptor de protección de tejido. Esta familia de citoquinas incluye, pero sin limitarse a, interleuquina (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófago (GM-CSF), leptina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), trombopoyetina (TPO), hormona del crecimiento, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina (EPO) y prolactina.

10 La consideración de la estructura secundaria de EPO proporciona la guía para la preparación de un péptido candidato protector de tejido a través de la disposición espacial de aminoácidos obtenidos de aminoácidos homólogos ubicados dentro de estructuras secundarias homólogas dentro de otros ligandos receptores de citoquinas de tipo 1: por ejemplo, GM-CSF y IL-3 (Kannan, 2000, Neuroimmunomod. 8: 132-141), entre otros, han demostrado poseer actividades neurotróficas y neuroprotectoras potentes, debido en gran parte, que los solicitantes creen, mediante la estimulación de un receptor de protección de tejido. Por ejemplo, considerando la hélice B de estas citoquinas de tipo 1; aminoácidos homólogos en trombopoyetina (TPO; Acceso al Banco de datos de proteínas (PDB) 1V7M) comprenden D62, G65, T68, L69, E72, A76 y Q80, donde estos aminoácidos están espacialmente adyacentes entre sí en una disposición lineal; aminoácidos homólogos en el factor inhibidor de leucemia (LIF; Acceso a PDB 1EMR) comprenden E61, R64, Y68, S72, N75, y D79; aminoácidos homólogos en el factor neurotrófico ciliar (CNTF; Acceso a PDB 1CNT) comprenden E71, E75. Todos ellos son ejemplos del motivo A que se describe más arriba (sección 5.1.1), donde los aminoácidos subrayados están cargados negativamente.

15 Los ejemplos de péptidos obtenidos de las citoquinas de tipo 1 que ejemplifican el motivo estructural B descrito anteriormente en este documento (sección 5.1.1) incluyen, pero no se limitan a, fragmento de hélice A GM-CSF, WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO:35); fragmento de hélice A TPO, LSKLLRDSHVLH (SEC ID NO:36); fragmento de hélice B TPO: E56, K59; fragmento de hélice A, KIRSDLTALTASYVKH (SEC ID NO:37); fragmento de hélice B CNTF: R89, E92. fragmento de hélice B LIF, GTEKAKLVELYRIVVYL (SEC ID NO:38); y fragmento de hélice A interleuquina 3 (IL-3) SIMIDEIHHHLKRPPNPL (SEC ID NO:39).

20 Estos aminoácidos antes mencionados son meramente ejemplares de algunos miembros de la superfamilia de citoquinas que señalizan a través de receptores de citoquinas de tipo 1, y las regiones homólogas en otros miembros de la superfamilia de citoquinas serán identificadas fácilmente por el experto en la materia.

#### 5.1.2 Quimeras

25 Los péptidos protectores de tejido "quiméricos" - secuencias de aminoácidos lineales que incorporan elementos estructurales no lineales de los aminoácidos externamente enfrentados de la molécula EPO exhiben los motivos estructurales indicados anteriormente de - están también contemplados por la presente invención. Los péptidos quiméricos protectores de tejido de la presente invención pueden consistir en la combinación de elementos estructurales de secuencias de aminoácidos separados en un solo péptido. En otras palabras, un péptido protector de tejido quimérico puede estar comprendido por secuencias de aminoácidos obtenidas de elementos estructurales no lineales pero adyacentes tal como un fragmento obtenido de secuencias de aminoácidos 110-115, 133-136, y 160-165, de la SEC ID NO:1 lo que permitiría que los elementos estructurales de la porción terminal C de la hélice C y la porción terminal N de bucle C-D, la lámina plisada  $\beta$  en bucle C-D, y la porción terminal C de EPO estén contenidos en un solo péptido. Además, pueden utilizarse péptidos quiméricos protectores de tejido para seleccionar las características importantes de una estructura particular, por ejemplo los aminoácidos externamente enfrentados de una estructura terciaria particular. De ese modo, un péptido protector de tejido quimérico puede consistir en un fragmento comprendido por aminoácidos de hélice B 58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84, y 85 (por ejemplo, péptido G, QEQLERALNSS, SEC ID NO:40) o, en otras palabras, la totalidad de los aminoácidos de presentación exterior de la hélice B de EPO. Este péptido demuestra ser protector de tejido en el Ejemplo 2, más abajo (véase la Tabla 1).

30 Además, la potencia de los actuales péptidos protectores de tejido puede aumentarse uniendo una hélice anfipática peptídica. Las hélices anfipáticas peptídicas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo de péptidos que señalizan a través de los receptores de Clase B acoplados a proteína G (por ejemplo, Segrest et al, 1990, Proteins 8:103), que sirve para localizar el ligando peptídico a la membrana celular. Los ejemplos de dichas hélices incluyen, pero no se limitan a, las regiones altamente hidrofóbicas de: calcitonina (ALSILVLLQAGS, SEC ID NO:48); hormona liberadora de corticotropina (VALLPCPPCRA, SEC ID NO:49); beta endorquina (NAIKNAYKKG, SEC ID NO:50) glucagon (GSWQRSLQDTE, SEC ID NO:51); secretina (GSAARPAPP, SEC ID NO:52); polipéptido vasointestinal (NALAENDTPYY, SEC ID NO:53); neuropéptido Y (GALAEAYPSKP, SEC ID NO: 54); hormona liberadora de gonadotropina (GCSSQHSYGL, SEC ID NO:55); hormona paratiroidea (VMIVMLAICFL, SEC ID NO: 56); polipéptido de páncreas (LRRYINMLTRP, SEC ID NO: 28); péptido relacionado con el gen de la calcitonina (LALSILVLYQA, SEC ID NO: 57) (divulgado en Grace et al, 2004, PNAS 101:12836). Por ejemplo, un péptido quimérico hecho de un péptido con motivo de carga superficial de hélice B de EPO (QEQLERALNSS, SEC ID NO:

40) unido en el extremo carboxi de la hélice anfipática de polipéptido de páncreas (LRRYINMLTRP, SEC ID NO: 28) para un péptido quimérico. Otras modificaciones se pueden hacer al extremo carboxi de la hélice anfipática sin afectar a sus propiedades protectoras de tejido. De ese modo, un ejemplo adicional, la sustitución de la prolina terminal del péptido quimérico anterior con la secuencia TR (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEC ID NO: 41) genera una molécula con potente actividad protectora de tejido como se demostró en el ensayo del nervio ciático (véase, la FIG. 1).

Además, en lugar de las hélices mencionadas anteriormente, otras estructuras terciarias pueden estar unidas a los péptidos protectores de tejido. Por ejemplo, los aminoácidos de presentación exterior de hélice B pueden estar vinculados a la lámina plisada beta (CSLNENI, SEC ID NO: 42) encontrada dentro del bucle AB de EPO para formar un péptido quimérico que tiene la secuencia CSLNENIQEQLERALNSS (SEC ID NO: 43), que es protectora de tejido (véase el Ejemplo 2 y la Tabla 1). Además, los aminoácidos presentadores de la porción terminal de hélice C (ALGKA, SEC ID NO: 44, correspondiente a los aminoácidos 111, 112, 113, 116, y 118 de la SEC ID NO: 1) se pueden combinar con la totalidad o parte del bucle parcial CD (LGAQKEAISPPDAASAAPLRTI, SEC ID NO: 45, correspondiente a los aminoácidos 112 a 133 de la SEC ID NO: 1). Preferentemente, un brazo de unión estará presente entre los péptidos fusionados para proporcionar flexibilidad para que los péptidos unidos puedan asumir la orientación estructural adecuada para unirse con el complejo receptor de protección de tejido. Dichos péptidos de fusión pueden tener un efecto sinérgico, obteniendo un mayor efecto protector tejido en conjunto en lugar de individualmente, posiblemente mediante una unión con el complejo receptor protector de tejido mejorado o un aumento de la vida media biológica.

Un experto en la técnica reconocerá el beneficio de combinar diversos elementos estructurales deseados en un único péptido para maximizar los efectos protectores de tejido de tales compuestos. Tales quimeras pueden comprender péptidos de aminoácidos, y elementos distintos de aminoácidos, tal como conectores o átomos o radicales puente.

#### 5.1.3 Péptidos de fusión

La presente invención además contempla que dos o más de los péptidos protectores de tejido indicados más arriba, fragmento derivado o quimera, pueden unirse a una proteína relacionada o no relacionada tal como eritropoyetina, albúmina, etc.

#### 5.1.4 Fabricación de Péptidos protectores de tejido

Los péptidos protectores de tejido de la presente invención pueden fabricarse usando técnicas sintéticas o recombinantes bien conocidas en la técnica. En particular, la síntesis de proteínas en fase sólida se adapta bien a la relativamente corta longitud de los péptidos protectores de tejido y puede proporcionar mayores rendimientos con resultados más consistentes. Además, la síntesis de proteínas en fase sólida puede proporcionar flexibilidad adicional con respecto a la fabricación de los péptidos protectores de tejido. Por ejemplo, modificaciones químicas deseadas que se pueden incorporar en el péptido protector de tejido en la etapa de síntesis: podría utilizarse homocitrulina en la síntesis del péptido en lugar de lisina, obviando así la necesidad de carbamilar el péptido después de la síntesis.

#### Síntesis

En la síntesis en fase sólida de un péptido, un aminoácido con protección del grupo alfa amino y cadena lateral es inmovilizado sobre una resina. Véase por ejemplo Nilsson, B., Soellner, M., y Raines, R. *Chemical Synthesis of Proteins*, Annu. Rev. Biomol. Struct. 2005. 34:91-118; Meldal M. 1997. Properties of solid supports. *Procedimientos Enzymol.* 289:83-104 y Songster MF, Barany G. 1997. Handles for solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289:126-74. Típicamente, se utilizan dos tipos de grupos protectores de alfa amino: un grupo de terc-butoxicarbonilo (Boc) sensible al ácido o un grupo de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) grupo sensible a las bases. Wellings DA, Atherton E. 1997. Standard Fmoc protocols. *Procedimientos Enzymol.* 289:44-67. Después de la eliminación completa y rápida de estos grupos alfa-amino-protectores otro aminoácido protegido con un grupo carboxilo activado a continuación se puede acoplar a la amina unida a resina sin protección. Mediante el uso de un exceso de aminoácido soluble activado, las reacciones de acoplamiento se ven obligadas a su finalización. El ciclo de acoplamiento y desprotección se repite para completar la secuencia. Con la desprotección y escisión de la cadena lateral, la resina produce el péptido deseado. Guy CA, Fields GB. 1997. Trifluoroacetic acid cleavage y deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. *Methods Enzymol.* 289:67-83, y Stewart JM. 1997. Cleavage procedimientos following Boc-based solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.* 289:29-44. Procedimientos adicionales para realizar la síntesis de proteína en fase sólida se divulgan en Bang, D. & Kent, S. 2004. A One-Pot Total Synthesis of Crambin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:2534-2538; Bang, D., Chopra, N., & Kent, S. 2004. Total Chemical Synthesis of Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 126:1377-1383; Dawson, P. et al. 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science.* 266:776-779; Kochendoerfer et al. 2003. Design y Chemical Synthesis of a Homogenous Polymer-Modified Erythropoiesis Protein. *Science.* 299:884-887.

Si es necesario, los péptidos más pequeños obtenidos de la síntesis de péptido en fase sólida pueden combinarse a través ligaduras peptídicas tal como ligadura química nativa. En este proceso, el tiolato de un residuo de cisteína N-

terminal de un péptido ataca el tioéster C-terminal de un segundo péptido para afectar la transtioesterificación. Se forma un enlace de amida después de la transferencia de acilo rápida  $S \rightarrow N$ . Véase Dawson, P. et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. Science. 266:776-779.

5 Además, un experto en la técnica reconocería que los péptidos protectores de tejido de la presente invención pueden abarcar péptidos peptidomiméticos, incluyendo aminoácidos de origen natural y de origen no natural tal como peptoides. Los peptoides son oligómeros de glicinas N sustituidas, ácido glicohpolico, tiopronina, sarcosina, y tiorfano. Estas estructuras tienden a tener una estructura general de  $-(C=O)-CH_2NR-$  con el grupo R actuando como cadena lateral. Tales peptoides pueden sintetizarse usando la síntesis en fase sólida en conformidad con los protocolos de Simon et al, *Peptoids*. Un enfoque molecular para el descubrimiento de fármacos, Proc. Natl. Acad Sci EE.UU., 89: 9367-9371 (1992) y Li et al, *Photolithographic Synthesis of Peptoids*, J. Am. CHEM. SOC. 2004, 126, 4088-4089. Además, la presente invención contempla el uso de miméticos peptídicos o peptidomiméticos, fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla. (Fauchere, J. (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber y Friedinger (1985) *TINS* p. 32; y Evans et al. (1987) *J. Med. Chem* 30:1229). La síntesis de los distintos tipos de peptidomiméticos ha sido revisada por ejemplo en: *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl)*, *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics - Workbench Edition Volumen E22c* (Editor-in-Chief Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York).

#### Técnicas recombinantes

Una variedad de sistemas de expresión huésped-vector pueden utilizarse para producir los péptidos protectores de tejido de la invención. Tales sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los que el péptido protector de tejido de interés se puede producir y posteriormente se puede purificar, pero también representan las células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, exhibir el producto génico de eritropoyetina modificada in situ. Estos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, insectos, plantas, mamíferos, incluidos los sistemas de huésped humanos, tal como, pero sin limitarse a, sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo baculovirus), que contiene el las secuencias que codifican el péptido protector de tejido; sistemas de células vegetales infectadas con los vectores de expresión del virus recombinante (por ejemplo, virus mosaico del coliflor, CaMV; virus mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con los vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene secuencias codificantes de la molécula relacionada con la eritropoyetina; o sistemas de células de mamíferos, incluyendo los sistemas de células humanas, por ejemplo, HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores obtenidos del genoma de células de mamíferos, por ejemplo, promotor de metalotioneína, o de virus de mamíferos, por ejemplo promotor tardío de adenovirus; promotor 7.5K del virus vaccinia.

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Tales modificaciones y procesamiento de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Como es conocido por los expertos en la técnica, diferentes células huésped tienen mecanismos específicos para el procesamiento post-traduccional y modificación de las proteínas y productos génicos. Las líneas celulares apropiadas o sistemas huésped se pueden elegir para garantizar el procesamiento y modificación correcta de la proteína foránea expresada. Con este fin, pueden utilizarse las células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamífero, incluyendo células huésped humanas, incluyen pero no se limitan a HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, y WI38.

Para la producción de alto rendimiento, largo plazo, de péptidos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el producto génico de molécula relacionada con citoquinas protectora de tejido recombinante pueden ser diseñadas. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped 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 seleccionable. Tras la introducción del ADN foráneo, las células manipuladas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este procedimiento se puede usar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan el producto protector de tejido. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que afectan la actividad endógena del producto génico de la molécula relacionada con EPO.

#### Otras modificaciones

Modificaciones adicionales se pueden hacer a los péptidos protectores de tejido. Por ejemplo, el péptido puede sintetizarse con uno o más (D)-aminoácidos. La elección de incluir un (L)- o (D)-aminoácido en un péptido de la presente invención depende, en parte, de las características deseadas del péptido. Por ejemplo, la incorporación de uno o más (D)-aminoácidos puede conferir aumento de la estabilidad en el péptido in vitro o in vivo. La incorporación

de uno o más (D)-aminoácidos puede también aumentar o disminuir la actividad de unión del péptido según se determine, por ejemplo, utilizando los bioensayos que se describen en el presente documento, u otros procedimientos bien conocidos en la técnica.

5 La sustitución de toda o parte de una secuencia de (L)-aminoácidos por la secuencia correspondiente de (D)-aminoácidos entatioméricos hace una estructura ópticamente isomérica en la parte respectiva de la cadena de polipéptidos. La inversión de la secuencia de toda o parte de la una secuencia de (L)-aminoácidos hace retro-análogos del péptido. La combinación del reemplazo de enantiómeros (L a D, o D a L) y la inversión de la secuencia hace retro-inversos análogos del péptido. Es conocido por los expertos en la técnica que los péptidos enantioméricos, sus retro-análogos, y sus retro-inversos análogos mantienen relación topológica significativa con el péptido parenteral, y a menudo se obtiene grado de semejanza especialmente alto para el progenitor y sus retro-inversos análogos. Esta relación y semejanza puede reflejarse en las propiedades bioquímicas de los péptidos, especialmente los altos grados de unión de los respectivos péptidos y análogos a una proteína receptora. La síntesis de las propiedades de análogos retro-inverso de péptidos se han discutido por ejemplo en *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics - Workbench Edition Volumen E22c* (Editor-in-chief Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York), y en las referencias citadas en el mismo.

15 "Modificación" de aminoácidos se refiere a la alteración de un aminoácido de origen natural para producir un aminoácido no natural. Los derivados de los péptidos de la presente invención con aminoácidos de origen natural pueden ser creados por síntesis química o por incorporación específica del sitio de aminoácidos no naturales en polipéptidos 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.

20 Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), pero tienen uno o enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos 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-, por procedimientos conocidos en la técnica y además se describen en las siguientes referencias: Spatola, A.F. in "Chemistry y Biochemistry of Amino acids, Peptides, y Protein," B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, página 267 (1983); Spatola, A.F., *Vega Data* (Marzo de 1983), Volumen. 1. Emisión 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>-); Holladía, 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--).

35 En otra realización, un enlace no péptido particularmente preferido es -CH<sub>2</sub>NH-. Tales miméticos de péptido pueden tener ventajas significativas sobre realizaciones de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros.

40 Una variedad de diseños para miméticos peptídicos son posibles. Por ejemplo, los péptidos cíclicos, en los que la conformación necesaria es estabilizada por no péptidos, se contemplan específicamente, la Patente Estadounidense No. 5.192.746 para Lobl, et al. , Patente Estadounidense No. 5.576.423 para Aversa, et al., Patente Estadounidense No. 5.051.448 para Shashoua, y la Patente Estadounidense No. 5.559.103 para Gaeta, et al., describen múltiples procedimientos para la creación de este tipo de compuestos. La síntesis de compuestos no péptidos que imitan las secuencias de péptidos también es conocida en la técnica. Eldred et al., *J. Med. Chem.* 37: 3882 (1994) describe antagonistas no peptídicos que imitan la secuencia de péptidos. Del mismo modo, Ku et al., *J. Med. Chem* 38: 9 (1995) además aclara la síntesis de una serie de tales compuestos.

45 Se pueden implementar otras modificaciones después de la síntesis. Por ejemplo, los péptidos protectores de tejido pueden ser además modificados químicamente, es decir carbamilados, acetilados, succinilados, etc., en conformidad con Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/188.905, que se publica como 20030072737-A1, el 17 de abril de 2003 y da a conocer EPO modificada químicamente, y en conformidad con la Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/612.665, presentada el 1 de julio de 2003, y Solicitud de Patente Estadounidense No. 09/753.132, presentada el 29 de diciembre de 2000.

55 Además, los péptidos protectores de tejido pueden consistir en péptidos protectores de tejido recombinantes -mutedinas. Las mutaciones descritas pueden incluir sustituciones, eliminaciones, incluyendo delecciones internas, adiciones, incluyendo aumentos de rendimiento proteínas de fusión, o sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos dentro de y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que se traducen en un cambio "silencioso", cambios de aminoácidos no conservadoras e inserciones y delecciones grandes, como se describe

anteriormente 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.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras se pueden hacer en uno o más residuos de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras y no conservadoras se pueden realizar. Las sustituciones conservadoras son las que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados se pueden dividir en cuatro familias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares (hidrófobos) = cisteína, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, glicina, tirosina; y (4) polares sin carga = asparagina, glutamina, serina, treonina. Los no polares pueden subdividirse en: fuertemente hidrófobos = alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina y moderadamente hidrófobos = glicina, prolina, cisteína, tirosina, triptófano. De manera alternativa, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina; arginina; histidina; (3) alifáticos = glicina, alanina, valina, leucina; isoleucina, serina, treonina, serina y treonina, opcionalmente pueden agruparse por separado como alifáticos-hidroxiolos; (4) aromáticos = fenilalanina, tirosina, triptófano; (5) amida = asparagina, glutamina; y (6) con azufre = cisteína y metionina. (Véase, por ejemplo, Biochemistry, 4th ed., Ed. by L. Stryer, WH Freeman y Co., 1995.

Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de la secuencia codificante del péptido protector de tejido, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse en cuanto a la actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, el péptido codificado se puede expresar de manera recombinante y la actividad del péptido protector de tejido recombinante se puede determinar.

En otra realización, el péptido protector de tejido demás puede modificarse a través de las adiciones de polímeros (tal como polietilenglicol), azúcares, o proteínas adicionales (tal como una construcción de fusión) en un esfuerzo por extender la vida media del péptido protector de tejido o mejorar los efectos protectores de tejido del péptido. Los ejemplos de tales modificaciones se describen dentro de WO/04022577 A3 y WO/05025606 A1.

## 25 5.2 ENSAYOS PARA ENSAYAR PÉPTIDOS PROTECTORES DE TEJIDO

### 5.2.1 Exploraciones o ensayos biológicos

Los péptidos protectores de tejido en conformidad con la presente invención pueden ensayarse en cuanto a la actividad protectora de tejido, por ejemplo, protección de células, tejidos u órganos. Las actividades de protección además pueden probarse utilizando ensayos in vitro e in vivo. Las pruebas in vitro que son indicativas de actividad protectora de tejido incluyen, por ejemplo, ensayos de proliferación celular, ensayos de diferenciación celular, o detección de la presencia de proteínas o ácidos nucleicos regulados por incremento por el Complejo receptor protector de tejido, por ejemplo complejo receptor de citoquinas protectoras de tejido, actividad, por ejemplo, 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 de almacenamiento de oxígeno pueden utilizarse como un ensayo para identificar o explorar los compuestos que modulan la actividad protectora de tejido.

La neuroglobina está expresada en células y tejidos del sistema nervioso central en respuesta a la hipoxia o isquemia y puede proporcionar protección de la lesión (Sun et al 2001, PNAS 98: 15306-15311; Schmid et al, 2003, J. Biol Chem. 276: 1.932-1.935). La citoglobina puede jugar un papel similar en protección, pero se expresa en una variedad de tejidos en diferentes niveles (Pesce et al, 2002, EMBO 3: 1146-1151). En una realización de la invención, los niveles de una proteína regulada por incremento en una célula pueden ser medidos antes y después de contactar el péptido protector de tejido a una célula. En ciertas realizaciones, la presencia de una proteína asociada con actividad regulada pro incremento protectora de tejido en una célula, puede utilizarse para confirmar las actividades de protección tejido de un péptido.

La nucleolina puede proteger las células de los daños. La misma desempeña numerosos papeles en células incluyendo la modulación de los procesos de transcripción, proteína de unión al ARN específico de secuencia, citocinesis, nucleogenesis, transducción de señales, apoptosis inducida por Células T, remodelación de la cromatina, o replicación. También puede funcionar como una helicasa de ADN/ARN receptor de la superficie celular, ATPasa dependiente de ADN, transporte de proteínas, componente de factor de transcripción, o represor transcripcional (Srivastava y Pollard, 1999, FASEB J., 13: 1911/22; y Ginisty et al., 1999, J. Cell Sci., 112: 761 a 772).

Frataxina es una proteína implicada en el metabolismo del hierro mitocondrial y ha previamente demostrado ser fuertemente reguladas en incremento por EPO tanto in vivo como in vitro (Sturm et al (2005) Eur J Clin Invest. 35: 711)

La expresión de una proteína regulada por incremento puede detectarse mediante la detección de los niveles de ARNm correspondiente a la proteína en una célula. El ARNm se puede hibridar en una sonda que se une específicamente a un ácido nucleico que codifica la proteína regulada por incremento. La hibridación puede consistir

en, por ejemplo, transferencia Northern, transferencia Southern, hibridación de arreglo, cromatografía de afinidad, o hibridación in situ.

La actividad protectora de tejido del polipéptido de la invención también puede detectarse utilizando ensayos in vitro de neuroprotección. Por ejemplo, los cultivos neuronales primarios se pueden preparar a partir de hipocampos de rata recién nacidas por tripsinización, y se pueden cultivar como por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o que se describe en el presente documento por ejemplo en medio de crecimiento MEM-II (Invitrogen), 20 mM de D-glucosa, 2 mM de L-glutamina, 10% de Nu-suero (bovino; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 2% de suplemento B27 (Invitrogen), 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml de penicilina, y 1 mg/ml de estreptavidina (véase, por ejemplo, Leist et al, 2004, Science 305: 239-242). Un día después de la siembra, se añade 1 mM de citosinearabino-furanósido. Los cultivos viejos de trece días a continuación se preincuban con dosis crecientes de EPO o CEPO (3-3000 pM) durante 24 horas. El día 14, se retira el medio y los cultivos son estimulados con 300 M de NMDA en PBS a temperatura ambiente. Después de 5 minutos, se devuelve el medio precondicionado a los cultivos que luego se devuelven a la incubadora durante 24 horas. Las células se fijan en paraformaldehído, se manchan por Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) y los núcleos apoptóticos condensados pueden ser contados. NGF (50 ng/ml) y MK801 (1 M) se incluyen como controles positivos.

Los sistemas de modelos animales pueden utilizarse para demostrar la actividad protectora de tejido de un compuesto o para demostrar la seguridad y eficacia de los compuestos identificados por procedimientos de exploración de la invención que se describen más arriba. Los compuestos identificados en los ensayos a continuación pueden ser probados en cuanto a la actividad biológica utilizando modelos animales para un tipo de daño de tejido, enfermedad, afección o síndrome de interés. Estos incluyen animales modificados genéticamente para contener el complejo receptor de protección de tejido acoplado a un sistema de lectura funcional, tal como un ratón transgénico.

Los modelos animales que pueden utilizarse para probar la eficacia de la actividad protectora de célula o tejido de un compuesto identificado incluyen, por ejemplo, protección contra la aparición de la encefalomiелitis alérgica experimental aguda (EAE; véase el Ejemplo 12) en ratas Lewis, restauración o protección de la función cognitiva disminuida en ratones después de recibir trauma cerebral, isquemia cerebral ("choque"; Ejemplo 5) o convulsiones estimuladas por excitotoxinas (Brines et al, 2000, PNAS, 97: 10295 a 10.672), protección de isquemia retinal inducida (Rosenbaum et al, 1997, Vis Res. 37: 3.443 a 51), protección de una lesión en el nervio ciático (véase, Ejemplo 2), y protección de la lesión por isquemia-reperusión en corazón (estudios in vitro de cardiomiocitos y lesiones por isquemia in vivo - reperusión, véase, por ejemplo, Calvillo et al, 2003, PNAS 100: 4.802-4806 y Fiordaliso et al, 2005, PNAS 102: 2.046-2.051). Tales ensayos se describen en más detalle en: Grasso et al. (2004) Med Sci Monit 10: BR1-3 o publicación PCT no. WO02/053580. Los procedimientos in vivo descritos en la misma se dirigen hacia la administración de EPO, sin embargo, las proteínas protectoras de tejido administradas en lugar de EPO han sido identificadas por exhibir también actividad biológica similar por ejemplo, Leist et al. (2004) Science 305: 239-242. Los péptidos pueden ser sustituidos para pruebas también. Otros ensayos para determinar la actividad protectora de tejido de un péptido son bien conocidos para los expertos en la técnica.

#### 5.2.2 Ensayos de unión a células

Alternativamente, los ensayos de unión de células pueden ser para la evaluación de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, el péptido protector de tejido de interés puede ser enlazado a un marcador biológico tal como un marcador fluorescente o radiomarcado para la facilidad de detección y ensayo en cuanto a la unión a células BaF3 transfectadas que expresan EPOR y/o receptor  $\beta c$ . En una placa de 96 pocillos, se colocan en placa ocho diluciones en serie 1:2 del péptido protector de tejido de interés en medio de crecimiento (RPMI 1640, 10% de suero bovino fetal, 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina) de manera tal que el volumen final en cada pocillo sea aproximadamente 100  $\mu$ l. La línea parental BaF3 y células BaF3 transfectadas con receptor EPOR y/o  $\beta c$  se pueden lavar tres veces en medio de crecimiento (véase más arriba), los pélets se resuspenden en medio de crecimiento, y las células se cuentan y se diluyen en medio de crecimiento hasta 5.000 células/100  $\mu$ l. 100  $\mu$ l. de células diluidas se añaden entonces a cada dilución de péptido. La placa de ensayo se incuba a continuación en una incubadora a 37 °C durante tres a cuatro días. La placa/células se lavan a continuación y la placa se lee en un lector de placa fluorescente o mediante otro procedimiento adecuado para detectar el nivel de biomarcador asociado con la actividad biológica del péptido protector de tejido de interés.

De manera similar, un ensayo competitivo puede ser utilizado para determinar si un péptido protector de tejido es protector de tejido. En el ensayo competitivo, un compuesto conocido por ser protector de tejido, incluyendo, pero sin limitarse a, las citoquinas protectoras de tejido tal como las descritas en la Solicitudes de Patentes Estadounidenses No. 10/188.905 y 10/185.841, se puede unir a un biomarcador adecuado.

En una placa de 96 pocillos se colocan ocho diluciones seriadas 1:2 de un conocido compuesto protector de tejido/biomarcador en medio de cultivo adecuado, y la misma serie de dilución del conocido compuesto protector de tejido/biomarcador y un exceso del péptido protector de de tejido de interés. El volumen final de cada dilución debe ser aproximadamente 100  $\mu$ l. Una vez más, las células BaF3 se siembran en las placas como se describe más arriba y se permite que se incuben. Después de una cantidad apropiada de tiempo, las células se lavan y la placa se lee en un lector de placas fluorescente o por cualquier otro procedimiento adecuado conocido en la técnica para detectar el

biomarcador. Si la lectura de las placas y/o pocillos que contienen el conocido compuesto protector de tejido/biomarcador y péptido protector de tejido de interés es menor que la lectura de las placas que contienen sólo el conocido compuesto protector de tejido/biomarcador entonces el péptido protector de tejido de interés es protector de tejido

### 5 5.2.3 Actividad de diferenciación/proliferación de células y citoquinas

Muchos factores proteicos descubiertos hasta la fecha, incluyendo todas las citoquinas conocidas, han mostrado actividad en uno o más ensayos de proliferación celular dependientes de factor, y por tanto, estos ensayos sirven como una confirmación conveniente de la actividad de citoquinas. La actividad de un péptido protector de tejido puede ser evidenciada por cualquiera de una serie de ensayos de proliferación celular dependiente de factor de rutina para líneas celulares, incluyendo, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, H + (preB M +), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, MO7e y CMK. Estas células se cultivan en presencia o ausencia de un péptido protector de de tejido, y la proliferación de células detectadas, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o mediante ensayo colorimétrico basado en la descomposición metabólica de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, 1983, J. Immunol Meth 65:55-63).

### 15 5.2.4 Otros ensayos

Si un péptido protector de tejido exhibe una actividad protectora de tejido, un experto en la técnica reconocería que sería beneficioso verificar el resultado usando uno de los ensayos sin limitarse a, ensayos de células P-19 y PC-12. Además, varios modelos in vivo tal como modelos en animales relacionados con la lesión de la médula espinal, apoplejía isquémica, daño a los nervios periféricos, corazón, ojos, riñones, etc. serían útiles en la caracterización adicional del péptido protector de tejido. Los ensayos in vitro y in vivo adecuados se describen en las solicitudes de patente Estadounidenses No. 10/188.905 y 10/185.841.

## 5.3 USO TERAPÉUTICO

Un experto en la técnica reconocería que los péptidos protectores de tejido de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades, trastornos, y afecciones. Un experto en la técnica también reconocería que tales péptidos pueden utilizarse para lograr la modulación de un complejo receptor de protección de tejido, por ejemplo, complejo de citoquinas protectoras de tejido. Las técnicas in vitro e in vivo que pueden utilizarse para la evaluación de las indicaciones terapéuticas de, por ejemplo, los compuestos identificados mediante los ensayos de la invención descritos anteriormente se describen en la solicitud PCT No. PCT/US01/49479, Solicitudes de Patente Estadounidenses No. 10/188.905 y 10/185.841.

Los péptidos protectores de tejido antes mencionados de la invención pueden ser útiles en general para la prevención, tratamiento terapéutico, o tratamiento profiláctico de enfermedades humanas o trastornos del sistema nervioso central o sistema nervioso periférico que tienen principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades renales, s reproductivas y urinarias, enfermedades óseas, enfermedades de la piel, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades gastrointestinales, anomalías metabólicas y endocrinas. Los ejemplos de uso incluyen, pero no se limitan ala protección contra y reparación de la lesión resultante de trauma e inflamación resultante en el cerebro (accidente cerebrovascular isquémico, traumatismo cerrado, hemorragia subaracnoidea), la médula espinal (isquemia, traumatismo), nervios periféricos (lesión del nervio ciático, neuropatía diabética, síndrome del túnel carpiano), retina (edema macular, retinopatía diabética, glaucoma), y corazón (infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica). En particular, este tipo de enfermedades, trastornos, afecciones incluyen afecciones de hipoxia, que afectan adversamente los tejidos sensibles, tal como tejidos excitables en el tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, o tejido cardíaco o tejido retiniano tal como, por ejemplo, cerebro, corazón, o retina/ojo. Por lo tanto, los péptidos protectores de tejido de la invención pueden utilizarse para tratar o prevenir el daño a tejido sensible resultante. Los ejemplos de tales condiciones no limitantes y circunstancias se proporcionan en la tabla a continuación.

Los polipéptidos protectores de tejido también son de interés en la modulación de la actividad de células madre. Se ha establecido que las citoquinas que exhiben actividad protectora de tejido, por ejemplo EPO, son capaces de movilizar células madre, estimulando la migración a regiones de lesión y ayudando en el proceso de reparación, por ejemplo en un papel regenerativo. Por ejemplo, en el accidente cerebrovascular experimental, EPO media la migración de neuroblastos en una región de la lesión isquémica para regenerar neuronas durante el periodo de recuperación (Tsai et al, J. Neurosci (2006) 26: 1269 hasta 1274). Como otro ejemplo, EPO y CEPO movilizar células progenitoras endoteliales desde la médula ósea en la circulación. Estas células luego se dirigen hacia el blanco hasta regiones distantes y están involucradas en la formación de nuevos vasos sanguíneos (por efecto de EPO, véase, Bahlmann et al, 2003, Kidney Int. 64: 1648-1652). Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que los polipéptidos aislados descritos en este documento tienen un efecto similar sobre la migración de las células madre.

En el ejemplo de la protección de patologías de tejido neuronal tratables y prevenibles utilizando péptidos protectores de tejido de la invención, estas patologías son las que resultan de oxigenación reducida de tejidos

- neuronales. Cualquier afección que reduce la disponibilidad de oxígeno al tejido neuronal, que resulta en estrés, daños, y por último, muerte de las células neuronales, puede ser tratada con péptidos protectores de tejido de la presente invención. Generalmente conocidas como hipoxia y/o isquemia, estas condiciones surgen de o incluyen, pero no se limitan a, derrame cerebral, oclusión vascular, privación de oxígeno prenatal o después del parto, sofocación, asfixia, ahogamiento, intoxicación por monóxido de carbono, inhalación de humo, trauma, incluyendo cirugía y radioterapia, asfixia, epilepsia, hipoglucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, síndrome de distrés respiratorio del adulto, shock hipotensivo, shock séptico, shock anafiláctico, shock de insulina, crisis de células falciformes, paro cardíaco, arritmia, narcosis de nitrógeno, y déficits neurológicos causados por procedimientos de derivación corazón-pulmón.
- 5
- 10 En una realización, por ejemplo, los péptidos protectores de tejido de la presente invención identificados mediante el ensayo de la invención se pueden administrar solos o como parte de una composición para prevenir la lesión o daño de tejido resultante de riesgo de daño o lesión de tejido antes de, durante, o posterior a un procedimiento quirúrgico o un procedimiento médico. Por ejemplo, los procedimientos quirúrgicos pueden incluir la resección del tumor o reparación de aneurisma y los procedimientos médicos pueden incluir trabajo de parto o parto. Otras patologías
- 15 causadas por o como consecuencia de la hipoglucemia que son tratables utilizando péptidos protectores de tejido de la presente invención incluyen sobredosis de insulina, también conocida como hiperinsulinemia iatrogénica, insulinoma, deficiencia de la hormona del crecimiento, hipocortisolismo, sobredosis de drogas, y ciertos tumores.
- Otras patologías resultantes de daño de tejido neuronal excitable incluyen trastornos convulsivos, tal como epilepsia, convulsiones, o trastornos convulsivos crónicas. Otras enfermedades y afecciones tratables incluyen, pero no se
- 20 limitan a, enfermedades tal como accidente cerebrovascular, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis cerebral, traumatismo cerebral o de la médula espinal, demencia del SIDA, pérdida de función cognitiva relacionada con la edad, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos convulsivos, alcoholismo, isquemia retiniana, lesión del nervio óptico que resulta de glaucoma, y pérdida neuronal.
- 25 Los péptidos protectores de tejido específicos de la presente invención pueden utilizarse para tratar o prevenir inflamación resultante de condiciones de enfermedad o diversos traumas, tal como inflamación inducida físicamente o químicamente. Los péptidos protectores de tejido también están contemplados para el tratamiento y prevención de condiciones de inflamación en uno o más órganos o tejidos incluyendo, pero sin limitarse a, el cerebro, médula espinal, tejido conectivo, corazón, pulmón, riñón y vías urinarias, páncreas, ojos y próstata. Los ejemplos no
- 30 limitativos de tales traumas incluyen tendinitis, angitis, bronquitis crónica, pancreatitis, osteomielitis, artritis reumatoide, glomerulonefritis, neuritis óptica, arteritis temporal, encefalitis, meningitis, mielitis transversa, dermatomiositis, polimiositis, fasciitis necrotizante, hepatitis, y enterocolitis necrotizante. Además las citoquinas protectoras de tejido pueden usarse para tratar o prevenir inflamación resultante de condiciones isquémicas y no isquémicas incluyendo, pero sin limitarse a, alergias, enfermedades reumáticas, lesiones relacionadas con deportes, incluyendo infecciones víricas, fúngicas, y bacterianas. La inflamación puede ser aguda o crónica. Se observan otras aplicaciones en el campo de la inflamación dentro De PCT/US2004/031789 presentada el 29 de septiembre de 2004 y publicada como WO 2005/032467.
- 35
- Los péptidos protectores de tejido específicos de la presente invención pueden utilizarse para tratar enfermedades del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico como resultado de la desmielinización o deterioro de la
- 40 vaina de mielina. Estas enfermedades se definen como que implican principalmente lesiones inflamatorias de la vaina de mielina de origen desconocido, con la excepción de enfermedades de deficiencia por mielinización, tal 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. Debido a que su etiología es desconocida, su diagnóstico se hace con base
- 45 en sus características clínicas, es decir, multiplicidad espacial y multiplicidad en el tiempo de las lesiones del sistema nervioso central. Además, la encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM), esclerosis difusa inflamatoria, y encefalomiелitis hemorrágica necrotizante subaguda y aguda, y mielitis transversa se incluyen en enfermedades desmielinizantes. También, los tejidos nerviosos periféricos dependen de las células de Schwann para mantener la vaina de mielina, si se deterioran las células, la enfermedad desmielinizante periférica es causada.
- 50
- Los péptidos protectores de tejido de la presente invención pueden utilizarse para tratar o prevenir afecciones de, y daño al corazón incluyendo cualquier evento patológico crónico o agudo que involucre el corazón y/o tejido asociado (por ejemplo, el pericardio, aorta y otros vasos sanguíneos asociados), incluyendo la lesión por isquemia-reperusión; insuficiencia cardíaca congestiva; paro cardíaco; infarto de miocardio; aterosclerosis, fuga de la válvula mitral, aleteo auricular, cardiotoxicidad causada por compuestos tal como medicamentos (por ejemplo, doxorubicina,
- 55 herceptina, tioridazina y cisaprida); daño cardíaco debido a la infección parasitaria (bacterias, hongos, rickettsias, y virus, por ejemplo, sífilis, infección por Trypanosoma cruzi crónica); amiloidosis cardíaca fulminante; cirugía de corazón; trasplante de corazón; angioplastia, cirugía laparoscópica, lesión cardíaca traumática (por ejemplo, lesión cardíaca contusa o penetrante, y ruptura de la válvula aórtica), reparación quirúrgica de un aneurisma de aorta torácica; un aneurisma de la aorta suprarrenal; shock cardiogénico por infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca; choque neurogénico y anafilaxia. Los péptidos protectores de tejido de la presente invención también pueden usarse
- 60 para tratar personas en situación de riesgo de enfermedad cardíaca tal como insuficiencia cardíaca (es decir, donde

5 el corazón no es capaz de bombear sangre a una velocidad requerida por los tejidos metabolizadores, o cuando el corazón puede hacerlo sólo con una presión de llenado elevada). Dichos pacientes en riesgo incluirían pacientes que tienen o están en riesgo de tener infarto de miocardio, enfermedad arterial coronaria, miocarditis, quimioterapia, miocardiopatía, hipertensión, enfermedades valvulares del corazón (más a menudo insuficiencia mitral y estenosis aórtica) y cardiomiopatía inducida por toxinas (por ejemplo etanol, cocaína, etc.) y similares.

Los péptidos protectores de tejido de la presente invención pueden utilizarse para tratar o prevenir afecciones de y daño de, los ojos, por ejemplo, tejido retinal. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a isquemia retiniana, degeneración macular, desprendimiento de retina, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, obstrucción de la arteria retiniana, obstrucción de la vena retiniana, hipotensión, retinopatía diabética.

10 En otra realización, los péptidos protectores de tejido de la presente invención y los principios de la invención pueden utilizarse para prevenir o tratar lesiones como resultado de daño por radiación a tejido sensible. Otra utilidad de los péptidos protectores de tejido de la presente invención está en el tratamiento de intoxicación, tal como envenenamiento por neurotoxina (por ejemplo, envenenamiento por mariscos con ácido domoico), toxinas (etanol, cocaína, etc.), como resultado de agentes quimioterapéuticos de exposición a la radiación; neurolatirismo; Enfermedad de Guam; esclerosis lateral amiotrófica; y enfermedad de Parkinson.

15 Como se mencionó anteriormente, la presente invención también está dirigida a péptidos protectores de tejido de la presente invención para su uso la mejora de la función del tejido en células, tejidos y órganos sensibles en un mamífero mediante la administración periférica de una citoquina protectora de tejido como se describe más arriba. Diversas enfermedades y afecciones son susceptibles de tratamiento usando este procedimiento. Por ejemplo, este procedimiento es útil para potenciar la función de tejidos excitables dando como resultado un aumento de la función cognitiva incluso en ausencia de cualquier enfermedad o afección. Además, las citoquinas protectoras de tejido son útiles para mejorar la calidad de la cicatrización de heridas, reduciendo el tiempo requerido para curar, mejorar la calidad de los tejidos cicatrizados y reducir la incidencia de adherencias que resultan de la herida. Véase PCT/US2004/031789 presentada el 29 de septiembre de 2004 y publicada como WO 2005/032467. Estos usos de la presente invención se describen en detalle a continuación e incluyen la mejora del aprendizaje y formación en mamíferos no humanos y humanos.

20 Las afecciones y enfermedades tratables o prevenibles utilizando péptidos protectores de tejido de la presente invención dirigidas al sistema nervioso central incluyen pero no se limitan a los trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, depresión, autismo, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, y disfunción cognitiva. Estas afecciones se benefician de la mejora de la función neuronal. Otros trastornos tratables en conformidad con las enseñanzas de la presente invención incluyen trastornos del sueño, por ejemplo, trastornos relacionados con los viajes y apnea de sueño; sangrados aneurismáticos y subaracnoideos, shock hipotensivo, lesión de conmoción, shock séptico, shock anafiláctico, y secuelas de varias encefalitis y meningitis, por ejemplo, cerebritides relacionadas con enfermedad del tejido conectivo tal como lupus. Otros usos incluyen prevención de o protección de envenenamiento por neurotoxinas, tal como intoxicación por mariscos ácido domoico, neurolatirismo, y enfermedad de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson; tratamiento postoperatorio para lesión embólica o isquémica; irradiación de todo el cerebro; crisis drepanocítica; y eclampsia.

30 Un grupo adicional de afecciones tratables o prevenibles usando péptidos protectores de tejido de la presente invención incluyen disfunción mitocondrial, ya sea de naturaleza hereditaria o adquirida, que son la causa de una variedad de enfermedades neurológicas tipificadas por lesión neuronal y muerte. Por ejemplo, enfermedad de Leigh (encefalopatía necrotizante subaguda) se caracteriza por la progresiva pérdida visual y encefalopatía, debido a la caída neuronal, y miopatía. En estos casos, el metabolismo mitocondrial defectuoso no suministra sustratos de alta energía suficientes para alimentar el metabolismo de células excitables. Un péptido protector de tejido optimiza la función que falla en una variedad de enfermedades mitocondriales. Como se mencionó anteriormente, las afecciones hipóxicas afectan adversamente los tejidos excitables. Los tejidos excitables incluyen, pero no se limitan a, tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, y tejido cardíaco. Además de las afecciones que se describen más arriba, los péptidos protectores de tejido de la presente invención son útiles en el tratamiento de intoxicación por inhalación tal como inhalación de monóxido de carbono y humo, asma grave, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, y ahogo y cerca del ahogo. Otras afecciones que crean afecciones de hipoxia o por otros medios inducen tejido sensible, tal como daño de tejido l excitable incluyen hipoglucemia que puede ocurrir en una dosificación inadecuada de insulina, o con neoplasias productoras de insulina (insulinoma).

40 Varios trastornos neuropsicológicos que se describe que proceden de daños de tejido excitable son tratables utilizando péptidos protectores de tejido de la presente invención. Los trastornos crónicos en los que el daño neuronal está involucrado y para el que se proporciona tratamiento o es prevenible mediante la presente invención incluyen trastornos relacionados con el sistema nervioso central y/o sistema nervioso periférica incluyendo la pérdida de la función cognitiva relacionada con la edad y la demencia senil, trastornos convulsivos crónicos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esclerosis tuberosa, enfermedad de Wilson, parálisis supranuclear cerebral y progresiva, enfermedad de Guam, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedades priónicas, tal como encefalopatías espongiiformes, por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, ataxia de Freidrich y otras ataxias, así como el síndrome de Gilles de la Tourette, trastornos convulsivos tal como epilepsia y trastorno

5 convulsivo crónico, derrame cerebral, traumatismo de la médula espinal o cerebro, demencia del SIDA, alcoholismo, autismo, isquemia de retina, glaucoma, trastornos de la función autonómica tal como trastornos del sueño e hipertensión, y trastornos neuropsiquiátricos que incluyen, pero no se limitan a esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno de déficit de atención, trastorno distímico, trastorno depresivo mayor, manía, trastorno obsesivo-compulsivo, trastornos por consumo de sustancias psicoactivas, ansiedad, trastorno de pánico, así como los trastornos afectivos bipolares y unipolares. Los trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos adicionales incluyen, por ejemplo, los enumerados en American Psychiatric Association's Diagnostic y Statistical Manual of Mental Disorders (DSM).

10 Un grupo adicional de afecciones tratables o prevenibles utilizando péptidos protectores de tejido de la presente invención incluyen enfermedades renales tal como insuficiencia renal aguda y crónica. El suministro de sangre a los riñones se puede cortar debido a varias causas, entre ellas una descarga de infecciones que invaden el torrente sanguíneo (septicemia), hemorragia internas o externa, pérdida de líquido del cuerpo como resultado de una diarrea severa o quemazón, reacciones a transfusiones, paro cardíaco o arritmias, trauma quirúrgico y trasplantes renales.

15 La reducción del flujo de sangre a los riñones como resultado de las afecciones anteriores puede reducir el flujo de sangre a niveles peligrosamente bajos durante un periodo de tiempo lo suficientemente grande como para generar el desarrollo de insuficiencia renal aguda. La disminución del flujo de sangre también resulta en necrosis, o muerte de tejido, en el riñón, dañando las células tubulares renales. La insuficiencia renal puede también resultar de enfermedades (intersticial y diabetes), síndromes nefróticos, infecciones, lesiones (inducida por CEC), toxinas (por contraste, inducida por quimioterapia, ciclosporina), Inflamación autoinmune (por ejemplo Lupus, eritrotosis, etc.).

20 Los péptidos protectores de tejido de la presente invención ayudan en la reparación o prevención de este daño ayudando a mejorar la insuficiencia renal aguda.

La siguiente tabla muestra indicaciones adicionales, ilustrativas, no limitativas en cuanto a las diversas afecciones y enfermedades susceptibles de tratamiento por los mencionados péptidos protectores de tejido.

ES 2 653 864 T3

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
Corazón	Isquemia	Enfermedad de la arteria coronaria	Crónica, aguda Estable, inestable
		Infarto del miocardio	Síndrome de Dressler
		Angina	
		Cardiopatía congénita	Valvular Cardiomiopatía
		Angina de Prinzmetal	
		Rotura cardíaca	Aneurismática Perforación septal
		Angiitis	
	Arritmia	Taquibradiarritmia	Estable, inestable
		Supraventricular, ventricular	Nodo seno carotídeo hipersensible
		Anormalidades de conducción	
	Insuficiencia cardíaca congestiva	Izquierda, derecha, bi-ventricular diastólica	Miocardopatías, tal como familiar idiopática, infecciosa, metabólica, enfermedades de almacenamiento, deficiencias, trastorno de tejido conectivo, infiltración y granulomas, neurovascular
		Miocarditis	Autoinmune, infecciosa, idiopática
		Cor pulmonale	
Lesión por radiación			
Trauma penetrante y contuso			
Toxinas	Toxicidad por cocaína, adriamicina		
Vascular	Hipertensión	Primaria, secundaria	
	enfermedad de descompresión		
	Fibromuscular		
	hiperplasia		
	Aneurisma	Disección, rota, agrandada	
Pulmones	Obstruictiva	Asma	
		Bronquitis crónica	
		Enfisema y obstrucción de vía aérea	

ES 2 653 864 T3

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
	Enfermedad pulmonar isquémica	Embolia pulmonar, Trombosis pulmonar, embolia grasa	
	Enfermedades pulmonares ambientales		
	Enfermedad pulmonar isquémica	Embolia pulmonar Trombosis pulmonar	
	enfermedad pulmonar intersticial	fibrosis pulmonar idiopática	
	Congénita	Fibrosis cística	
	Cor pulmonale		
	Trauma		
	Neumonía y neumonitides	Infecciosas, parasitarias, tóxicas, traumáticas, quemaduras, aspiración	
Sarcoidosis			
Páncreas	Endocrino	Diabetes mellitus, tipo I y II	Insuficiencia de células beta, disfunción neuropatía diabética
		Otro fallo de las células endocrinas del páncreas	
	Exócrina	Insuficiencia pancreática exocrina	pancreatitis
Hueso	Osteopenia	Primaria	hipogonadismo inmovilización posmenopáusica
		Secundaria	Relacionada con la edad hiperparatiroidismo Hipertiroidismo deficiencia de calcio, magnesio, fósforo y/o vitamina D
	Osteomielitis		
	necrosis vascular		
	Trauma		
Enfermedad de Paget			
Piel	Alopecia	Areata	primaria secundaria
		Totalis	Calvicie de patrón masculino
	Vitiligo	Localizado	Primario
Generalizado		secundario	
Ulceración	Diabética	Llagas por presión, úlceras por presión,	
	Decubitis	Llagas de cama	

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo	
	Enfermedad vascular periférica			
	heridas quirúrgicas, laceraciones			
	Lesiones por quemaduras			
Trastornos autoinmunes	Lupus eritematoso, Síndrome de Sjogren, Artritis reumatoide, glomerulonefritis, angitis			
	histiocitosis de Langerhan			
Ojo	Neuritis óptica			
	Lesiones penetrantes y contusas, infecciones, sarcoidosis, enfermedad falciforme C, Desprendimiento de retina, arteritis temporal			
	Isquemia retiniana, degeneración macular, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, obstrucción de la arteria retiniana, obstrucción de la vena retiniana, hipotensión, retinopatía diabética, glaucoma y edema macular			
Trastornos fetales y embrionarios	Asfixia			
	Isquemia			
CNS	síndrome de fatiga crónica, síndrome hiperosmolar hipoosmolar agudo y crónico, Demencia por SIDA, electrocución			
	Malaria cerebral			
	Encefalitis	Rabia, Herpes,		
	Meningitis			
	Hematoma subdural			
	Adicción a la nicotina			
	Abuso y abstinencia de drogas	cocaína, heroína, crack, marihuana, LSD, PCP, abuso de varias drogas, éxtasis, opiáceos, sedantes hipnóticos, anfetaminas, cafeína		
	Trastornos obsesivo-compulsivos			
	Estenosis espinal, mielitis transversa, síndrome de Guillain Barre, Trauma, compresión de la raíz nerviosa, compresión tumoral, golpe de calor			

ES 2 653 864 T3

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
ENT	Tinnitus		
	Síndrome de Meuniere		
	Pérdida de la audición		
	Lesión traumática, barotraumas		
Riñón	Falla renal	Aguda, crónica	Vascular/isquémica, enfermedad intersticial enfermedad renal diabética, síndrome nefrótico, infecciones, lesiones, inducida por, inducida por contraste, inducida por quimioterapia, ciclosporina inducida por CEC, o preventiva
	Lesión por radiación		
	Henoch, Púrpura de Schonlein		
Músculo estriado	Trastornos autoinmunes	miastenia gravis Dermatomiositis polimiositis	
	Miopatías	Heredado metabólica, endocrina y tóxica	
	Golpe de calor		
	lesión por aplastamiento		
	Rabdamiolisis		
	Enfermedad mitocondrial		
	Infección	fascitis necrotizante	
Disfunción sexual	Central y periférico (por ejemplo disfunción eréctil)	Impotencia secundaria a la medicación, (diabetes)	
Hígado	Hepatitis	Viral, bacteriana, parasitaria	
	Enfermedad isquémica		
	Cirrosis, hígado graso		
	enfermedades infiltrantes/ metabólicas		
Gastrointestinal	Enfermedad intestinal isquémica		
	enfermedad inflamatoria intestinal		
	enterocolitis necrotizante		
Transplante de órgano	Tratamiento de donante y receptor		

Célula, tejido u órgano	Disfunción o patología	Afección o enfermedad	Tipo
Tracto reproductor	Infertilidad	Vascular autoinmune anomalías uterinas trastornos de implantación	
Endócrina	Hiperfunción e hipofunción glandular		
General	Shock	Séptico, hemodinámico	
	Parasitemia	Malaria, tripanosomiasis, Leishmaniasis	

Como se mencionó anteriormente, estas enfermedades, trastornos o afecciones son meramente ilustrativas del intervalo de beneficios que ofrecen los péptidos protectores de tejido de la presente invención. Por consiguiente, esta invención proporciona en general tratamiento preventivo, terapéutico, o profiláctico de las consecuencias de trauma mecánico o enfermedades humanas. Está contemplado el tratamiento preventivo, terapéutico, o profiláctico de las enfermedades, trastornos o afecciones del sistema nervioso central y/o sistema nervioso periférico. Se proporciona el tratamiento preventivo, terapéutico, o profiláctico de las enfermedades, trastornos o afecciones que tienen un componente psiquiátrico. Se proporciona el tratamiento preventivo, terapéutico, o profiláctico de enfermedades, trastornos o afecciones incluyendo, pero sin limitarse a aquellas que tienen componente oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratorio, renal, urinario, reproductivo, gastrointestinal, endocrino, o metabólico.

En una realización, dicha una composición farmacéutica que comprende un péptido protector de tejido puede administrarse sistémicamente para proteger o mejorar las células, tejido u órganos diana. Tal administración puede ser por vía parenteral, por inhalación, o transmucosa, por ejemplo vía oral, nasal, rectal, intravaginal, sublingual, ocular, submucosa o transdérmica. Preferentemente, la administración es parenteral, por ejemplo por vía intravenosa o inyección intraperitoneal, y también incluyendo, pero sin limitarse a, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica y subcutánea.

Para otras vías de administración, tal como mediante el uso de un líquido de perfusión, inyección en un órgano, u otra administración local, una composición farmacéutica será proporcionada dando como resultado niveles similares de un péptido protector de de tejido como se describe más arriba. Se prefiere un nivel de aproximadamente 15 pM - 30 nM.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En una realización específica, el término " aceptable para uso farmacéutico " significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o detallado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea extranjera generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como soluciones salinas en aceite y agua, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Una solución salina es un vehículo preferente cuando la composición farmacéutica es administrada por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosas también pueden ser empleadas como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similar. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similar. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tal como triglicéridos. Los compuestos de la invención se pueden formular como formas de sal o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tal como aquellos obtenidos de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con grupos carboxilo libres tal como aquellos obtenidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol 2-etilamino, histidina, procaína, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por EW Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Las formulaciones para aumentar la adsorción de péptidos transmucosales tal como péptidos protectores de tejido de acción prolongada están también contempladas por la presente invención. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración por vía oral pueden proporcionarse en forma de cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas comestibles o batidos; o como emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o derivados de los mismos, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales de los mismos. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, semisólido, o polioles líquidos etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

5  
10  
15  
Un agente activo destinado para la administración por vía oral puede estar recubierto con o mezclado con un material que retrasa la desintegración y/o la absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, pueden utilizarse monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo). De ese modo, la liberación sostenida de un agente activo se puede lograr durante muchas horas y, si es necesario, el agente activo puede ser protegido de ser degradado dentro del estómago. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden formularse para facilitar la liberación de un agente activo en una localización gastrointestinal particular, debido al pH específico o condiciones enzimáticas.

20  
25  
Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden proporcionarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período prolongado de tiempo. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden proporcionarse en forma de pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Para la administración tópica sobre la piel, boca, ojos u otros tejidos externos, se utiliza preferentemente una crema tópica o pomada. Cuando se formula en una pomada, el ingrediente activo puede emplearse con una base de pomada miscible en agua o una parafínica. Alternativamente, 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 la administración tópica en el ojo incluyen gotas para los ojos. En estas composiciones, el ingrediente activo puede ser disuelto o suspendido en un vehículo adecuado, por ejemplo, en un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas, pastillas y enjuagues bucales.

30  
35  
40  
Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración pulmonar y nasal pueden comprender vehículos sólidos tal como polvos (preferentemente con un tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 500 micrómetros). Los polvos pueden ser administrados en la forma en que se toma el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través de la nariz desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Alternativamente, las composiciones adoptadas para la administración nasal pueden comprender vehículos líquidos, pro ejemplo, aerosoles nasales o gotas nasales. Alternativamente, la inhalación de compuestos directamente a los pulmones puede llevarse a cabo por inhalación profundamente o inhalación a través de una boquilla en la orofaringe. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las composiciones para La administración por inhalación pueden ser suministradas en dispositivos especialmente adaptados, incluyendo, pero sin limitarse a, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden construirse de manera que se proporcionen dosis predeterminadas del ingrediente activo. En una realización preferente, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en la cavidad nasal directamente o a los pulmones a través de la cavidad nasal u orofaringe.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden proporcionarse en forma de supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden proporcionarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

45  
50  
55  
60  
Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas estériles inyectables o suspensiones, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un destinatario. Otros componentes que pueden estar presentes en tales composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las composiciones adaptadas para la administración parenteral pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado liofilizado que requiere sólo la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de inyección temporáneas y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. En una realización, puede proporcionarse un autoinyector que comprende una solución inyectable de un péptido protector de tejido para el uso de emergencia en ambulancias, salas de emergencia, y situaciones de campo de batalla, y aun para la auto-administración en un entorno doméstico, en particular cuando puede ocurrir la posibilidad de amputación traumática, tal como por el uso imprudente de una cortadora de césped. La probabilidad de que las células y tejidos en un pie o dedo cortado sobrevivan después de la reinserción se puede aumentar mediante la administración de un péptido protector de tejido a múltiples sitios en la parte cortada tan pronto como sea posible, incluso antes de la llegada del personal médico en el lugar, o la llegada del individuo afectado con el dedo cortado a cuestras en la sala de emergencias.

En una realización preferente, la composición es formulada en conformidad con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, se suministran ingredientes ya sea por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un concentrado libre de agua o polvo liofilizado seco en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se debe administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se debe administrar por inyección, se puede proporcionar una ampolla de solución salina estéril de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

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

Una composición de perfusión puede proporcionarse para su uso en baños de órganos trasplantados, para la perfusión in situ, o para la administración a la vasculatura de un donante de órganos antes de la extracción de órganos. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender niveles de péptidos protectores de tejido, o una forma de péptidos protectores de tejido no adecuada para la administración local o sistémica, aguda o crónica, a un individuo, sino que servirá para las funciones previstas en este documento en un cadáver, baño de órganos, perfundido de órganos, o perfundido in situ antes de retirar o reducir los niveles de péptido protector de tejido contenido en el mismo antes de exponer o devolver el órgano tratado o tejido a la circulación regular.

Además se da a conocer en el presente documento un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado a dichos recipientes puede haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de medicamentos o productos biológicos, que refleje la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

En otra realización, por ejemplo, un péptido protector de tejido se puede entregar 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. En una realización, puede utilizarse una bomba (véase Langer, más arriba; 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). En otra realización, el compuesto puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease y Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353-365 (1989); WO 91/04014; Patente Estadounidense No. 4.704.355; Lopez-Berestein, ibid., páginas 317-327; véase en general íbidem). En otra realización, pueden utilizarse 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).

En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en proximidad del blanco terapéutico, es decir, las células, tejido o de órganos diana, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, páginas 115-138 en Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, más arriba, 1984.). Otros sistemas de liberación controlada se debaten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

En otra realización, el péptido protector de tejido, tal como se formula adecuadamente puede ser administrado por administración nasal, oral, rectal, vaginal, ocular, transdérmica, parenteral o sublingual.

En una realización específica, puede ser deseable administrar un péptido protector de tejido de la invención localmente al área que necesita el tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, la infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo en conjunción con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tal como membranas silásticas o fibras. Un ejemplo no limitante de tal realización sería un stent coronario recubierto con un péptido protector de tejido de la presente invención.

La selección de la dosis eficaz preferida será fácilmente determinable por un experto en la materia sobre la base de considerar varios factores, que serán conocidos por un experto en la técnica. Tales factores incluyen la forma particular de péptido protector de tejido, y sus parámetros farmacocinéticos tal como biodisponibilidad, metabolismo, vida útil, etc., que se han establecido durante los procedimientos de desarrollo habituales normalmente empleados en la obtención de la aprobación reglamentaria para un compuesto farmacéutico. Otros factores en la consideración de la dosis incluyen la afección o enfermedad que debe ser tratada o el beneficio que debe alcanzarse en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, ya sea que la administración sea crónica o aguda, medicamentos concomitantes, y otros factores bien conocidos que afectan la eficacia de los agentes

farmacéuticos administrados. Así pues, la dosificación exacta debe decidirse de acuerdo al juicio del practicante y circunstancias de cada paciente, por ejemplo, dependiendo de la afección y estado inmunitario del paciente individual, y de acuerdo a técnicas clínicas estándar.

5 En otro aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica de acuerdo a la presente invención puede incluir un péptido protector de tejido en una formulación con al menos una pequeña molécula que exhibe  
 10 funcionalidad de protección de tejido. Las moléculas pequeñas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, esteroides (por ejemplo, lazaroides y glucocorticoides), antioxidantes (por ejemplo, coenzima Q10, ácido alfa lipoico, y NADH), enzimas anticatabólicas (por ejemplo, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, barredores sintéticos catalíticos, así como miméticos), derivados de indol (por ejemplo, indolaminas, carbazoles, y carbolinas), agentes  
 15 neutralizantes de ácido nítrico, agonistas de adenosina/adenosina, fitoquímicos (flavonoides), extractos de hierbas (ginko biloba y cúrcuma), vitaminas (vitaminas A, E, y C), inhibidores de aceptor de electrones oxidasa (por ejemplo, inhibidores de electrones de la xantina oxidasa), minerales (por ejemplo, cobre, zinc, y magnesio), fármacos anti-inflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina, naproxeno, e ibuprofeno), y combinaciones de los mismos. Adicionalmente los agentes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes anti-inflamatorios (por ejemplo, corticosteroides,  
 20 prednisona y hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos anti-inflamatorios no esteroides (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenac, y inhibidores de COX-2), beta-agonistas, agentes anticolinérgicos y metil xantinas), agentes inmunomoduladores (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, moduladores del receptor de células T, moduladores del receptor de citoquina, agentes de agotamiento de células T, antagonistas de citoquinas, antagonistas de monocinas, inhibidores de linfocitos, o agentes anti cáncer), inyecciones de oro, sulfasalazina,  
 25 penicilamina, agentes anti-angiogénicos (por ejemplo, angiostatina), antagonistas del TNF- $\alpha$  (por ejemplo, anticuerpos anti-TNF), y endostatina), dapsona, psoralenos (por ejemplo, metoxaleno y trioxisaleno), agentes contra la malaria (por ejemplo, hidroxiclороquina), agentes antivirales, y antibióticos (por ejemplo, eritromicina y penicilina) pueden utilizarse en combinación con las actuales composiciones farmacéuticas.

En otro aspecto de la invención, una perfusión o solución de perfusión se proporciona para la perfusión y el  
 25 almacenamiento de órganos para trasplante, la solución de perfusión incluye una cantidad de un péptido protector de de tejido eficaz para proteger las células sensibles y células, tejidos u órganos asociados. El trasplante incluye pero no se limita a alotrasplante, donde un órgano (incluyendo células, tejido u otra parte del cuerpo) se extrae de un donante y es trasplantado a un receptor diferente, siendo ambos de la misma especie; autotrasplante, donde el órgano es tomado de una parte de un cuerpo y es reemplazado en otra, incluyendo procedimientos quirúrgicos de  
 30 banco, en el que un órgano puede ser removido, y mientras está ex vivo, ser reseccionado, reparado o manipulado de otra manera, tal como para la extirpación del tumor, y luego regresado a la ubicación original o xenotrasplantes, donde los tejidos u órganos son transplantados entre especies. En una realización, la solución de perfusión es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (patente Estadounidense No. 4.798.824) que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 U/ml (10 ng = 1U) de péptido protector de tejido, 5% de almidón  
 35 hidroxietilo (que tiene un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 300.000 y sustancialmente libre de etilenglicol, clorhidrina de etileno, cloruro de sodio y acetona); 25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3 mM de glutatión; 5 mM de adenosina; 10 mM de glucosa; 10 mM de tampón HEPES; 5 mM de gluconato de magnesio; 1,5 mM de CaCl<sub>2</sub>; 105 mM de gluconato de sodio; 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 hasta 7,5 y una osmolalidad de aproximadamente 320  
 40 mOsm/ l. La solución es utilizada para mantener los riñones cadavéricos y páncreas antes del trasplante. Mediante el uso de la solución, la conservación se puede extender más allá del límite de 30 horas recomendado para la conservación de riñones cadavéricos. Este líquido para perfusión en particular es meramente ilustrativo de una serie de este tipo de soluciones que pueden ser adaptadas para el uso actual mediante la inclusión de una cantidad efectiva de un péptido protector de tejido. En una forma de realización adicional, la solución de perfusión contiene de  
 45 aproximadamente 1 a aproximadamente 500 ng/ml de un péptido protector de tejido, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 320 ng/ml de péptido protector de tejido. Como se mencionó anteriormente, cualquier forma de péptido protector de de tejido puede utilizarse en este aspecto de la invención.

Si bien el receptor preferido de un péptido protector de tejido para los fines del presente documento es un ser humano, los procedimientos en este documento se aplican igualmente a otros mamíferos, particularmente animales  
 50 domésticos, animales de granja, de compañía, y animales de zoológico. Sin embargo, la invención no es limitante y los beneficios pueden ser aplicados a cualquier mamífero.

En otros aspectos de la invención ex-vivo, se puede emplear cualquier péptido protector de tejido tal como pero sin limitarse a los que se describen más arriba.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos y composiciones para potenciar las viabilidad de  
 55 células, tejidos u órganos que no están aislados de la vasculatura por una barrera de células endoteliales mediante la exposición de las células, tejido u órganos directamente a una composición farmacéutica que comprende un péptido protector de tejido, o la administración o el contacto de una composición farmacéutica que contiene un péptido protector de tejido con la vasculatura del tejido u órgano. La actividad mejorada de células sensibles en el tejido u órgano tratado es responsable de los efectos positivos ejercidos.

60 Similar a otros compuestos protectores de tejido en base a la eritropoyetina, es posible que los péptidos protectores de tejido de la presente invención puedan ser transportados desde la superficie luminal a la superficie de la

membrana basal de las células endoteliales de los capilares de órganos con uniones estrechas de células endoteliales, incluyendo, por ejemplo, el cerebro, retina, y testículos. De ese modo, las células sensibles a través de la barrera pueden ser objetivos susceptibles de efectos beneficiosos de los péptidos protectores de tejido, y otros tipos de células o tejidos u órganos que contienen y dependen en su totalidad o en parte de las células sensibles en los mismos pueden ser objetivos para los procedimientos de la invención. Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría en particular, después de la transcitosis del péptido protector de tejido puede interactuar con un receptor protector de tejido en una célula sensible, por ejemplo, célula neuronal, ocular (por ejemplo, retinal), adiposa, conectiva, de pelo, diente, mucosal, de páncreas, endocrina, aural, epitelial, de piel, muscular, de corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, adrenal (por ejemplo corteza suprarrenal, médula suprarrenal), capilar, endotelial, de testículos, ovario, o endometrial, y la unión del receptor puede iniciar una cascada de transducción de señal resultante en la activación de un programa de expresión génica dentro de la célula o tejido sensible, resultando en la protección de la célula o tejido, u órganos, de daños, tal como por toxinas, agentes quimioterapéuticos, terapia de radiación, hipoxia, etc. En otra realización, el péptido protector de tejido puede ser reticulado a un compuesto que puede cruzar la barrera, tal como eritropoyetina carbamílada, que se transporta a través de la barrera en conformidad con la enseñanza de la solicitud PCT No. PCT/US01/49479, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nos. 10/188.905 y 10/185.841. De ese modo, los procedimientos para proteger tejido que contiene células sensibles de una lesión o estrés hipóxico, y potenciar la función de dicho tejido se describen en detalle a continuación.

En la práctica de una realización de la invención, un paciente mamífero está experimentando quimioterapia sistémica para el tratamiento de cáncer, incluida la terapia de radiación, que comúnmente tiene efectos adversos tal como daño de nervios, pulmón, corazón, ovario o testículos. La administración de una composición farmacéutica que comprende un péptido protector de tejido como se describe más arriba se lleva a cabo antes de y durante la quimioterapia y /o radioterapia, para proteger varios tejidos y órganos de daños por el agente quimioterapéutico, tal como proteger a los testículos. El tratamiento puede continuarse hasta que los niveles circulantes del agente quimioterapéutico hayan caído por debajo de un nivel de peligro potencial para el cuerpo del mamífero.

En la práctica de otra realización de la invención, se ha previsto extraer diversos órganos ir de una víctima de un accidente de automóvil para el trasplante a un número de destinatarios, algunos de los cuales requieren el transporte por una extendida distancia y periodo de tiempo. Antes de la extracción de órganos, el donante se infunde con una composición farmacéutica que comprende péptidos protectores de tejido como se describe en el presente documento. Los órganos extraídos para el envío son perfundidos con un líquido de perfusión que contiene péptidos protectores de tejido como se describe en el presente documento, y son almacenados en un baño que comprende péptidos protectores de tejido. Ciertos órganos son continuamente perfundidos con un dispositivo de perfusión pulsante, utilizando un perfundido que contiene péptidos protectores de tejido en conformidad con la presente invención. Un deterioro mínimo de la función del órgano se produce durante el transporte e implante y reperfusión de los órganos in situ.

En otra realización de la presente invención, un participante en una actividad peligrosa, uno podría tomar una dosis de una composición farmacéutica que contiene un péptido protector de tejido suficiente para prevenir (es decir retrasar la aparición de, inhibir o detener), proteger contra, o mitigar el daño resultante de una lesión en una célula, tejido u órgano sensible. En particular, este procedimiento de tratamiento puede tener una aplicación en varias profesiones susceptibles de lesión tal como, pero sin limitarse a, atletas profesionales (buzos, pilotos de carreras, futbolistas, etc.), personal militar (soldados, paracaidistas), personal de emergencia (policía, bomberos, EMS, y personal de socorro), dobles de riesgo y trabajadores de la construcción. Además, el uso profiláctico de péptidos protectores de tejido se contempla en tales actividades recreativas, incluyendo, pero sin limitarse a, escalada en roca, rappel, paracaidismo, carreras, ciclismo, fútbol, rugby, béisbol, y buceo que representan un riesgo de lesión.

En otra realización de la invención, un procedimiento quirúrgico para reparar una válvula de corazón requiere cardioplegia temporal y oclusión arterial. Antes de la cirugía, el paciente se infunde con un péptido protector de tejido. Este tratamiento previene el daño celular isquémico hipóxico, sobre todo después de la reperfusión. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse como profilaxis para preparar a una persona para la cirugía en un esfuerzo por limitar el trauma asociado con el procedimiento quirúrgico o ayudar en la recuperación de la persona de la intervención quirúrgica. Aunque el presente procedimiento de tratamiento que utiliza composiciones farmacéuticas que contienen péptidos protectores de tejido proporciona un uso profiláctico para procedimientos quirúrgicos, puede ser particularmente útil en los procedimientos que inducen los eventos isquémicos temporales, incluyendo, pero sin limitarse a, los procedimientos de bypass (derivación coronaria), procedimientos de angioplastia, amputaciones, y trasplantes, así como, aquellos que se realizan directamente sobre células, tejidos u órganos sensibles, tal como cerebro y cirugía de la médula espinal, y procedimientos de corazón abierto. Tales procedimientos pueden implicar el uso de derivación cardiopulmonar (corazón-pulmón).

En otra realización de la invención, en cualquier procedimiento quirúrgico, tal como en cirugía de bypass cardiopulmonar, puede utilizarse un péptido protector de tejido de la invención. En una realización, se lleva a cabo la administración de una composición farmacéutica que comprende péptidos protectores de tejido como se describe más arriba previo a, durante y/o después del procedimiento de bypass, para proteger la función del cerebro, corazón, y otros órganos.

En los ejemplos anteriores en que un péptido protector de tejido de la invención es utilizado para aplicaciones ex vivo, o para aplicaciones in vivo para tratar células sensibles tal como tejido neuronal, tejido retinal, células o tejido cardíaco, pulmonar, hepático, renal de intestino delgado, de corteza adrenal, de médula adrenal, capilar endotelial, testicular, ovárico, o endometrial, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma unitaria de dosificación adaptada para la protección o mejoramiento de células sensibles, tejidos u órganos distales a la vasculatura que comprende una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 pg a 7,5 mg, 0,5 pg a 6,5 mg, 1 pg a 5 mg, 500 pg a 5 mg, 1 ng a 5 mg, 500 ng a 5 mg, 1 µg a 5 mg, 500 µg a 5 mg, o 1 mg a 5 mg de un péptido protector de tejido, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En una realización preferente, la cantidad de péptido protector de tejido está dentro del intervalo de aproximadamente 0,5 pg a 1 mg. En una realización preferente, la formulación contiene péptidos protectores de tejido que son no eritropoyéticos.

En un aspecto adicional de la invención, la administración de péptidos protectores de tejido puede utilizarse para restaurar la función cognitiva en mamíferos que han pasado por trauma cerebral. Después de un retraso de 5 días o 30 días, la administración de péptidos protectores de tejido debe ser capaz de restaurar la función en comparación con los mamíferos tratados con placebo, indicando la capacidad del péptido protector de tejido de regenerar o restaurar la actividad cerebral. De ese modo, la invención también está dirigida al uso de péptidos protectores de tejido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trauma cerebral y otras disfunciones cognitivas, incluyendo el tratamiento bien después de la lesión (por ejemplo tres días, cinco días, una semana, un mes, o más). La invención también está dirigida a péptidos protectores de tejido para su uso en un procedimiento para el tratamiento de disfunción cognitiva después de la lesión mediante la administración de una cantidad efectiva de péptidos protectores de tejido. Puede utilizarse cualquier péptido protector de tejido como se describe en el presente documento para este aspecto de la invención.

Además, este aspecto restaurador de la invención está dirigido al uso de cualquier péptido protector de tejido del presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para la restauración de la función de célula, tejido u órgano, donde el tratamiento se inicia después de, y poco después del agravamiento inicial responsable de la disfunción. además, el tratamiento que utiliza péptidos protectores de tejido de la invención puede extender el curso de la enfermedad o afección durante la fase aguda así como una fase crónica d

Un péptido protector de tejido de la invención puede administrarse sistémicamente en una dosificación entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 5-50 µg/kg de peso corporal, mucho preferentemente aproximadamente 10-30 µg/kg de peso corporal, por administración. Esta dosis efectiva debe ser suficiente para alcanzar los niveles séricos de péptidos protectores de tejido mayores que aproximadamente 80, 120, o 160 ng/ml de suero después de la administración. Dichos niveles séricos pueden lograrse aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 horas posteriores a la administración. Dichas dosificaciones pueden repetirse según sea necesario. Por ejemplo, la administración puede repetirse diariamente, siempre que sea clínicamente necesario, o después de un intervalo apropiado, por ejemplo, cada 1 a 12 semanas, preferentemente, cada 1 a 3 semanas. En una realización, la cantidad efectiva de péptido protector de tejido y un vehículo aceptable para uso farmacéutico puede envasarse en un vial de dosis simple u otro envase. En otra realización, se utilizan péptidos protectores de tejido, que son capaces de ejercer las actividades que se describen en el presente documento pero que no causan un incremento en la concentración de hemoglobina o hematocrito. Dichos péptidos protectores de tejido son preferentes en casos donde está previsto que los procedimientos de la presente invención sean proporcionados crónicamente.

#### 5.4 TRANSCITOSIS

Péptido protector de tejido y molécula portadora. La presente invención además está dirigida a un procedimiento para facilitar el transporte de un péptido protector de tejido a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero mediante la administración de una composición que comprende el péptido protector de tejido en asociación con un péptido portador, un péptido capaz de cruzar una barrera de células endoteliales, tal como eritropoyetina, como se describe anteriormente. Las uniones estrechas entre células endoteliales en ciertos órganos en el cuerpo crean una barrera para el ingreso de determinadas moléculas. Para el tratamiento de diversas afecciones dentro del órgano con barrera, se desean medios para facilitar el paso del péptido protector de tejido.

El péptido protector de tejido como molécula portadora. Los péptidos protectores de tejido de la invención pueden ser útiles como vehículos para la entrega de otras moléculas a través de la sangre-cerebro y otras barreras similares a través de las cuales pueden viajar. Se prepara una composición que comprende una molécula deseada de cruzar la barrera con un péptido protector de de tejido y la administración periférica de la composición resulta en la transcitosis de la composición través de la barrera. La asociación entre la molécula que es transportada a través de la barrera y el péptido protector de tejido puede ser un enlace covalente lábil, en cuyo caso la molécula es liberada de la asociación con el péptido protector de tejido después de cruzar la barrera. Si se mantiene la actividad farmacológica deseada de la molécula o no es afectada por la asociación con péptidos protectores de tejido, tal complejo se puede administrar.

El experto en la materia será consciente de diversos medios para asociar moléculas con péptidos protectores de tejido de la invención y los otros agentes que se describen más arriba, por covalentes, no covalentes, y otros medios. Además, la evaluación de la eficacia de la composición se puede determinar fácilmente en un sistema experimental.

La asociación de moléculas con péptidos protectores de tejido se puede lograr por cualquier número de medios, incluyendo unión lábil, covalente, entrecruzamiento, etc. Las interacciones de biotina/avidina pueden ser empleadas; por ejemplo, un péptido protector de tejido biotinilado de la invención puede ser combinarse con un conjugado lábil de avidina y una molécula deseablemente transportada. Como se mencionó anteriormente, una molécula híbrida  
5 puede prepararse por medios recombinantes o sintéticos, por ejemplo, una polipéptido quimérico o fusión que incluye tanto el dominio de la molécula con actividad farmacológica deseada y el dominio responsable de la modulación de la actividad receptora de péptidos protectores de tejido. Los sitios de escisión de la proteasa se pueden incluir en la molécula.

Una molécula puede conjugarse con un péptido protector de tejido de la invención a través de una molécula polifuncional, es decir, un agente de reticulación polifuncional. Como se utiliza en el presente documento, el término "molécula polifuncional" abarca moléculas que tienen un grupo funcional que puede reaccionar más de una vez en serie así como moléculas con más de un grupo reactivo. Como se utiliza en el presente documento, el término "grupo reactivo" se refiere a un grupo funcional en el agente de reticulación que reacciona con un grupo funcional en una molécula (por ejemplo, péptido, proteína, carbohidrato, ácido nucleico, en particular una hormona, antibiótico, o agente anti-cáncer para ser entregado a través de una barrera de células endoteliales) a fin de formar un enlace covalente entre el reticulante y esa molécula. El término "grupo funcional" conserva su significado estándar en química orgánica. Las moléculas polifuncionales que pueden utilizarse son enlazadores preferentemente biocompatibles, es decir, son no carcinogénicos, no tóxicos, y sustancialmente no inmunogénicos in vivo. Los reticulantes polifuncionales tal como los conocidos en la técnica y que se describen en el presente documento se pueden probar fácilmente en modelos animales para determinar su biocompatibilidad. La molécula polifuncional es preferentemente bifuncional. Como se utiliza en el presente documento, el término "molécula bifuncional" se refiere a una molécula con dos grupos reactivos. La molécula funcional puede ser heterobifuncional o homobifuncional. Un agente de reticulación heterobifuncional permite la conjugación vectorial. Se prefiere particularmente que la molécula polifuncional sea suficientemente soluble en agua para la reacciones de reticulación que se producen en soluciones acuosas tal como en soluciones acuosas tamponadas en pH 6 a 8, y que el conjugado resultante permanezca soluble en agua para la biodistribución más eficaz. Típicamente, la molécula polifuncional se une covalentemente con un grupo funcional sulfidrido o un amino. Sin embargo, las moléculas polifuncionales reactivas con otros grupos funcionales, tal como ácidos carboxílicos o grupos hidroxilo, se contemplan en la presente invención.

Las moléculas homobifuncionales tienen al menos dos grupos funcionales reactivos, que son iguales. Los grupos funcionales reactivos en una molécula homobifuncional incluyen, por ejemplo, grupos aldehído y grupos éster activos. Las moléculas homobifuncionales que tienen grupos aldehído incluyen, por ejemplo, glutaraldehído y subaraldehído. El uso de glutaraldehído como agente de reticulación fue divulgado por Poznansky et al., Science 223, 1304-1306 (1984). Las moléculas homobifuncionales que tienen al menos dos unidades de éster activos incluyen ésteres de ácidos dicarboxílicos y N-hidroxisuccinimida. Algunos ejemplos de tales ésteres de N-succinimidilo incluyen suberato de disuccinimidilo y ditio-bis-(propionato de succinimidilo), y sus sales de ácido bis-sulfónico y bis-sulfonato solubles tal como sus sales de potasio y sodio. Estos reactivos homobifuncionales están disponibles en Pierce, Rockford, Illinois.

Las moléculas heterobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos diferentes. Los grupos reactivos reaccionan con diferentes grupos funcionales, por ejemplo, presentes en el péptido y la molécula. Estos dos grupos funcionales diferentes que reaccionan con el grupo reactivo en el agente de reticulación heterobifuncional son por lo general un grupo amino, por ejemplo el grupo amino epsilon de lisina; un grupo sulfidrido, por ejemplo, el grupo tiol de cisteína; un ácido carboxílico, por ejemplo, el carboxilato en el ácido aspártico; o un grupo hidroxilo, por ejemplo, el grupo hidroxilo en serina

Por supuesto, algunos de los diversos péptidos protectores de tejido de la invención, pueden no tener grupos reactivos adecuados disponibles para su uso con cierto agente de reticulación; sin embargo, un experto en la técnica será ampliamente consciente de la elección de los agentes de reticulación basado en los grupos disponibles para la reticulación en péptidos protectores de tejido de la invención.

Cuando un grupo reactivo de una molécula heterobifuncional forma un enlace covalente con un grupo amino, el enlace covalente será generalmente un enlace imido o amido. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con un grupo amino puede, por ejemplo, ser un grupo carboxilato activado, un grupo halocarbonilo, o un grupo éster. El grupo halocarbonilo mencionado es un grupo clorocarbonilo. Los grupos éster son preferentemente grupos éster reactivos tal como, por ejemplo, un grupo éster de N-hidroxi-succinimida.

El otro grupo funcional normalmente es un grupo tiol, un grupo capaz de ser convertido en un grupo tiol, un grupo que forma un enlace covalente con un grupo tiol. El enlace covalente por lo general será un enlace de tioéter o un disulfuro. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con un grupo tiol puede, por ejemplo, ser un doble enlace que reacciona con grupos tiol o un disulfuro activado. Un grupo reactivo que contiene un enlace doble capaz de reaccionar con un grupo tiol es el grupo maleimido, aunque otros, tal como acrilonitrilo, son también posibles. Un grupo disulfuro reactivo puede, por ejemplo, ser un grupo 2-piridilditio o un grupo 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico). Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que contienen enlaces disulfuro reactivos incluyen N-succinimidil 3-(2-piridil-ditio) propionato (Carlsson, et al, 1978, Biochem J., 173: 723-737), alfa-metilbenciltiosulfato de S-4-succinimidiloxicarbonilo sódico; y 4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-(2-piridilditio)tolueno. Se prefiere N-succinimidil

propionato de 3-(2-piridilditio). Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que comprenden grupos reactivos que tienen un doble enlace que reacciona con un grupo tiol incluyen succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato y m-maleimidobenzoato de succinimidilo.

5 Otras moléculas heterobifuncionales incluyen succinimidil 3-(maleimido) propionato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimido-fenil) butirato, sulfosuccinimidil 4-(N-ciclohexano maleimidometil)-1-carboxilato de etilo, éster de maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida. Se prefiere la sal de sulfonato de sodio de m-maleimidobenzoato de succinimidilo. Muchos de los reactivos heterobifuncionales mencionados anteriormente y sus sales de sulfonato están disponibles en Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois EE.UU.

10 La necesidad de que el conjugado descrito anteriormente sea reversible o lábil puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia. Un conjugado se puede ensayar in vitro para la actividad farmacológica deseable. Si el conjugado conserva ambas propiedades (las propiedades de la molécula conjugada y las propiedades del péptido protector de tejido), su idoneidad puede entonces ser probada in vivo. Si la molécula conjugada requiere la separación del péptido protector de tejido para la actividad, un enlace lábil o asociación reversible con eritropoyetina de acción prolongada o citoquina protectora de tejido de acción prolongada será preferible. Las características de labilidad pueden también ser probadas utilizando el estándar en los procedimientos in vitro antes de la prueba in vivo.

15 Se puede obtener información adicional acerca de cómo hacer y usar los mismos, así como otros reactivos polifuncionales, de las siguientes publicaciones o otros disponibles en la técnica

Carlsson, J. et al., 1978, *Biochem. J.* 173:723-737;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Novick, D. et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:8483-8487;

Lomant, A.J. y Fairbanks, G., 1976, *J. Mol. Biol.* 104:243-261;

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

35 Hashida, S. et al., 1984, *J. Applied Biochem.* 6:56-63.

Además, los procedimientos de reticulación son revisados por Means y Feeney, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1: 2-12.

Las barreras que se cruzan por los procedimientos descritos anteriormente y las composiciones de la presente invención incluyen pero no se limitan a la barrera hemato-ovárica, hemato-nerviosa, barrera hemato-cerebral, barrera hemato-ocular, barrera hemato-testicular, barrera hemato-cordón espinal, barrera hemato-placenta.

40 La moléculas candidatas para el transporte a través de una barrera de células endoteliales incluyen, por ejemplo, hormonas, tal como hormona de crecimiento, factores neurotróficos, antibióticos, antivirales, o antifúngicos tal como aquellas normalmente excluidas del cerebro y otros órganos con barrera, radiofármacos peptídicos, fármacos antisentido, anticuerpos y antivirales contra agentes biológicamente activos, productos farmacéuticos, y agentes anticancerígenos. Los ejemplos no limitativos de tales moléculas incluyen hormonas tal como la hormona de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante

45

β1 (TGFβ1), factor de crecimiento transformante β2 (TGFβ2), factor de crecimiento transformante β3 (TGFβ3), interleuquina 1, interleuquina 2, interleuquina 3, y interleuquina 6, AZT, anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral y agentes inmunosupresores tal como ciclosporina. Además, los tintes o marcadores se pueden unir a los péptidos protectores de tejido de la presente invención con el fin de visualizar células, tejidos, u órganos dentro del cerebro y otros órganos con barrera con fines de diagnóstico. Como un ejemplo, un marcador utilizado para visualizar la placa dentro del cerebro podría estar unido a un péptido protector de tejido con el fin de determinar el avance de la enfermedad de Alzheimer dentro de un paciente.

La presente invención también está dirigida a una composición que comprende una molécula para ser transportada vía transcitosis a través de una barrera de unión estrecha de células endoteliales y un péptido protector de tejido como se describe más arriba. La invención también está dirigida al uso de un conjugado entre una molécula y una citoquina peptídica protectora de tejido como se describe más arriba para la preparación de una composición farmacéutica para la entrega de la molécula a través de una barrera como se describe más arriba.

Se proporcionan varios modelos animales y ensayos in vitro de neuroprotección y transcitosis en el documento PCT/US01/49479 para demostrar la eficacia de la péptidos protectores de tejido de la invención. Para transcitosis, las proteínas modelo conjugadas con las eritropoyetinas de acción prolongada de la invención son evaluadas para el transporte en el cerebro después de la administración parenteral. Estas pruebas en modelos animales y modelos in vitro son predictivas de la eficacia de los presentes compuestos en otras especies de mamíferos incluyendo seres humanos.

La presente invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

## 6. Ejemplos

### EJEMPLO 1: PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE PÉPTIDO.

A. Síntesis de Péptido A (SEC ID NO:32, correspondiente a la secuencia de aminoácidos EPO 38-57) y Péptido B (SEC ID NO:34, correspondiente a la secuencia de aminoácidos EPO 58-82).

Péptido A, SEC ID NO:32, y Péptido B, SEC ID NO:34, los fragmentos de EPO (véase la Tabla 1), se sintetizaron utilizando síntesis de péptido en fase sólida por etapas de Boc Chemistry "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. Brevemente, dos fragmentos correspondientes a la secuencia de aminoácidos EPO 38-57 (Péptido C, NITVPDTKVNFYAWKRMEVG, SEC ID NO: 29) y secuencia de aminoácidos EPO 58-82 (Péptido D, QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEC ID NO: 30) se sintetizaron en -OCH<sub>2</sub> -Pam-resinas ("péptidos de carboxilo" libres) o en HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Leu-OCH<sub>2</sub>-Pam-resina (péptidos de tioester). Durante la síntesis las cadenas laterales de varios aminoácidos fueron protegidas como sigue: 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 que la cadena de péptidos fue ensamblada, los péptidos se desprotegeron y simultáneamente fueron escindidos del soporte de resina mediante tratamiento con HF anhidro que contenía p-cresol (90:10, v/v) durante 1 hora a 0 °C. Después de evaporar el HF bajo presión reducida, los productos crudos se precipitaron y se trituraron con éter dietílico refrigerado, y se disolvieron los péptidos en 50% de acetonitrilo acuoso que contenía 0,1% de TFA y se purificaron mediante el sistema de HPLC preparativa. Las composiciones de péptidos se confirmaron mediante LC-MS.

### EJEMPLO 2. VALIDACIÓN DE LA PROTECCIÓN DE TEJIDO MEDIADA POR PÉPTIDOS

Los péptidos protectores de tejido se ensayaron en cuanto a cualquier actividad protectora de tejido utilizando un ensayo del Nervio Ciático. Ratas Sprague-Dawley (250-300 gramos) (seis por grupo, incluyendo el control) se anestesiaron usando isoflurano (Baxter NPC 10019-773-60) y un Sistema de anestesia de laboratorio superior de Tabla (medidor de caudal ajustado a 2-3 litros/minuto @ 55 psi) durante al menos 3 minutos. A continuación, la rata se colocó en una manta homeotérmica para asegurar que la temperatura del núcleo de la rata se mantuviera a 35-37 °C durante la operación. La temperatura central se controló a través de una sonda rectal. El nervio ciático derecho de la rata anestesiada se expuso en la mitad del muslo a través de una disección del músculo cuádriceps; se hizo una incisión de 2 cm con un escalpelo de cuchilla 15 a través de la piel y en paralelo sobre el músculo cuádriceps y el músculo cuádriceps se cortó para exponer el nervio ciático utilizando un par de tijeras de disección. A continuación, el nervio ciático fue liberado de las membranas circundantes. Un hilo de seda trenzado de 2-0 (Ethicon, 685-G) se pasó bajo el nervio y los extremos de la sutura se pasaron a través de una guía que se mantuvo perpendicular al nervio. A continuación, el extremo de la sutura se ató a un cordón no elástico que después se cubrió alrededor del sistema de poleas (una polea NYL que tenía MTD ¼ "B (Número PO 04174-01) con estabilizador) y un peso de 100 gramos unido a la cuerda no elástica se liberó lentamente. Se permitió que el peso cuelgue durante 1 minuto antes de la sutura de seda fuera cortada para liberar el peso.

Una dosis de 289 pmol/kg de eritropoyetina carbamilada, una dosis de 289 pmol/kg de de un péptido de la serie A-J (Véase la Tabla 1), o PBS después se inyectó en la vena caudal usando una jeringa de ½ cc de insulina. Un

fragmento 20mer (correspondiente a los aminoácidos 102 a 121) a partir del factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) que no sigue las enseñanzas anteriores se utilizó como control.

5 El músculo y la incisión quirúrgica luego se cerraron y 5 ml de solución de Ringer lactato se inyectó por vía subcutánea en la rata. La temperatura central de la rata se mantuvo a 35-37 °C utilizando una manta de calor durante la recuperación.

10 Durante los próximos cuatro días se determinó el ensanchamiento del dedo del pie trasero de las ratas colocando la rata en un tubo acrílico con un diámetro de 30 cm sobre la superficie de exploración de un escáner digital. Después de esperar 5 minutos para permitir la aclimatación, se tomó una exploración de las patas traseras de las ratas que mostraban claramente los 5 dedos de los pies. Se tomaron tres exploraciones aceptables de cada rata. A partir de las exploraciones, se midió la propagación del dedo del pie (la distancia entre la bola del primer dedo del pie y la bola del quinto dedo del pie) y la propagación del dedo del pie Intermedio (la distancia entre la bola del segundo dedo del pie y la bola del cuarto dedo del pie). Entonces se calculó el índice estático ciático en conformidad con S. Erbayraktar et al., 2003, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100, 6741-6746 y se realizó el análisis estadístico.

15 Todos los péptidos excepto B (SEC ID NO: 34), H (SEC ID NO: 47) y el derivado de PEDF eran igualmente protectores, proporcionando un índice estático ciático ("SSI") de aproximadamente -0,57 frente a un SSI de aproximadamente -67 a aproximadamente -68 para fragmento PBS/PEDF (Fig. 2). La Figura 2 también muestra que la eficacia de los péptidos positivos fue al menos equivalente, si no mejorada, con respecto a aquella de la eritropoyetina carbamilada.

20 La Tabla 1 también presenta la distancia aproximada entre los carbonos de carbonilo para los péptidos ensayados. Las distancias se calculan utilizando las coordenadas tridimensionales proporcionadas por Cheetham et al., 1998, Nat. Struct. Biol. 5: 861-866. Los péptidos que dieron positivo para la actividad protectora de tejido cada uno tenía una distancia/separación de carbono de carbonilo a carbono de carbonilo entre aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å.

Tabla 1

25 Eficacia protectora de tejido de péptidos representativos utilizando un bioensayo in vivo (modelo de lesión del nervio ciático)

Clase de Péptido	péptido	Secuencia EPO	Estructura	Distancia aproximada entre los carbonos de carbonilo (Angstroms)	Dosis [nmoles/kg-de peso corporal]	Ensayo de nervio ciático
A) fragmento EPO	A	1-23	APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE (SEC ID NO:32)	4,6	29,290,1450	+
			APPRLICDSRVLERYLLEAKEAE (SEC ID NO:32)	4,4		
	B	24-37	NITTGCAEHCSLNE (SEC ID NO:34)	2,8	290	-
	C	38-57	NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG (SEC ID NO:29)	4,6	290	+
	D	58-82	QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV (SEC ID NO:30)	4,8	29,290,1450	+
	E	28-47	GCAEHCSLNENITVPDTKVN (SEC ID NO:31)	4,4	290	+
	F	14-29	RYLLEAKEAENITGTC (SEC ID NO:33)	3,6	290	+
B) cara de Hélice						

	G	58, 62, 65, 69, 72, 76, 79, 80, 83, 84, 85	QEQLERALNSS (SEC ID NO:40)	-3,6	290	+
	H	71,72,75,76,77	SELRGC (SEC ID NO:47)	7,2	290	-
C)						
quimera						
	I	Péptido G + hoja plisada β (33-39)	CSLNENIQEQLERALNSS (SEC ID NO:43)		290	+
	J	péptido G + hélice de polipéptido pancreático	QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR (SEC ID NO:41)		290	+
D) motivo de citoquina tipo 1	K	GM-CSF hélice A (13-26)	WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO:35) WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO:35) WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO:35)	3,6 4,6 4,6	290	+
	L	CNTF hélice A (26-41)	KIRSDLTALTESYVKH (SEC ID NO:37)	4,7	290	+

**EJEMPLO 3. PÉPTIDOS PROTECTORES DE TEJIDO NO SON ERITROPOYÉTICOS.**

A. Evaluación In Vitro:

- 5 Se utilizó una línea celular de leucemia dependiente de eritropoyetina humana UT-7epo, para la determinación de la potencia eritropoyética de los péptidos. Las células UT-7epo (Deutsche Sammlung von (Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Cat. No. ACC 363) se cultivaron en un medio RPMI-1640 completo con 10% de FBS y 5 ng/ml de eritropoyetina. La respuesta de proliferación/supervivencia (= aumento de viabilidad) de las células expuestas a eritropoyetina está mediada por el receptor de eritropoyetina clásico de tipo eritrocitos y es una medida cuantitativa de la capacidad de las variantes de eritropoyetina para estimular el receptor de eritropoyetina clásico.
- 10 Las células UT-7epo se transfirieron a medio RPMI 1640 completo fresco que contenía 10% de suero de ternero donante, 4 mM de L-glutamina, y suplementado 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 un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 48 horas. El día dos de ensayo, es decir, 48 horas, las células fueron transferidas desde el matraz a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante
- 15 se descartó y las células se lavaron dos veces con 10 ml de medio de inanición (3% de suero de ternera donante, 4 mM de L-glutamina). Las células luego se re-suspendieron en medio de inanición, usando acción de pipeta arriba y abajo para obtener una suspensión de células individuales. Las células resuspendidas se diluyeron con medio de inanición para obtener una densidad de 4 x 10<sup>5</sup> células/ml, y se colocaron en placas en un volumen de cultivo total de 10 ml por matraz de 25 cm<sup>2</sup>. Después de una incubación de 4 horas, las células fueron transferidas de nuevo a un tubo cónico de 50 ml. Las células de control se mantuvieron junto con 5 ng/ml de rhu-eritropoyetina.
- 20 Las células se diluyeron hasta 200.000 células/ml en medio de inanición, se colocaron e placas en 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos y se expusieron a concentraciones variables de eritropoyetina, eritropoyetina carbamilada, y Péptido D, SEC ID NO: 30. Se utilizó una serie de diluciones de 10 veces en medio RPMI 1640 que contenía 3% de suero para generar concentraciones de compuestos de ensayo de 0,2 pM a 20 nM. Después de 48 horas más de
- 25 incubación, se añadió una solución de 15 ml de reactivo de proliferación celular WST-1 (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 placas (absorción a 450 nm, sustraída de la absorción de fondo a 650 nm).
- 30 El péptido D no exhibió ninguna actividad eritropoyética en dosis tan altas como 10.000 pM (Fig. 3). Preferentemente, el péptido 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 del péptido protector de tejido F (SEC ID NO: 33) o péptido G (SEC ID NO: 40), como se debate más arriba un péptido construido a partir de los residuos presentadores de Hélice B), se administraron los péptidos 0,8 mg/kg por vía subcutánea tres veces por semana a ratas Sprague Dawley. El programa de dosificación correspondió a la dosis equivalente (en una base molar) de EPO previamente determinada por provocar máxima eritropoyesis. La concentración de hemoglobina se determinó periódicamente mediante el uso de un analizador automatizado (Keska Corporation).

Ni el péptido F ni el péptido G mostraron ningún aumento en el hematocrito en el transcurso del estudio (FIG. 4; La respuesta a una dosis equimolar de EPO se presenta para comparación). La disminución de la hemoglobina destacada por EPO después de 3 semanas se debe a la producción de anticuerpos neutralizantes anti-EPO que causan aplasia de glóbulos rojos. En contraste, no se observó ninguna respuesta de anticuerpos neutralizantes, ya sea para el péptido G o péptido F.

## EJEMPLO 4. PÉPTIDO ES PROTECTOR DE TEJIDO EN ENSAYOS IN VITRO.

Los péptidos se pueden evaluar fácilmente en cuanto a la protección de tejido utilizando cualquier número de ensayos in vitro. Por ejemplo, la protección de excitotoxicidad puede determinarse utilizando la muerte inducida por kainita de motoneuronas ratón. Las médulas espinales se obtuvieron de embriones de rata Sprague-Dawley de 15 días como se ha descrito previamente (Siren et al, 2001, PNAS 98: 4044.). El cuerno ventral se tripsinizó y se centrifugó a través de un cojín de BSA al 4% durante 10 min a 300 X g. Las células (que representan el cultivo mixto de neurona-glía) se sembraron en una densidad de 2.000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos recubiertas previamente con poli-DL ornitina y laminina. Las motoneuronas fueron además purificadas por inmunoadsorción y las células fueron sembradas a baja densidad (20.000 Células/cm<sup>2</sup>) sobre placas de pocillos de 24 mm recubiertas previamente con poli-DL-ornitina y laminina, y que contenían medio de cultivo completo [Neurobasal/B27 (2%); 0.5 mM de L-glutamina; 2% de suero de caballo; 25 mM de 2 mercaptoetanol; 25 mM de glutamato; 1% de penicilina y estreptomocina; 1 ng/ml de BDNF]. El medio se añadió nuevamente (sin glutamato) a los cultivos los días 4 y 6.

La muerte celular se indujo el día 6 en cultivo por incubación durante 48 horas con ácido kaínico (5 mM para cultivos mixtos de neurona-glía, 50 mM para cultivos purificados). El péptido D (5 ng/ml) o vehículo se añadió a los cultivos 72 horas antes de la inducción de la muerte celular, y el tratamiento continuó durante 48 horas. El medio después se desechó y las células se fijaron con 4% (vol/vol) de paraformaldehído en PBS durante 40 minutos, se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100, se bloquearon con 10% (vol/vol) de FCS en PBS, se incubaron con anticuerpos contra neurofilamentos no fosforilados (SMI-32; 1: 9000) durante la noche, y se visualizaron mediante el procedimiento de avidina-biotina con diaminobencidina. La viabilidad de motoneuronas se evaluó morfológicamente contando las células positivas SMI-32 a través de cuatro lados del cubreobjetos y se realizó la tinción de cuerpos apoptóticos mediante el uso H33258.

Péptido D (SEC ID NO:30; correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la SEC ID NO:1) protegió completamente a las motoneuronas de la lesión causada por kainato (FIG. 5).

Alternativamente, la protección de tejido producida por los péptidos puede ser determinada utilizando un ensayo que emplea células P19 de ratón, que son similares a las neuronales y mueren a través de apoptosis tras la retirada de suero. La protección de tejido del péptido D (SEC ID NO: 30) se comparó con la de EPO usando clon P19 P19S1801A1 tal como se publicó anteriormente (Siren et al, 2001, PNAS 98: 4044). Las células se mantuvieron no diferenciadas en DMEM suplementado con 2 mM de Lglutamina; 100 unidades/ml de penicilina G; 100 mg/ml de sulfato de estreptomocina (GIBCO); 10% (vol/vol) de FBS (Hyclone), que contenía 1,2 g/litro de NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM de tampón Hepes, denominado en lo sucesivo como medio completo. El medio libre de suero contenía los mismos componentes que el anterior con la supresión de suero y la adición de 5 mg/ml de insulina; 100 mg/ml de transferrina; 20 nM de progesterona; 100 mM de putrescina; 30 nM de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (de Sigma). Para los experimentos, el 50% de la células confluentes se pretataron, durante la noche con EPO o vehículo, se disociaron con tripsina, se lavaron en medio libre de suero, y se colocaron en frascos de cultivo de tejido de 25 cm<sup>2</sup> en una densidad final de 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en un medio libre de suero o solo con EPO agregada. La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul de tripano y un hemocitómetro.

El péptido C, SEC ID NO:29 (correspondiente a los aminoácidos 38-57 de la SEC ID NO:1) fue al menos 10 veces más potente en base al peso que EPO en la prevención de apoptosis de células p19 (FIG. 6).

## EJEMPLO 5. MODELO DE OCLUSIÓN DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA.

Las ratas Cr1: CD (SD) BR macho que pesaban 250 a 280 g se obtuvieron de Charles River, Calco, Italia. La cirugía se realizó en conformidad con las enseñanzas de Brines et al, 2000, PNAS EE.UU. 97:10526-10531. Brevemente, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal, ip), las arterias carótidas se visualizaron, y la carótida derecha fue ocluida por dos suturas y se cortó. Un agujero de trépano adyacente y rostral a la órbita derecha permitió la visualización de la arteria cerebral media ("MCA"), que fue cauterizada distal a la arteria rinal.

Para producir una penumbra (zona de borde) que rodeaba esta lesión MCA fija, la arteria carótida contralateral fue ocluida durante 1 hora mediante el uso de tracción proporcionada por unas pinzas finas y luego se abrió de nuevo.

5 Las ratas Sprague Dawley (8 por grupo) se sometieron al protocolo de MCAO indicado anteriormente. A las ratas se les administró PBS, eritropoyetina carbamilada (44 ug/kg), o péptido D (aa 58-82; 4,4 ug/kg) después de la liberación de la oclusión. Además, el péptido D (aa 58-82; 4,4 ug/kg) fue administrado en cuatro dosis en intervalos de 2 horas después de la oclusión a un grupo separado. Para la evaluación de la lesión, las ratas se sometieron a pruebas de comportamiento o el volumen de la lesión se determinó por tinción con tetrazolio de secciones de cerebro realizadas 24 horas después de la cirugía en conformidad con el protocolo indicado anteriormente.

10 La FIG. 7A presenta un gráfico que demuestra el volumen de las lesiones resultantes del protocolo MCAO. El tratamiento con péptido D (SEC ID NO: 30), ya sea como una sola dosis o múltiples dosis, redujo el volumen de la lesión resultante de la cirugía MCAO en aproximadamente dos tercios: estadísticamente equivalente a los efectos protectores de tejido de eritropoyetina carbamilada.

(b) Ventana terapéutica de citoquinas protectoras de tejido

15 El protocolo MCAO como se indica más arriba se repitió para el presente ejemplo. Siguiendo el procedimiento de oclusión, se administró PBS, eritropoyetina carbamilada (44 ug/kg, iv), o péptido D (SEC ID NO: 30) (4,4 ug/kg) a las ratas inmediatamente después de que la recirculación se estableció en la carótida (es decir, una hora del inicio de isquemia). Además, el péptido D (SEC ID NO: 30) se administró en cuatro dosis (cada una 4,4 ug/kg de peso corporal) en intervalos de 2 horas después de la oclusión. (8 ratas por grupo).

(c) Ensayo de comportamiento.

20 Un grupo separado de ratas fue también ensayado en un protocolo de comportamiento fallas de pata. Las ratas fueron probadas en un suelo con rejilla de acero inoxidable elevada 30 cm x 30 cm con tamaño de cuadrícula de 30 mm de acuerdo al protocolo de Markgraf et al, 1992, Brain Research 575: 238-246. Cuando se coloca en la rejilla, la rata trataría de moverse y de vez en cuando coloca una pata, en lugar de en la rejilla, a través de una abertura de rejilla ("falla de pata"). El número de fallas de pata se midió por un período de 1 minuto.

25 Las ratas tratadas con péptido D (SEC ID NO: 30) después de la reperusión sufrieron un menor número de fallas de pata que las tratadas con PBS (FIG 7B.). No se observó ningún beneficio adicional significativo después de la administración de dosis múltiples de péptido D (SEC ID NO: 30). Aunque el número medio de fallas de pata fue menor en el grupo que recibió dosis múltiples de péptido, la diferencia observada no fue significativamente diferente del grupo que recibió una dosis única.

### 30 EJEMPLO 6. NEUROPATÍA DIABÉTICA

La diabetes fue inducida en ratas Sprague Dawley macho (Charles River, Calco, IT) usando estreptozocina administrada en dosis única de 60 mg/kg ip en ratas en ayunas como se describió anteriormente (Bianchi et al., 2004, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 101, 823-828). La diabetes fue confirmada por aumento de los niveles de glucosa en suero a más de 300 mg por decilitro (mg%) (los niveles normales son <100 mg%). Los animales diabéticos se trataron luego con péptido D (SEC ID NO: 30; 4 mg/kg) o vehículo 5 veces a la semana por vía intraperitoneal. Dos semanas después de la inducción del estado diabético, se determinó la velocidad de conducción nerviosa utilizando el nervio caudal.

40 Como se muestra en la FIG. 8A, los animales diabéticos mostraron una reducción en la velocidad de conducción nerviosa caudal de aproximadamente 22 m/s (normales) un aproximadamente 19 m/s. La administración de péptido D (SEC ID NO: 30) se asoció con un aumento en la velocidad de conducción hasta aproximadamente 23 m/s.

Además, el umbral nociceptivo térmico se cuantificó por medición del tiempo hasta la retirada de pata en una prueba de "placa caliente". La latencia de retirada se definió como el tiempo entre la colocación sobre la placa caliente y el momento de la retirada y lamido de la pata trasera. Cada animal se ensayó en dos ocasiones separadas por un intervalo de descanso de 30 minutos. Se midió el umbral térmico de la pata trasera 4 semanas después de la inducción de la diabetes. El péptido D (SEC ID NO: 30) redujo el tiempo de latencia pasado en la placa caliente por el animal diabético (FIG. 8B).

### EJEMPLO 7: PROTECCIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO Y RIÑÓN DE LA LESIÓN INDUCIDA POR CISPLATINO.

50 Se administró Cisplatino (CDDT) por vía intraperitoneal a ratas Sprague-Dawley macho en 2 mg/kg dos veces por semana durante 5 semanas como se describe en Bianchi et al, 2006, Clin Cancer Res. 12: desde 2607 - 2612. Los animales fueron separados en grupos de 6 cada uno. Durante el la administración de CDDT de 5 semanas, los animales también recibieron y péptido G (SEC ID NO: 40) en 0,4µg/kg de peso corporal o PBS ip tres veces por semana. Un grupo de control recibió PBS en lugar de CDDT. La latencia en placa caliente se determinó como se describe en el Ejemplo 6 anterior.

Los animales que recibieron CDDT y solamente PBS mostraron un aumento en la latencia en comparación con los controles: es decir, CDDT se asoció con alteración de la sensibilidad térmica. En contraste, los animales que recibieron el péptido exhibieron latencia en placa caliente normal (Fig. 9A)

- 5 El tratamiento con péptido también impidió poliuria inducida por CDDT (Fig. 9B). Específicamente, los animales que habían recibido PBS mostraron un aumento significativo en la producción diaria de orina de aproximadamente 30 ml/día a aproximadamente 47 ml/día. En contraste, los animales que habían recibido el péptido protector de tejido no difirieron significativamente de los animales de controles que recibieron PBS en lugar de CDDT.

#### **EJEMPLO 8: PROTECCIÓN DE FUGA VASCULAR RETINAL INDUCIDO POR DIABETES**

- 10 Los efectos beneficiosos de péptidos protectores de tejido sobre la permeabilidad vascular retiniana inducida por hiperglucemia pueden determinarse usando un modelo de rata de retinopatía diabética. En este modelo, se usa azul de Evans para determinar las fugas desde el vaso sanguíneo a tejidos como es descrito por Xu et al., 2001, Invest. Ophthalm. Vis. Sci 42: 789-794. Por lo tanto, azul de Evans está estrechamente ligado a la albúmina y por ello se retiene dentro de la circulación a menos que se produzca permeabilidad de la pared de los vasos, tal como es causado por la diabetes mellitus no controlada.

- 15 En este modelo, ratas Sprague-Dawley macho en ayunas reciben una dosis única de estreptozotocina (60mg.kg ip). Dos días después, tras la verificación del desarrollo de diabetes mellitus (glucosa sérica en ayunas superior a 300 mg%) los animales se dividieron en grupos de 6 animales cada uno, así como un grupo de control que no recibió estreptozotocina. A los dos grupos diabéticos se administraron péptido D (SEC ID NO: 30) en 4 µg.kg por vía intraperitoneal 5 días por semana o PBS en el mismo cronograma. Después de tres semanas de la diabetes no controlada, los animales fueron anestesiados y se les administró colorante azul de Evans (30 mg/kg) por vía intravenosa, que se permitió que circule durante 2 horas. Utilizando punción transcardíaca, los animales fueron perfundidos con PBS hasta que el efluente estuviera limpio seguido por 4% de paraformaldehído. A continuación los ojos se retiraron y las retinas se diseccionaron cuidadosamente desde el globo. El contenido de la retina de azul de Evans se determinó incubando las retinas en formamida a 80 °C durante 18 horas. El sobrenadante se retiró a continuación y se guardó para el análisis y las retinas se secaron por completo y se pesaron. La concentración de azul de Evans en el sobrenadante se determinó mediante un espectrofotómetro y se estableció una curva estándar de azul de Evans disuelto en formamida.

- 20 Como se observa en la FIG. 10, los animales que recibieron administración de péptido D (SEC ID NO: 30) no experimentaron ningún aumento en el colorante azul de Evans dentro de la retina, en comparación con el control. En contraste, los animales diabéticos que recibieron sólo PBS mostraron un aumento en el contenido de azul de Evans de la retina, indicando que se había producido fuga vascular.

#### **EJEMPLO 9: PROTECCIÓN DE FALLA RENAL AGUDA**

- 35 Los péptidos protectores de tejido también son eficaces en la prevención de lesiones en los riñones en el escenario de isquemia. Las ratas Wistar macho adultas fueron anestesiadas y se realizó una incisión abdominal para visualizar ambas arterias renales. Utilizando una pinza vascular atraumática, ambas arterias se comprimieron durante 60 minutos, deteniendo por completo el flujo sanguíneo renal. Las abrazaderas se retiraron a continuación para restablecer la circulación y se administró péptido F (SEC ID NO: 33) o péptido G (SEC ID NO: 40) en 290 pmol/kg de peso corporal por vía intravenosa. Un grupo adicional que sufría isquemia recibió sólo PBS por vía intravenosa.

- 40 Setenta y dos horas después de la reperusión, los animales se anestesiaron y se sometieron a acondicionamiento por perfusión usando paraformaldehído. Los animales acondicionados se seccionaron sagitalmente en dos mitades y además se acondicionaron por inmersión en formaldehído al 10% a temperatura ambiente durante un día. La evaluación histológica de los riñones se realizó de acuerdo al protocolo de Sharples et al, 2005, J Amer Soc Nephrol: 15: 2115. En resumen, después de la deshidratación utilizando etanol clasificado, las piezas de riñón se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 5 micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones en los portaobjetos se desparafinaron con xileno, se contratiñeron con hematoxilina y eosina, y se examinaron bajo un microscopio con luz. Cien campos fueron examinados para cada riñón, y se proporcionó una puntuación de 0 a 3 para cada perfil tubular: 0, histología normal; 1, hinchazón de células tubulares, pérdida del borde en cepillo, y condensación nuclear con un máximo de un tercio de pérdida nuclear; 2, en cuanto a la puntuación 1 pero mayor que un tercio y menos de dos tercios de perfiles tubulares que muestran pérdida nuclear; y 3, más de dos tercios de perfil tubular que muestra pérdida nuclear. La puntuación histológica de cada riñón se calculó sumando todas las puntuaciones, con puntuación máxima de 300.

La administración del péptido F (SEC ID NO:33) o péptido G (SEC ID NO:40) se asoció a una reducción significativa en la puntuación de lesión ( $p < 0,05$ ) en comparación con los controles.

#### **EJEMPLO 11.EFICACIA DE PÉPTIDOS PROTECTORES DE TEJIDO EN MALARIA CEREBRAL.**

- 55 Un modelo de roedor de malaria cerebral se desarrolló de acuerdo a Kaiser et al., 2006, J. Infect. Dis. 193:987-995. Los ratones CBA/J hembra de 7 semanas fueron separados en grupos de 20 animales. Cada grupo fue infectado con Plasmodium berghei Anka (PbA) administrado por vía intraperitoneal como una dosis de  $10^6$  eritrocitos

5 infectados con PbA. Los ratones recibieron PBS o péptido F (SEC ID NO: 33) los días 4, 5, y 6 como inyección intraperitoneal en una dosis de 2,6 g/kg. El estado clínico y los datos de frotis de sangre fueron recogidos durante el seguimiento (punto final D30). La supervivencia acumulativa a largo plazo se calculó de acuerdo al Procedimiento de Kaplan-Meier y los grupos se compararon con la prueba de log-rango. El tiempo de supervivencia fue la variable dependiente. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

Como se Muestra en la Figura 12, todos los ratones en el grupo de control (solución salina) murieron el día 8. En contraste, los ratones que recibieron péptido F (SEC ID NO: 33) mostraron una supervivencia prolongada, significativamente diferente del grupo de control ( $p < 0.005$ ), mediante una prueba de log-rango.

#### **EJEMPLO 12: EFICACIA DE PÉPTIDOS PROTECTORES DE TEJIDO EN UN MODELO DE EAE MURINO**

10 La encefalomiелitis autoinmune experimental ("AEA") fue inducida en ratones C57BL/6 hembra (6-8 semanas de edad) de acuerdo a Savino et al, 2006, J Neuroimmunol 172: 27-37. EAE fue inducida por la inmunización subcutánea en el flanco con un total de 200 g de MOG35-55 (Multiple Peptide Systems, San Diego, CA, EE.UU.) en adyuvante incompleto de Freund (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con 8 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis (cepa H37RA; Difco, Detroit, MI, EE.UU.). Los animales fueron alojados en condiciones libres de patógenos específicos, lo que permitió el acceso a alimentos y agua ad libitum. Los ratones recibieron 500 ng de toxina Pertussin (Sigma) iv en el momento de la inmunización y 48 horas más tarde. Peso y puntuación clínica se registraron diariamente (0= saludable, 1 = cola flácida, 2 = ataxia, y/o parálisis en extremidades traseras, o reflejo de enderezamiento lento, 28 C. 3 = parálisis de las extremidades traseras y/o parálisis de las extremidades anteriores, 4 = paraparesia de extremidades delanteras, 5 = moribundo o muerte). Los pélets de comida y agua potable se colocaron en placas de Petri en el suelo de la jaula para permitir que los ratones enfermos coman y beban. Se administró péptido E (SEC ID NO: 31) por vía subcutánea diariamente en una dosis de 4,4 microgramos/kg de peso corporal, a partir del día 4 después de inmunización.

La administración del péptido E (SEC ID NO:31) redujo significativamente el transcurso de tiempo y a severidad de la presentación clínica de AEA en los animales tratados ( $p < 0,01$ ) (FIG. 13).

25 En el presente documento se divulgan los siguientes puntos:

1. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de no más de 30 aminoácidos y que comprende el motivo de aminoácido:

(a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde n es 0-5;

(b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , donde n es 0-5; o

30 (c)  $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ , donde n es 0-5;

y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa, X es cualquier aminoácido, y  $L_1$  es un aminoácido polar;

y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

35 2. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de no más de 30 aminoácidos y que comprende el motivo de aminoácido:

(a)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde n es 0-1; o

(b)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , donde n es 0-1;

and donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  es un aminoácido con carga negativa,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva;

40 y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

3. Un polipéptido aislado que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene menos del 90% de identidad de secuencia con cualquier porción de SEC ID NO:1 que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho polipéptido; y

(ii) el motivo de aminoácido:

45 (a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde n es 0-5;

(b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , donde n es 0-5; o

(c)  $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ , donde n es 0-5;

y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa, X es cualquier aminoácido, y  $L_1$  es un aminoácido polar;

y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

4. Un polipéptido aislado que comprende:

5 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene menos del 90% de identidad de secuencia con cualquier porción de SEC ID NO:1 que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho polipéptido; y

(ii) el motivo de aminoácido:

(a)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde n es 0-1; o

(b)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , donde n es 0-1;

10 y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  es un aminoácido con carga negativa,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva;

y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

5. El polipéptido aislado del punto 1 o 3, donde la distancia entre  $N_1$  y  $N_2$  como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido está entre aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å.

15 6. El polipéptido aislado del punto 5, donde dicha distancia está entre aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å.

7. El polipéptido aislado del punto 6, donde dicha distancia está entre aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å.

8. El polipéptido aislado del punto 2 o 4, donde la distancia entre  $N_1$  y  $P_1$  como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido está entre aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å.

20 9. El polipéptido aislado del punto 8, donde dicha distancia está entre aproximadamente 4 Å a aproximadamente 5 Å.

10. El polipéptido aislado del punto 9, donde dicha distancia está entre aproximadamente 4,4 Å a aproximadamente 4,8 Å.

11. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de no más de 30 aminoácidos y que comprende el motivo de aminoácido:

25 (a)  $H_1N_1N_2H_2$ ;

(b)  $H_1N_1N_2L_1$ ; o

(c)  $L_1N_1N_2H_1$ ,

Que se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $N_2$  es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å, donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa, y  $L_1$  es un aminoácido polar;

30

Y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

12. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de no más de 30 aminoácidos y que comprende el motivo de aminoácido:

(a)  $H_1N_1(L)_nP_1H_2$ , donde n es 0-1; o

35 (b)  $H_1P_1(L)_nN_1H_2$ , donde n es 0-1;

que se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $P_2$  es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å, donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  es un aminoácido con carga negativa,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva;

40 y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.

13. Un polipéptido aislado que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene menos del 90% de identidad de secuencia con cualquier porción de SEC ID NO:1 que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho polipéptido; y

- (ii) el motivo de aminoácido:
- (a)  $H_1N_1N_2H_2$ ;
- (b)  $H_1N_1N_2L_1$ ; o
- (c)  $L_1N_1N_2H_1$ ,
- 5 que se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $N_2$  es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å, donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa, y  $L_1$  es un aminoácido polar;
- y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.
14. Un polipéptido aislado que comprende:
- 10 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene menos del 90% de identidad de secuencia con cualquier porción de SEC ID NO:1 que tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que dicho polipéptido; y
- (ii) el motivo de aminoácido:
- (a)  $H_1N_1(L)_nP_1H_2$ , donde n es 0-1; o
- (b)  $H_1P_1(L)_nN_1H_2$ , donde n es 0-1;
- 15 que se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $P_2$  está entre aproximadamente 3 Å y aproximadamente 5 Å, donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  es un aminoácido con carga negativa,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva;
- y donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula, tejido u órgano sensible.
- 20 15. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1, 3, y 5- 7, donde dicho motivo de aminoácido es (a) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son el mismo aminoácido hidrofóbico.
16. El polipéptido aislado del punto 11 o 13, donde dicho motivo de aminoácido es (a) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son el mismo aminoácido hidrofóbico.
- 25 17. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1, 3, y 5- 7, donde dicho motivo de aminoácido es (a) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos diferentes.
18. El polipéptido aislado del punto 11 o 13, donde dicho motivo de aminoácido es (a) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos diferentes.
19. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 2, 4, y 8-10, donde dicho motivo de aminoácido es (a) o (b) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son el mismo aminoácido hidrofóbico.
- 30 20. El polipéptido aislado del punto 12 o 14, donde dicho motivo de aminoácido es (a) o (b) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son el mismo aminoácido hidrofóbico.
21. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 2, 4, y 8-10, donde dicho motivo de aminoácido es (a) o (b) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos diferentes.
- 35 22. El polipéptido aislado del punto 12 o 14, donde dicho motivo de aminoácido es (a) o (b) y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos diferentes.
23. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1, 3, y 5-7, donde dicho motivo de aminoácido es (a), (b), o (c) y donde  $N_1$  y  $N_2$  son el mismo aminoácido con carga negativa.
24. El polipéptido aislado del punto 11 o 13, donde dicho motivo de aminoácido es (a), (b), o (c) y donde  $N_1$  y  $N_2$  son el mismo aminoácido con carga negativa.
- 40 25. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1,3, y 5-7, donde dicho motivo de aminoácido es (a), (b), o (c) y donde  $N_1$  y  $N_2$  son diferentes aminoácidos con carga negativa.
26. El polipéptido aislado del punto 11 o 13, donde dicho motivo de aminoácido es (a), (b), o (c) y donde  $N_1$  y  $N_2$  son diferentes aminoácidos con carga negativa.
- 45 27. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-26, donde dicho péptido se obtiene de una citoquina tipo 1.

28. El péptido aislado del punto 27, donde la citoquina tipo 1 es factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleuquina-3, Trombopoyetina, Factor Neurotrófico Ciliar o Factor Inhibidor de Leucemia.
29. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-28, donde dicho polipéptido además comprende al menos otro de los siguientes motivos de aminoácidos:
- 5 (a)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-H_2$ , donde n es 0-5;
- (b)  $H_1-N_1-(X)_n-N_2-L_1$ , donde n es 0-5;
- (c)  $L_1-N_1-(X)_n-N_2-H_1$ , donde n es 0-5
- (d)  $H_1-N_1-(L)_n-P_1-H_2$ , donde n es 0-1;
- (e)  $H_1-P_1-(L)_n-N_1-H_2$ , donde n es 0-1
- 10 (f)  $H_1N_1N_2H_2$ ;
- (g)  $H_1N_1N_2L_1$ ;
- (h)  $L_1N_1N_2H_1$
- (i)  $H_1N_1(L)_nP_1H_2$ , donde n es 0-1; o
- (j)  $H_1P_1(L)_nN_1H_2$ , donde n es 0-1;
- 15 donde el motivo (f), (g), o (h) se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $N_2$  es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å; donde el motivo (i) o (j) se forma como resultado de la estructura terciaria de dicho polipéptido de manera tal que la distancia entre los carbonos del carbonilo de  $N_1$  y  $P_2$  es aproximadamente 3 Å a aproximadamente 5 Å; y donde  $H_1$  y  $H_2$  son aminoácidos hidrofóbicos,  $N_1$  y  $N_2$  son aminoácidos con carga negativa, X es cualquier aminoácido,  $L_1$  es un aminoácido polar, y  $P_1$  es un aminoácido con carga positiva.
- 20 30. El polipéptido aislado del punto 29, donde al menos dos de dichos motivos de aminoácido son diferentes.
31. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-29, donde dicho polipéptido es péptido quimérico que además comprende una hélice anfipática peptídica.
- 25 32. El polipéptido aislado del punto 31, donde dicha hélice anfipática peptídica comprende la secuencia de aminoácidos ALSILVLLQAGS (SEC ID NO:48); VALLPCPPCRA (SEC ID NO:49); NAIKNAYKKG (SEC ID NO:50); GSWQRSLQDTE (SEC ID NO:51); GGSAARPAPP (SEC ID NO:52); NALAENDTPYY (SEC ID NO:53); GALAEAYPSKP (SEC ID NO:54); GCSSQHSYGL (SEC ID NO:55); VMIVMLAICFL, (SEC ID NO:56); LRRYINMLTRP (SEC ID NO:28); o LALSILVLYQA (SEC ID NO:57).
- 30 33. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-30, donde dicho polipéptido no incrementa la hemoglobina en el receptor.
34. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-31, donde la actividad protectora celular es proteger, mantener, potenciar o restaurar la función y/o viabilidad de dicha célula, tejido u órgano.
- 35 35. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-32, donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en células o tejidos neuronal, óseo, ocular, adiposo, conectivo, de cabello, de diente, mucosal, pancreático, endócrino, de oído, epitelial, cutáneo, muscular, cardíaco, pulmonar, de hígado, riñón, intestino, adrenal, capilar, endotelial, testicular, ovárico, o endometrial.
36. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-32 donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en una célula madre.
- 40 37. El polipéptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-32, donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular en tejido excitable.
38. El péptido aislado del punto 35, donde dicho tejido excitable es tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, tejido cardíaco o tejido retinal.
39. El péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-36, donde dicho péptido es capaz de atravesar una barrera de células endoteliales.
- 45 40. El péptido aislado del punto 37, donde la barrera de células endoteliales comprende la barrera hemato-cerebral, la barrera hemato-ocular, la barrera hemato-testicular, la barrera hemato-ovárica, barrera hemato-nerviosa o hemato- cordón espinal.

41. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de cualquiera de los puntos 1-38 y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
42. La composición farmacéutica del punto 39, donde dicha composición es formulada para la administración oral, intranasal, ocular, por inhalación, transdérmica, rectal, sublingual o parenteral.
- 5 43. La composición farmacéutica del punto 39, donde dicha composición es formulada como una solución de perfusión.
44. Un procedimiento para proteger, mantener o potenciar la viabilidad de una célula, tejido u órgano sensible aislado de un cuerpo de mamífero que comprende exponer dicha célula, tejido u órgano a una composición farmacéutica que comprende exponer dicha célula, tejido u órgano a la composición farmacéutica del punto 39, 40, o  
10 41.
45. Uso de un péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38 para la preparación de una composición farmacéutica para la protección contra y/o prevención de una lesión tisular, para la restauración de, o para el rejuvenecimiento de tejido y/o función del tejido en un sujeto que lo necesita.
46. Uso de un péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico en un sujeto que lo necesita de 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 trastornos del sistema nervioso central o periférico.
- 15 47. El uso del punto 43 o 44 donde el sujeto es un mamífero.
48. El uso del punto 45 donde el mamífero es un ser humano.
49. Un procedimiento para facilitar la transcitosis de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un sujeto que lo necesita que comprende la administración a dicho sujeto una composición que comprende dicha molécula en asociación con un péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38.
- 20 50. El procedimiento del punto 47, donde dicha asociación es un enlace covalente lábil, un enlace covalente estable, o una asociación no covalente con un sitio de unión para dicha molécula.
51. Un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38.
52. Un vector que comprende el ácido nucleico del punto 49.
- 30 53. El vector del punto 50 que es un vector de expresión.
54. Una célula huésped que contiene el vector de expresión del punto 51.
55. Un procedimiento para producir en forma recombinante el péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38, comprendiendo dicho procedimiento i) cultivar en un medio la célula huésped del punto 54, en condiciones apropiadas para la expresión de dicho péptido, y ii) recuperar y aislar dicho péptido de dicho medio.
- 35 56. El péptido aislado del punto 2, donde dicho péptido comprende la secuencia de aminoácidos péptido A (APPRLICDSRVLNRYLLEAKEAE, SEC ID NO:32), péptido C (NITVPDTKVNIFYAWKRMEVG, SEC ID NO:29), péptido D (QQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLV, SEC ID NO:30), péptido E (GCAEHCSLNENITVPDTKVN, SEC ID NO:31), péptido F (RYLLUNITTGC, SEC ID NO:33), péptido G (QEQLERALNSS, SEC ID NO:40), péptido I (CSLNENIQEQLERALNSS, SEC ID NO:43), péptido J (QEQLERALNSSLRRYINMLTRTR, SEC ID NO:41), péptido  
40 K (WEHVNAIQEARLL, SEC ID NO:35), o péptido L (KMSDLTALTESYVKH, SEC ID NO:37).
57. El péptido aislado de uno cualquiera de los puntos 1-38, donde dicha al menos una actividad protectora celular es neuroprotección, cuya actividad es evaluada *in vitro* mediante un procedimiento que comprende:
- (a) contactar un cultivo de ensayo de las neuronas primarias del hipocampo con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y
- 45 (b) determinar la viabilidad celular 48 horas posteriores a dicho contacto, de manera tal que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que aquella de un cultivo de control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Araim Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Péptidos protectores de tejido y usos de los mismos
- <130> J101763PCEPT1T1
- 10 <150> 60/705,741  
<151> 05-08-2005
- <150> 60/706,276  
<151> 08-08-2005
- 15 <150> 60/831,737  
<151> 18-07-2006
- <160> 58
- 20 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- <210> 1  
<211> 165
- 25 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Péptido de la eritropoyetina
- 30 <400> 1  
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
1 5 10 15  
Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
20 25 30  
Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
35 40 45  
Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
50 55 60  
Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
65 70 75 80  
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
85 90 95  
Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
100 105 110  
Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
115 120 125  
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
130 135 140  
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
145 150 155 160  
Cys Arg Thr Gly Asp  
165
- <210> 2
- 35 <211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- <220>
- 40 <223> Aminoácidos 44-49 de la EPO asociados con un sitio 1 de unión al receptor de alta afinidad
- <400> 2  
Thr Lys Val Asn Phe Tyr  
1 5
- 45 <210> 3  
<211> 6

- <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Aminoácidos 146-151 de la EPO asociados con un sitio 1 de unión al receptor de alta afinidad
- 5
- <400> 3  
**Ser Asn Phe Leu Arg Gly**  
 1 5
- <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 10
- <220>  
 <223> Aminoácidos 11-15 de la EPO que interactúan con un sitio 2 de unión al receptor de baja afinidad
- 15
- <400> 4  
**Val Leu Glu Arg Tyr**  
 1 5
- 20
- <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 25
- <220>  
 <223> Aminoácidos 100-104 de la EPO que interactúan con un sitio 2 de unión al receptor de baja afinidad
- 30
- <400> 5  
**Ser Gly Leu Arg Ser**  
 1 5
- <210> 6  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 35
- <220>  
 <223> Polipéptidos aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácidos
- 40
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1,4  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)
- 45
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2,3  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- 50
- <400> 6  
**Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1
- <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 55
- <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- 60
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1,5

- <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)
- <220>  
<221> VARIANTE  
5 <222> 2, 4  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
<221> VARIANTE  
10 <222> 3  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <400> 7  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5  
15
- <210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
20
- <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
25 <221> VARIANTE  
<222> 1, 6  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)
- <220>  
30 <221> VARIANTE  
<222> 2,5  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
35 <221> VARIANTE  
<222> 3,4  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- <400> 8  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5  
40
- <210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
45
- <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
50 <221> VARIANTE  
<222> 1, 7  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)
- <220>  
55 <221> VARIANTE  
<222> 2,6  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
60 <221> VARIANTE  
<222> 3,4,5  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)

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

5 <210> 10  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1,8  
 15 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 7  
 20 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4,5,6  
 25 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)

<400> 10  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 30 1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1, 9  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 8  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4,5,6,7  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)

55 <400> 11  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5

60 <210> 12  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

- <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> 2, 3  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 15 <222> 4  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <400> 12  
**Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 20 1
- <210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25
- <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 30 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 35 <222> 2,4  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 40 <222> 3  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 45 <222> 5  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <400> 13  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 50 1 5
- <210> 14  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55
- <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 60 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo

- 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2,5  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- 10  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- 15  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 6  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- 20  
 <400> 14  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- 25  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- 35  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 6  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- 40  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4,5  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- 45  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 7  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- 50  
 <400> 15  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- 55  
 <210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 60  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- 65  
 <220>

- <221> VARIANTE  
 <222> 2, 7  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- 5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4,5,6  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 8  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- 15 <400> 16  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- <210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- 30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2, 8  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- 35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3,4,5,6,7  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- 40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- 45 <400> 17  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- 50 <210> 18  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 55 <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- 60 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2,3

- <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
<221> VARIANTE  
5 <222> 4  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <400> 18  
**Xaa Xaa Xaa Xaa**  
1  
10
- <210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
15
- <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
20 <221> VARIANTE  
<222> 1  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <220>  
25 <221> VARIANTE  
<222> 2,4  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
30 <221> VARIANTE  
<222> 3  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <220>  
35 <221> VARIANTE  
<222> 5  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo  
<400> 19  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
1 5  
40
- <210> 20  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
45
- <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
50 <221> VARIANTE  
<222> 1  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido polar  
<220>
- <221> VARIANTE  
55 <222> 2, 5  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
60 <221> VARIANTE  
<222> 3,4  
<223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- <220>  
<221> VARIANTE



- <400> 22  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- 5 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
 <221> VARIANTE
- 15 <222> 1  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <220>  
 <221> VARIANTE
- 20 <222> 2,8  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente (iguales o diferentes)
- <220>  
 <221> VARIANTE
- 25 <222> 3,4,5,6,7  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido (iguales o diferentes)
- <220>  
 <221> VARIANTE
- 30 <222> 9  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <400> 23  
**Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1 5
- 35 <210> 24  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- 45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 1,4  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo (iguales o diferentes)
- <220>
- 50 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente
- <220>
- 55 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado positivamente
- <400> 24  
**Xaa Xaa Xaa Xaa**  
 1
- 60 <210> 25  
 <211> 5

- <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 1,5  
10 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2  
15 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 3  
20 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 4  
25 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado positivamente
- <400> 25  
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5
- 30 <210> 26  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 1,4  
40 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2  
45 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado positivamente
- <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 3  
50 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente
- <400> 26  
Xaa Xaa Xaa Xaa  
1
- 55 <210> 27  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>  
<223> Variante de polipéptidos de la EPO aislados que comprenden el motivo A estructural de aminoácido
- <220>

- <221> VARIANTE  
 <222> 1,5  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido hidrófobo
- 5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 2  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado positivamente
- 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 3  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido polar
- 15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 4  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido cargado negativamente
- 20 <400> 27  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5
- <210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Hélice anfipática de polipéptido pancreático
- 30 <400> 28  
 Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro  
 1 5 10
- <210> 29  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Péptido C - bucle AB y porción N-terminal de hélice B correspondiente a los aminoácidos 38-57 de la EPO
- <400> 29  
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Met Glu Val Gly  
 20
- 45 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
 <223> Péptido D - la porción C-terminal de la hélice B correspondiente a los aminoácidos 58-82 de la EPO
- <400> 30  
 Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val  
 20 25
- 55 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido E - una porción del bucle A-B que consiste en un pequeño bucle de cisteína y una hoja plegada beta que corresponde a los aminoácidos 28-47 de la EPO

5  
 <400> 31  
 Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Val Asn  
 20

10  
 <210> 32  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15  
 <220>  
 <223> Péptido A - consiste en la porción N-terminal de la hélice A correspondiente a los aminoácidos 1-23 de la EPO

<400> 32  
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu  
 20

20  
 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25  
 <220>  
 <223> Péptido F - consiste en los aminoácidos 14-19 de la EPO

30  
 <400> 33  
 Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys  
 1 5 10 15

35  
 <210> 34  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40  
 <220>  
 <223> Péptido B - consiste en los aminoácidos 24-37 de la EPO

40  
 <400> 34  
 Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
 1 5 10

45  
 <210> 35  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50  
 <220>  
 <223> fragmento de la hélice A de GM-CSF

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

55  
 <210> 36  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> fragmento de la hélice A de TPO

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

<210> 37  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> fragmento de la hélice A de CNTF

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

<210> 38  
 <211> 17  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> fragmento de la hélice B de LIF

25 <400> 38  
 Gly Thr Glu Lys Ala Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu

<210> 39  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> fragmento de la hélice A de Interleucina 3 (IL-3)

35 <400> 39  
 Ser Ile Met Ile Asp Glu Ile Ile His His Leu Lys Arg Pro Pro Asn  
 1 5 10 15  
 Pro Leu

40 <210> 40  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido G - Todos los aminoácidos dispuestos hacia el exterior de la hélice B de la EPO

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

50 <210> 41  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Péptido J - Un péptido quimera del Péptido G unido a la hélice del polipéptido pancreático

<400> 41

ES 2 653 864 T3

Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn Ser Ser Leu Arg Arg Tyr Ile  
 1 5 10 15  
 Asn Met Leu Thr Arg Thr Arg  
 20

<210> 42  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Hoja plegada en beta encontrada dentro del bucle AB en la EPO

10 <400> 42  
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile  
 1 5

15 <210> 43  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Péptido I - Un péptido quimera que une los aminoácidos dispuestos hacia el exterior de la hélice B a la hoja plegada en beta encontrada dentro del bucle AB de la EPO

<400> 43  
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Gln Glu Gln Leu Glu Arg Ala Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Ser

25 <210> 44  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Porción terminal de hélice C correspondiente a los aminoácidos 111, 112, 113, 116, y 118 de la EPO

35 <400> 44  
 Ala Leu Gly Lys Ala  
 1 5

40 <210> 45  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Parte CD del bucle que corresponde a los aminoácidos 112-133 de la EPO

45 <400> 45  
 Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
 20

50 <210> 46  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> fragmento de aminoácido del Péptido F

55 <400> 46  
 Glu Ala Lys Glu

1

5 <210> 47  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Péptido H - consiste en los aminoácidos 61, 72, 75, 76, 77 de la EPO

<400> 47  
**Ser Glu Leu Arg Gly Gln**  
 1 5

15 <210> 48  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Calcitonina

<400> 48  
**Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser**  
 1 5 10

25 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Hormona liberadora de la corticotrofina

<400> 49  
**Val Ala Leu Leu Pro Cys Pro Pro Cys Arg Ala**  
 1 5 10

35 <210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Beta Endorfina

45 <400> 50  
**Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly**  
 1 5 10

50 <210> 51  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <223> Glucagón

<400> 51  
**Gly Ser Trp Gln Arg Ser Leu Gln Asp Thr Glu**  
 1 5 10

60 <210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secretina

5 <400> 52  
Gly Gly Ser Ala Ala Arg Pro Ala Pro Pro  
1 5 10

10 <210> 53  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> VIP

<400> 53  
Asn Ala Leu Ala Glu Asn Asp Thr Pro Tyr Tyr  
1 5 10

20 <210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> NP-Y

<400> 54  
Gly Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys Pro  
1 5 10

30 <210> 55  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> GNRH

<400> 55  
Gly Cys Ser Ser Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu  
1 5 10

40 <210> 56  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Hormona Paratiroidea

50 <400> 56  
Val Met Ile Val Met Leu Ala Ile Cys Phe Leu  
1 5 10

55 <210> 57  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

60 <220>  
<223> CGRP

<400> 57



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que consiste en no más de 15 residuos de aminoácidos y comprendiendo dicho polipéptido la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO: 35), donde dicho polipéptido tiene actividad protectora celular.
- en el que la actividad protectora celular se determina in vivo en un modelo animal de protección contra lesión del nervio ciático, o en el que la actividad protectora celular comprende neuroprotección, que se determina in vitro mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
- 10 (a) poner en contacto un cultivo de prueba de neuronas de hipocampo primarias con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y
- (b) determinar la viabilidad celular a las 48 horas después de dicho contacto, de manera que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que la de un cultivo control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular
- 15 2. Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO: 35).
3. Un polipéptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos WEHVNAIQEARRLL (SEC ID NO: 35), donde un residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos es reemplazada con una sustitución de aminoácidos conservadora o no conservadora o un equivalente de aminoácido que tiene una modificación de la cadena lateral o una sustitución de la cadena lateral, cuando dicho polipéptido tiene actividad protectora celular.
- 20 en el que la actividad protectora celular se determina in vivo en un modelo animal de protección contra lesión del nervio ciático, o en el que la actividad protectora celular comprende neuroprotección, que se determina in vitro mediante un procedimiento que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto un cultivo de prueba de neuronas de hipocampo primarias con N-metil-D-aspartato y dicho péptido; y
- 25 (b) determinar la viabilidad celular a las 48 horas después de dicho contacto, de manera que si la viabilidad celular determinada en la etapa (b) es mayor que la de un cultivo de control en ausencia de dicho péptido, el péptido posee actividad protectora celular.
- 30 4. El polipéptido aislado de la reivindicación 3, en el que dicho residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza por una sustitución de aminoácidos conservadora o no conservadora.
5. El polipéptido aislado de la reivindicación 3, en el que dicho residuo de aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza por un aminoácido equivalente que tiene una modificación de la cadena lateral o una sustitución de la cadena lateral.
- 35 6. Un polipéptido aislado que es el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 modificado con una adición de polietilenglicol.
7. El polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicha actividad protectora celular está en tejido excitable seleccionado del grupo que consiste en tejido del sistema nervioso central y tejido del sistema nervioso periférico.
- 40 8. El polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho polipéptido es capaz de atravesar una barrera de células endoteliales seleccionada del grupo que consiste en la barrera hematoencefálica, la barrera de sangre-ojo, la barrera de sangre-testículos, la barrera de sangre-ovario, la barrera del sangre-nervio y la barrera de sangre-médula espinal.
- 45 9. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
- 50 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, donde dicha composición es formulada para la administración oral, intranasal, ocular, por inhalación, transdérmica, rectal, sublingual, o parenteral, o donde dicha composición es formulada como una solución de perfusión.
- 55 11. Un procedimiento *in vitro* para proteger, mantener, o potenciar la viabilidad de una célula neuronal, tejido u órgano sensible aislado de un cuerpo de mamífero que comprende exponer dicha célula neuronal, tejido u órgano in vitro a un polipéptido aislado de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 9-10.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde el cuerpo de mamífero es un cuerpo humano.

13. Un polipéptido aislado de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un procedimiento para prevención, tratamiento terapéutico o tratamiento profiláctico de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central o periférico en un sujeto que lo necesita.
14. El polipéptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde el sujeto es un ser humano.
- 5 15. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
16. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.
17. El vector de la reivindicación 16 en donde el vector es un vector de expresión.
18. Una célula huésped que contiene el vector de expresión de la reivindicación 17.
- 10 19. Un procedimiento para producir en forma recombinante un polipéptido aislado que comprende (a) cultivar en un medio la célula huésped de la reivindicación 18, en condiciones apropiadas para la expresión de dicho polipéptido, y (b) recuperar y aislar dicho polipéptido de dicho medio.

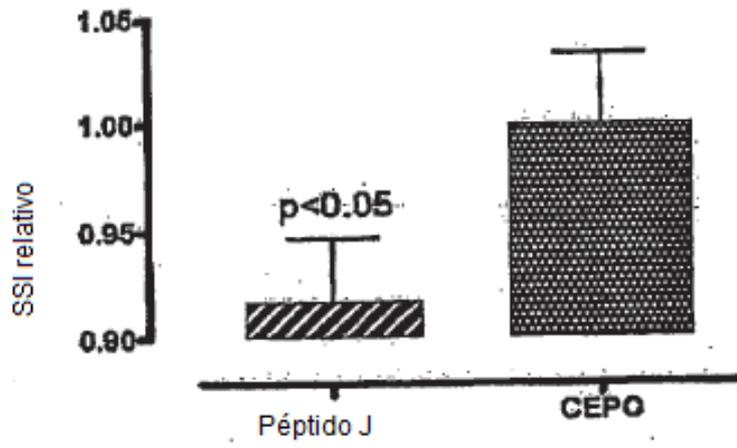


FIG. 1

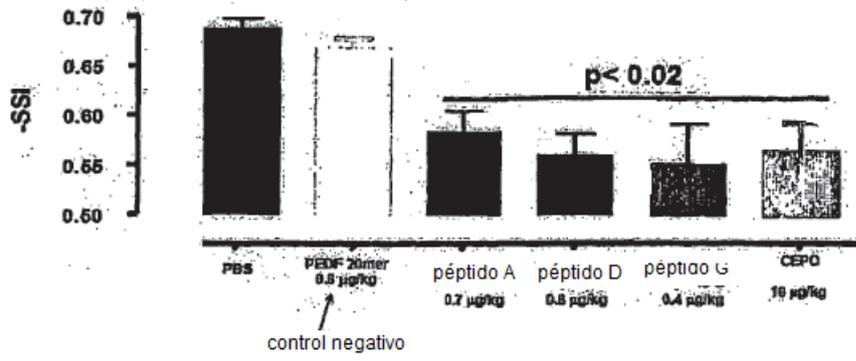


FIG. 2

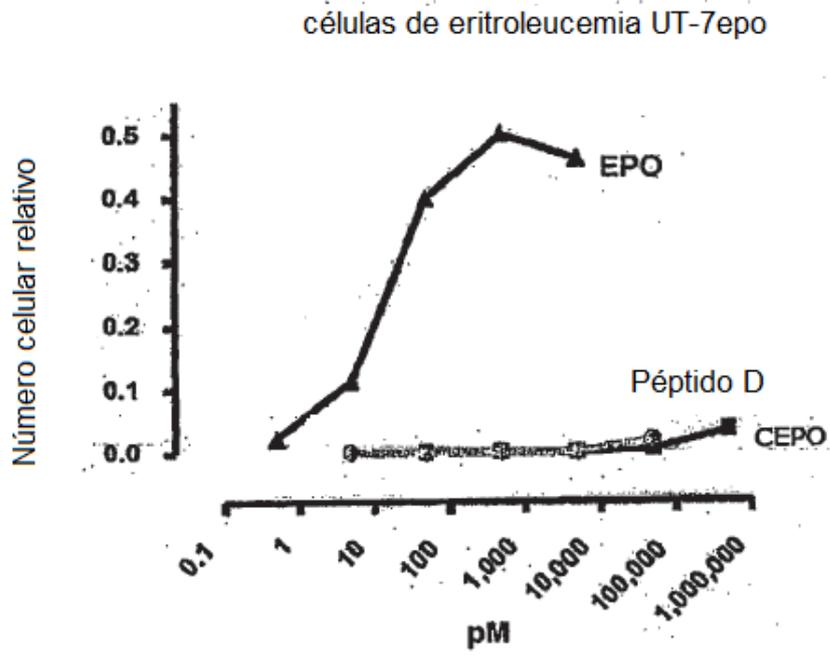


FIG. 3

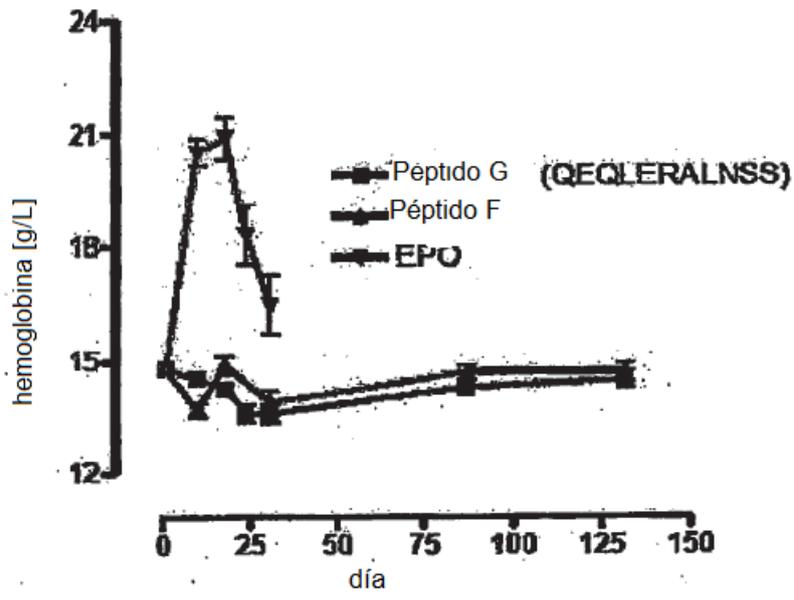


FIG. 4

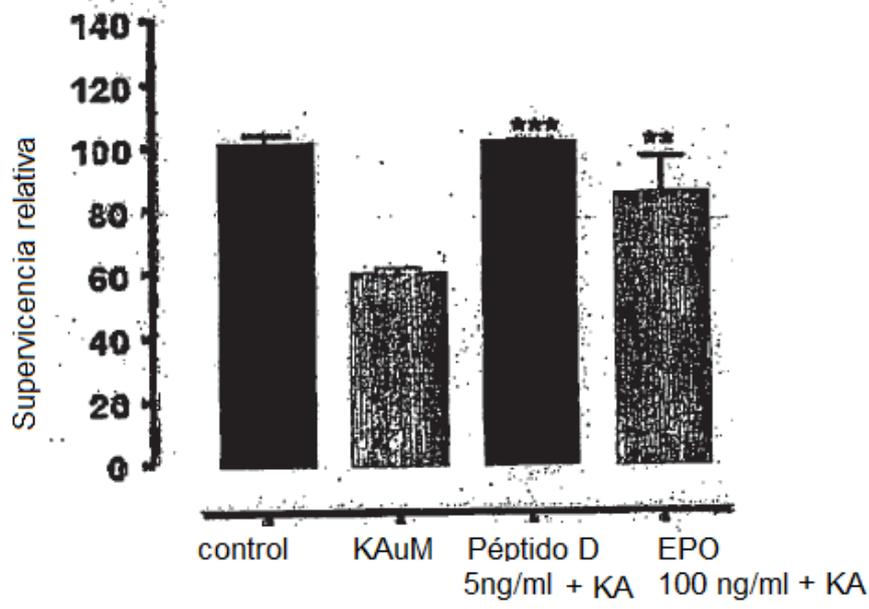


FIG. 5

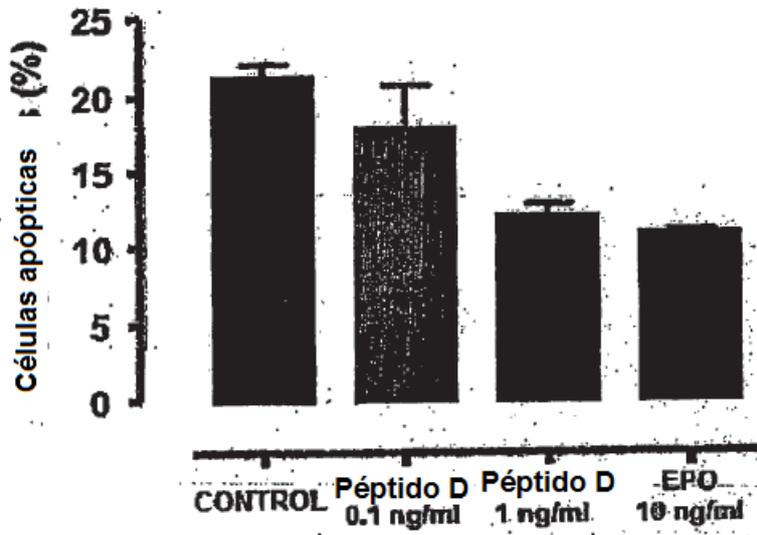


FIG. 6

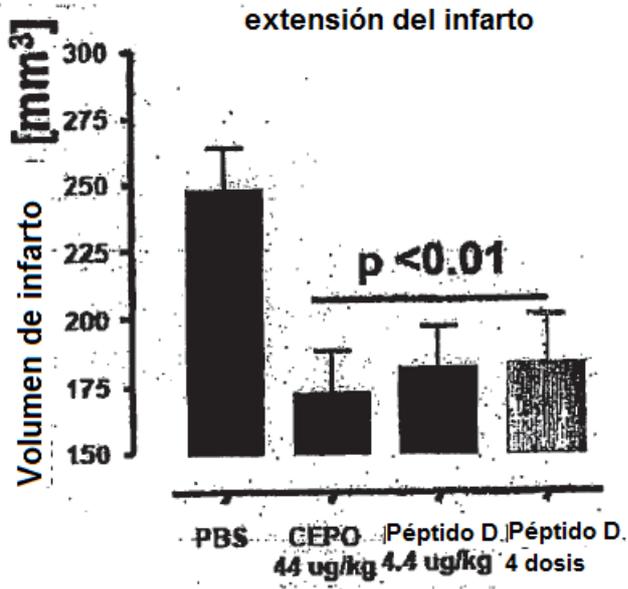


FIG. 7A

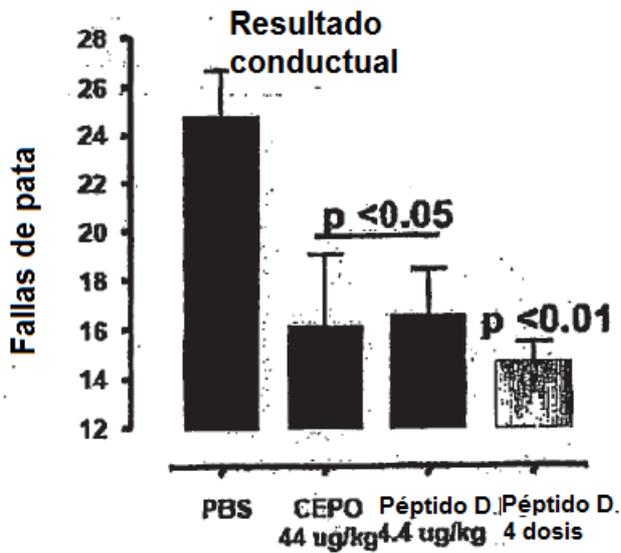


FIG. 7B

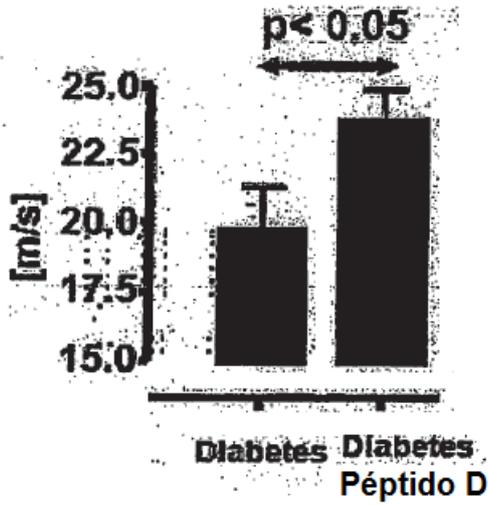


FIG. 8A

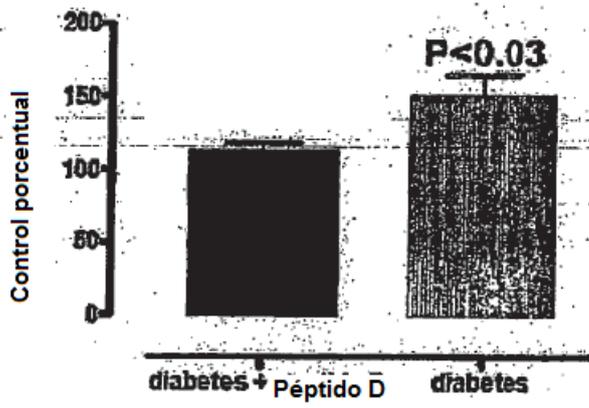


FIG. 8B

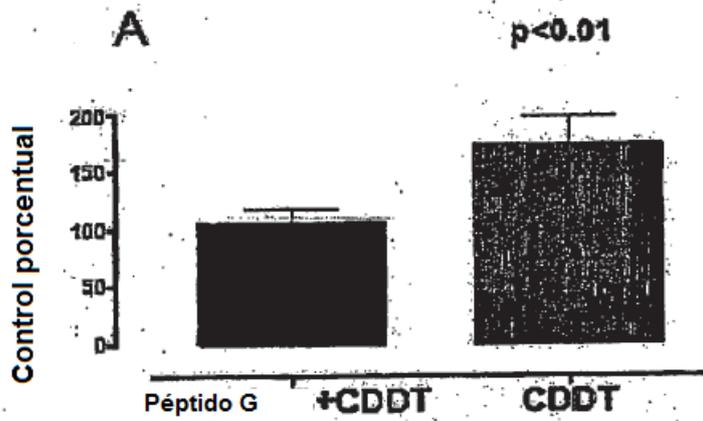


FIG. 9A

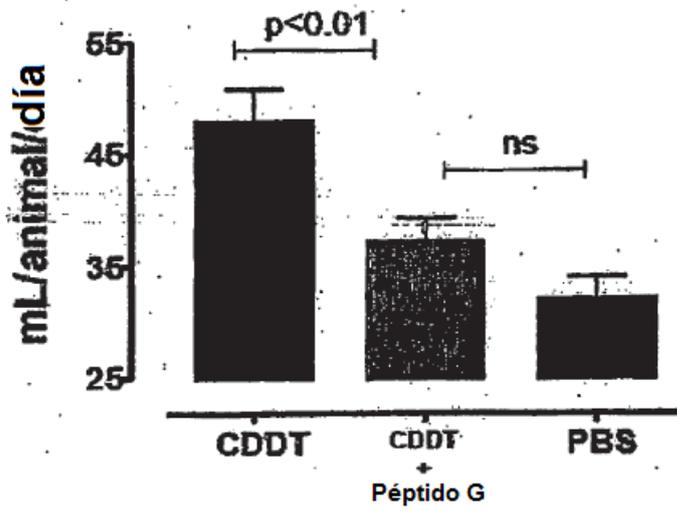


FIG. 9B

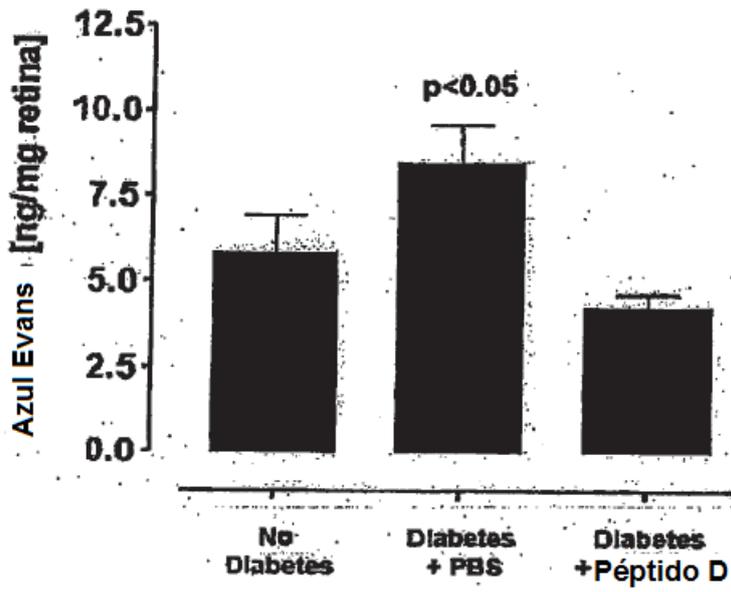


FIG. 10

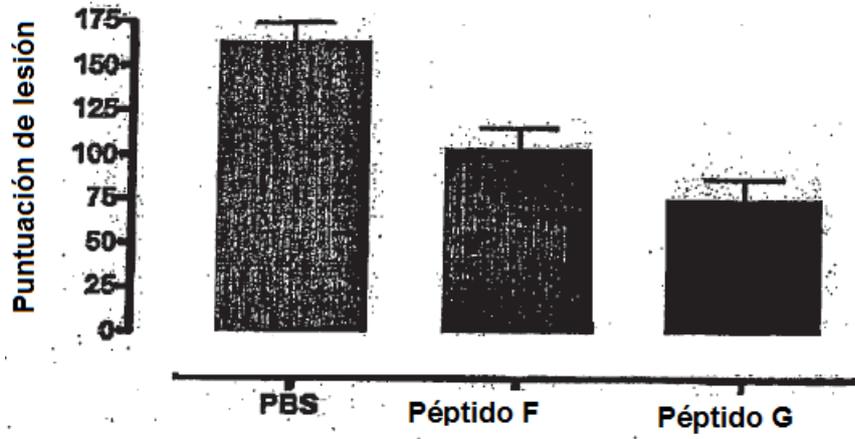
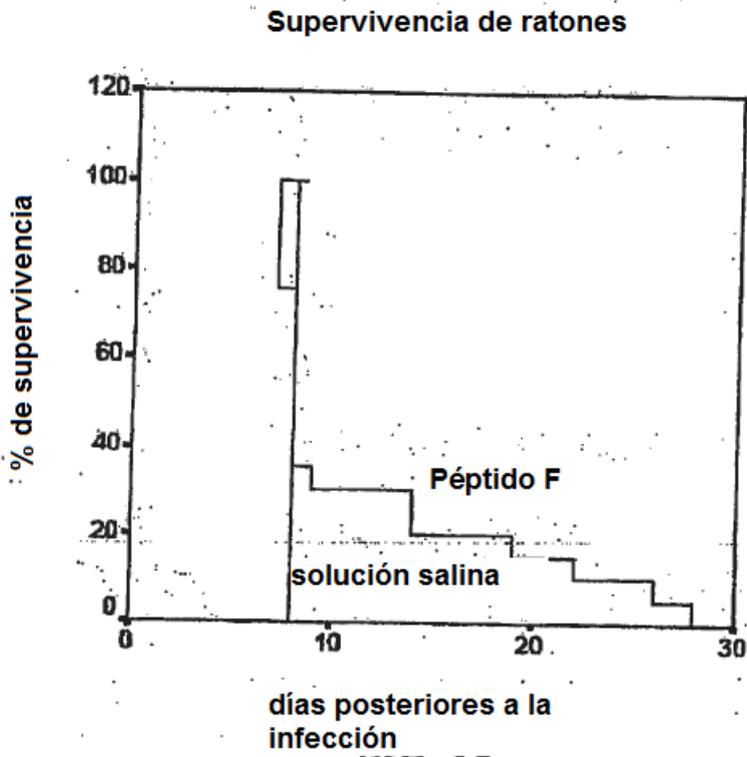


FIG. 11



**FIG. 12.**

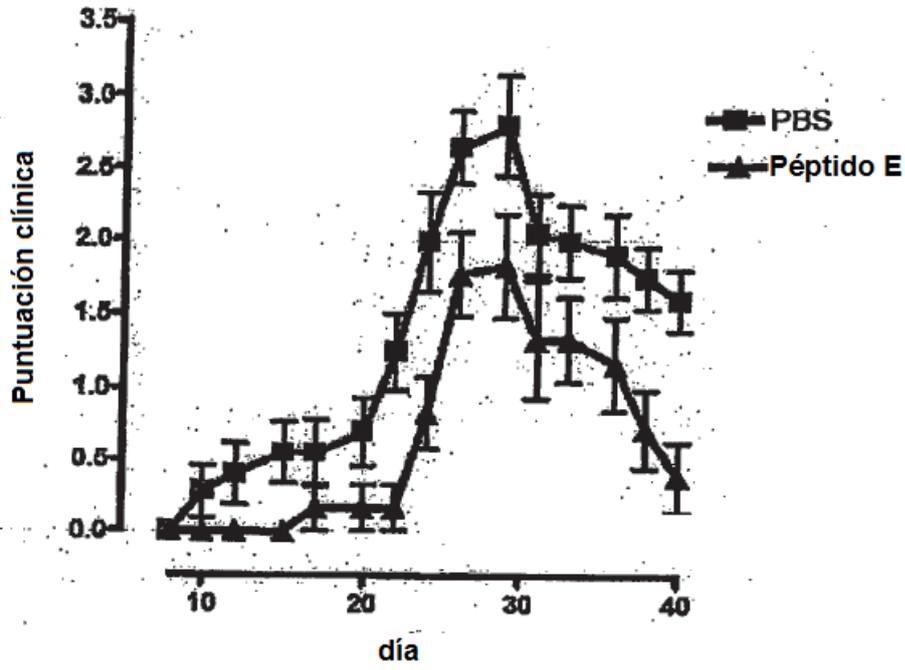


FIG. 13