

Область техники

Настоящее изобретение относится к пептидным соединениям, которые являются агонистами рецептора к эритропоэтину (ЕРО-Р, ЭПО-рецептора). Данное изобретение также относится к терапевтическим способам, в которых такие пептидные соединения применяют для лечения нарушений, ассоциированных с недостаточной или дефицитной продукцией эритроцитов. Также предусмотрены фармацевтические составы, которые содержат пептидные соединения согласно данному изобретению.

Уровень техники

Эритропоэтин (ЭПО) представляет собой гормон гликопротеиновой природы, состоящий из 165 аминокислот, с молекулярной массой примерно 34 килоДальтон (кДа) и предпочтительными сайтами гликозилирования в 24, 38, 83 и 126 положениях аминокислот. ЭПО первоначально синтезируется в виде белка-предшественника с сигнальным пептидом из 23 аминокислот. Эритропоэтин существует в трех формах: α -, β - и асиало-. Формы α - и β - слегка различны в своей углеводной части, но обладают одинаковой эффективностью, биологической активностью и молекулярной массой. Асиало-форма представляет собой α - или β -форму без конечного углевода (сиаловой кислоты). Последовательности ДНК, кодирующие эритропоэтин, были описаны ранее (Патент США US. Pat. № 4703008, выдан Lin).

ЭПО стимулирует митотическое деление и дифференцировку клеток-предшественников эритроцитов, что обеспечивает продукцию эритроцитов. Продукция ЭПО происходит в почках в условиях гипоксии. В ходе индуцируемой эритропоэтином дифференцировки клеток-предшественников эритроцитов происходит индукция синтеза глобина, стимуляция синтеза гемосодержащего комплекса и увеличение числа рецепторов к ферритину. Эти изменения позволяют клетке поглощать больше железа и синтезировать функционально активный гемоглобин, который связывает кислород в зрелых эритроцитах. Следовательно, эритроциты и их гемоглобин играют ключевую роль в снабжении организма кислородом. Эти изменения инициированы взаимодействием эритропоэтина с соответствующим рецептором на поверхности клеток-предшественников эритроцитов [См., например., Graber, Krantz (1978) *Ann. Rev. Med.* 29:51-66].

Если организм находится в здоровом состоянии, когда существующее число эритроцитов обеспечивает достаточную оксигенацию тканей, эритропоэтин присутствует в плазме в очень низких концентрациях. Эти нормальные низкие концентрации достаточны для стимуляции замещения эритроцитов, которые естественным образом погибают в результате старения.

Количество ЭПО в циркулирующей крови возрастает в условиях гипоксии, когда транспорт кислорода эритроцитами в циркулирующей крови снижен. Гипоксия может быть вызвана, например, значительной потерей крови вследствие кровотечения, разрушением эритроцитов при передозировке радиации, уменьшении количества вдыхаемого кислорода вследствие нахождения на большой высоте или продолжительного обморока, либо различными формами анемии. В ответ на гипоксический стресс повышение уровня ЭПО увеличивает продукцию эритроцитов путем стимуляции пролиферации эритроидных предшественников. Когда количество эритроцитов превышает количество, необходимое для удовлетворения нормальной потребности тканей в кислороде, происходит снижение уровня ЭПО в циркулирующей крови.

Поскольку ЭПО необходим для образования эритроцитов, существуют потенциально полезные применения этого гормона как в диагностике, так и в лечении болезней крови, характеризующихся низкой, либо дефицитной (недостаточной) продукцией эритроцитов. Недавние исследования обеспечили основу для планирования эффективного терапевтического применения ЭПО в лечении разнообразных болезненных состояний, нарушений и состояний с гематологическими расстройствами, включая бета-талассемию [См. Vedovato et al. (1984) *Acta. Haematol.* 71:211-213], кистозный фиброз (муковисцидоз) [См. Vichinsky et al. (1984) *J. Pediatric* 105:15-21], нарушения менструального цикла и беременности [См. Cotes et al. (193) *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* 90:304-311], анемию недоношенных детей [См. Haga et al. (1983) *Acta Paediatr. Scand.* 72; 827-831], повреждение спинного мозга [См. Claus-Walker et al. (1984) *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 65:370-374], космический полет [См. Dunn et al. (1984) *Eur. J. Appl. Physiol.* 52:178-182], острую потерю крови [См., Miller et al. (1982) *Brit. J. Haematol.* 52:545-590], старение [См. Udupa et al. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* 103:574-580 и 581-588, а также Lipschitz et al. (1983) *Blood* 63:502-509], различные опухолевые заболевания, сопровождающиеся нарушенным эритропоэзом [См. Dainiak et al. (1983) *Cancer* 5:1101-1106, а также Schwartz et al. (1983) *Otolaryngol.* 109:269-272], а также почечную недостаточность [См. Eschbach et al. (1987) *N. Eng. J. Med.* 316:73-78].

Был описан очищенный однородный ЭПО [Патент США U.S. Pat. № 4677195, Hewick]. Последовательность ДНК, кодирующая ЭПО, была очищена, клонирована и экспрессирована, в результате чего были получены рекомбинантные полипептиды, обладающие биохимическими иммунологическими свойствами природного ЭПО. Также была получена молекула рекомбинантного ЭПО с олигосахаридами, идентичными олигосахаридам природного ЭПО [См. Sasaki et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:12059-12076].

Оказалось, что биологическое действие ЭПО частично опосредовано взаимодействием с мембраносвязанным клеточным рецептором. Первоначальные исследования на незрелых эритроидных клетках, выделенных из селезенки мыши, позволили предположить, что связывающие ЭПО белки на поверхности

клетки содержат два полипептида, имеющие молекулярные массы, равные приблизительно 85000 Да и 100000 Да соответственно [Sawyer et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694]. Расчетное число сайтов связывания ЭПО составило в среднем от 800 до 1000 на поверхности одной клетки. Из этих сайтов связывания приблизительно 300 связывало ЭПО с K_d , равной приблизительно 90 пМ (пикомоль), в то время как остальные связывали ЭПО с пониженной аффинностью, равной приблизительно 570 пМ [Sawyer et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562]. Независимое исследование позволило предположить, что ЭПО-чувствительные эритробласты, полученные из селезенки мышей, которым путем инъекции вводили ослабленный штамм (FVA) вируса лейкоза Фрейда, обладают высоко- и низкоаффинными сайтами связывания ЭПО общим числом приблизительно 400, причем значения K_d составляют 10 и 800 пМ для высоко- и низкоаффинных сайтов соответственно [Landschulz et al. (1989) Blood 73:1476-1486].

Последующая работа показала, что единственный ген кодирует две формы рецептора к ЭПО (ЭПО-рецептора). Этот ген был клонирован [См., например, Jones et al. (1990) Blood 76, 31-35, Noguchi et al. (1991) Blood 78:2548-2556; Maouche et al. (1991) Blood 78:2557-2563]. Например, последовательности ДНК и кодируемые пептидные последовательности для белков ЭПО-рецептора мыши и человека описаны в публикации PCT номер WO 90/08822(D'Andrea et al.). Современные модели предполагают, что связывание ЭПО с ЭПО-рецептором приводит к димеризации и активации двух молекул ЭПО-рецептора, что приводит к ряду последовательных этапов передачи сигнала [См., например, Watowich et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144].

Доступность клонированных генов ЭПО-рецептора облегчает поиск агонистов и антагонистов этого важного рецептора. Доступность рекомбинантного белка рецептора позволяет изучать лиганд-рецепторные взаимодействия во множестве систем случайной и полупроизвольной генерации разнообразия белков. Эти системы включают систему «пептиды на плазидах» [описана в патенте США U.S. Pat. № 6270170], систему «пептиды на фаге» [описана в патенте США U.S. Pat. № 5432018 и Swirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382], систему «библиотека кодированных синтетических пептидов» [описана в заявке на Патент США U.S. № 946239, поданной 16 сентября 1992] и систему «синтез иммобилизованных полимеров в очень крупных масштабах» [описана в патенте США U.S. Pat. № 5143854, публикации PCT Pub. № 90/15070; Fodor et al. (1991) Science 251:767-773; Dower, Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180; и Патенте США U.S. Pat. № 5424186].

Были идентифицированы пептиды, которые, по меньшей мере, в некоторой степени взаимодействуют с ЭПО-рецептором. Эти белки описаны, например, в U.S. Pat. № 5773569 и 5830851, а также US 5986047 (Wrighton et al.); публикации PCT Pub. № WO 96/40749 (Wrighton et al.); Патенте США U.S. Pat. № 5767078 и публикации PCT Pub. № 96/40772 (Johnson и Zivin); публикации PCT Pub. № WO 01/38342 (Balu); и WO 01/91780 (Smith-Swintosky et al.). В частности, была идентифицирована группа содержащих пептидный мотив пептидов, члены которой связываются с ЭПО-рецепторами и стимулируют ЭПО-зависимую пролиферацию клеток. Однако идентифицированные до сих пор пептиды, которые содержат данный мотив, стимулируют ЭПО-зависимую пролиферацию клеток *in vitro* со значениями EC₅₀, равными от примерно 20 наномоль (нМ) до примерно 250 нМ. То есть для того, чтобы стимулировать 50% максимальной пролиферации, стимулируемой ЭПО, требуются концентрации пептида от 20 до 250 нМ.

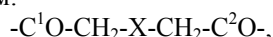
С учетом огромного потенциала агонистов ЭПО-рецепторов как для исследований важных биологических функций, опосредуемых этим рецептором, так и для лечения заболеваний, остается потребность в идентификации пептидов-агонистов ЭПО-рецепторов с повышенной эффективностью и активностью. Настоящее изобретение предусматривает такие соединения.

Цитирование и/или обсуждение цитируемых источников в этом разделе и во всей спецификации приведено просто для разъяснения описания настоящего изобретения и не является признанием того, что какая-либо из ссылок представляет собой прототип настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает новые пептидные соединения, которые являются агонистами ЭПО-рецепторов с существенно повышенной эффективностью и активностью. Эти пептидные соединения представляют собой гомодимеры из пептидных мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), или гомодимеры из пептидных мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), или гомодимеры из белковых мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (SEQ ID NO: 3), где каждая аминокислота обозначена стандартной однобуквенной аббревиатурой, «(AcG)» обозначает N-ацетилглицин, «(1-nal)» обозначает 1-нафтилаланин, а «(MeG)» обозначает N-метилглицин, известный также как саркозин. Каждый пептидный мономер пептидного димера содержит внутримолекулярную дисульфидную связь между остатками цистеина этого мономера.

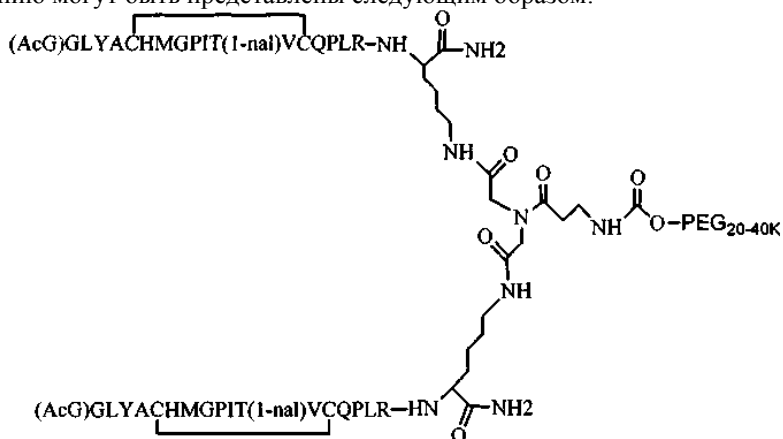
Пептидные мономеры могут быть димеризованы путем ковалентного присоединения к линкеру на основе разветвленного третичного амида (соединяющему фрагменту). Третичный амидный линкер может быть изображен следующим образом:



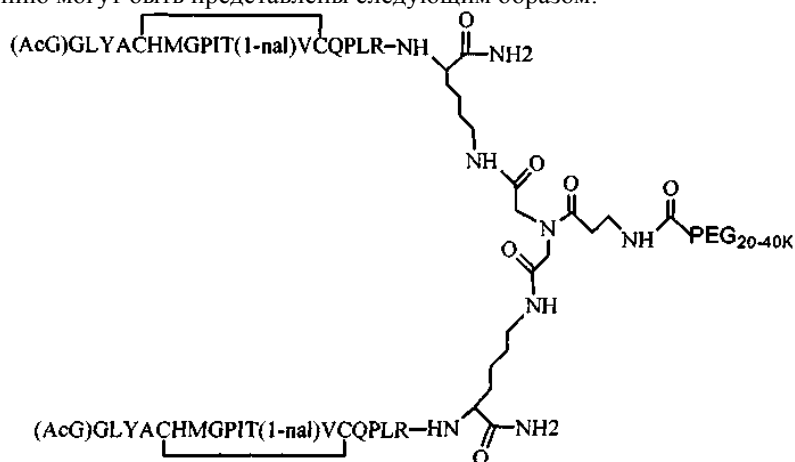
где X обозначает NCO-(CH₂)₂-N¹H-, C¹ линкера образует амидную связь с ε-аминогруппой C-концевого

остатка лизина первого пептидного мономера, C² линкера образует амидную связь с ε-аминогруппой C-концевого остатка лизина второго пептидного мономера, а N¹, входящий в X, присоединен карбаматной связью или амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), имеющему молекулярную массу от примерно 20000 до примерно 40000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанные молекулярные массы).

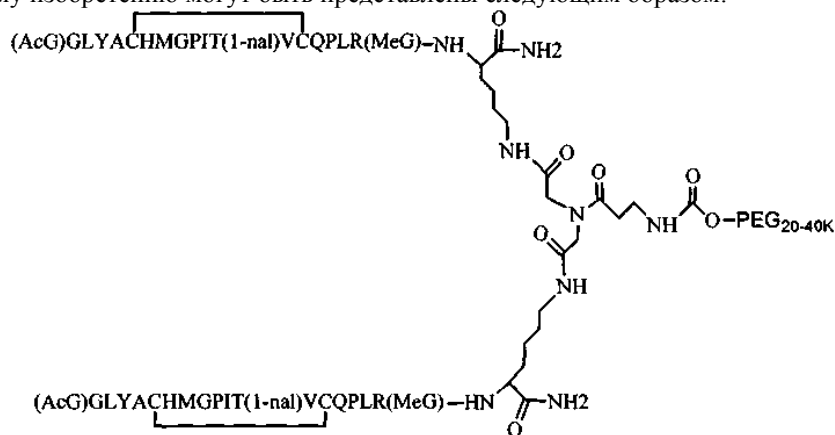
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ линкера присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



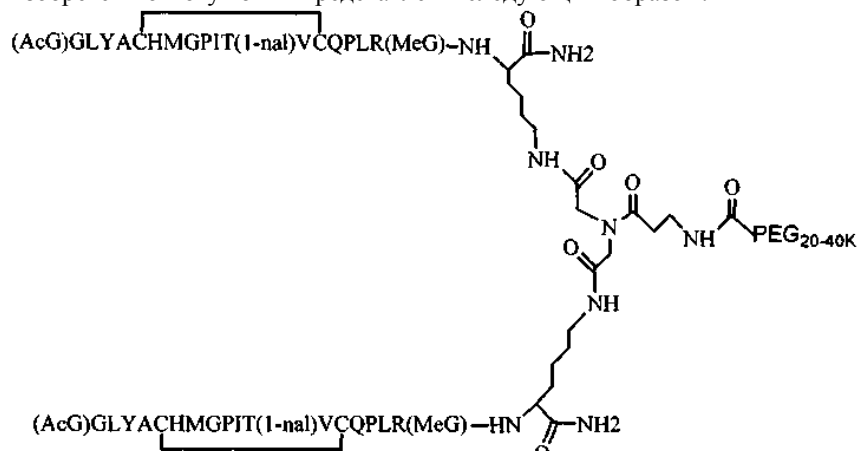
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ линкера присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



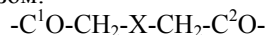
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ линкера присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



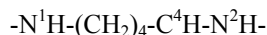
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ линкера присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



Пептидные мономеры могут также быть димеризованы путем ковалентного присоединения к разветвленному третичному амидному линкеру (соединяющему фрагменту). Третичный амидный линкер может быть изображен следующим образом:

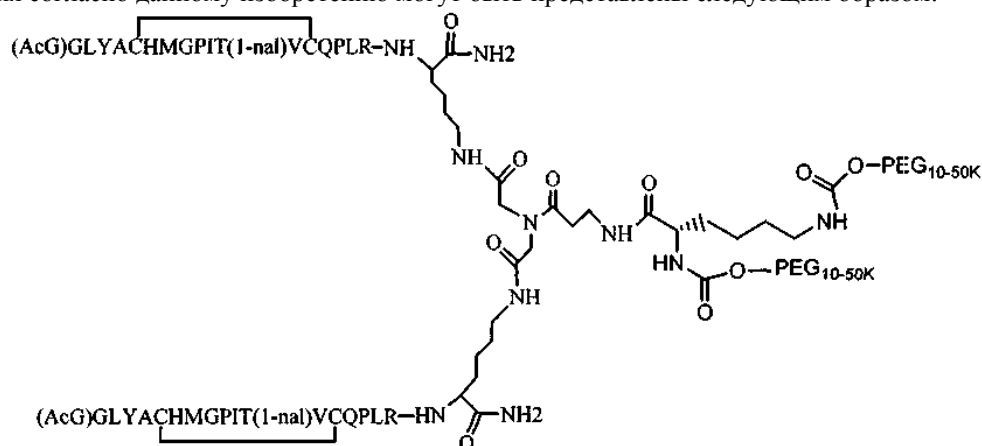


где X обозначает NCO-(CH₂)₂-NH-C³O-, C¹ линкера образует амидную связь с ε-аминогруппой C-концевого остатка лизина первого пептидного мономера, а C² линкера образует амидную связь с ε-аминогруппой C-концевого остатка лизина второго пептидного мономера. Пептидные димеры согласно данному изобретению также содержат спейсерный фрагмент (спейсер, разделяющий фрагмент) следующей структуры:

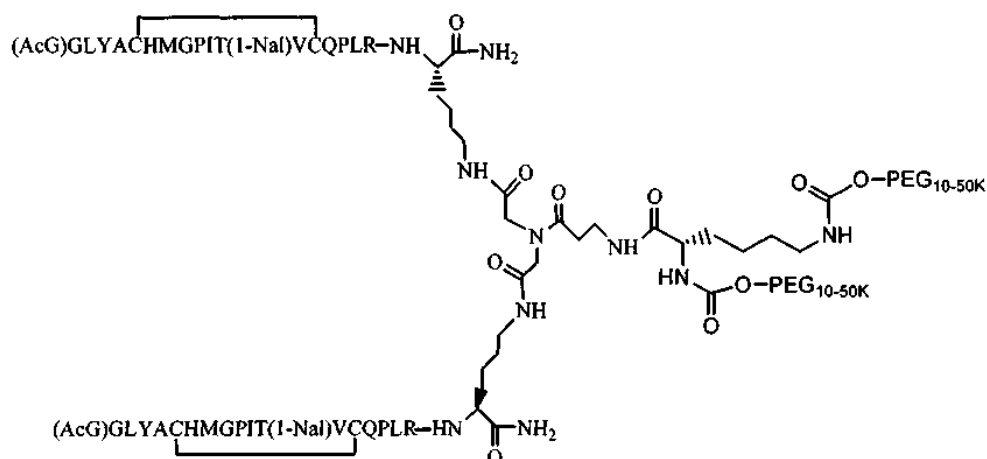


где C⁴ спейсера ковалентно связан с C³, входящим в X, а N¹ спейсера ковалентно присоединен карбаматной или амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), имеющему молекулярную массу от имеющему молекулярную массу от примерно 10000 до примерно 50000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса). Каждый фрагмент ПЭГ может, независимо от других, иметь массу 10000 Да (10 кДа), 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа или 50 кДа.

В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

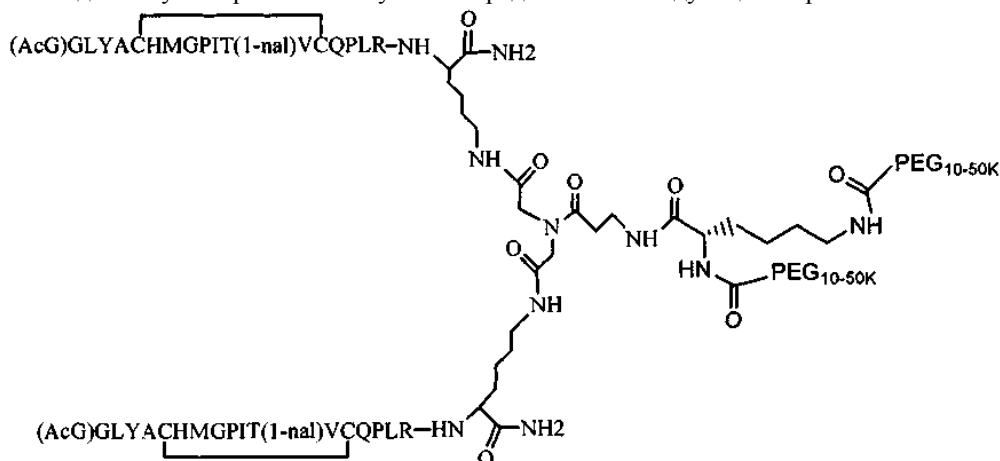


В предпочтительных способах реализации изобретения C-концевой лизин двух пептидных мономеров представляет собой L-лизин. Кроме того, специалисты в данной области по приведенным выше химическим структурам поймут, что два линейных фрагмента ПЭГ соединены через лизин (например, в форме mPEG₂-Lys-NHS или в форме mPEG₂-Lysinol-NPC), который также предпочтительно представляет собой L-лизин, что приводит к возникновению следующей стереохимической структуры:

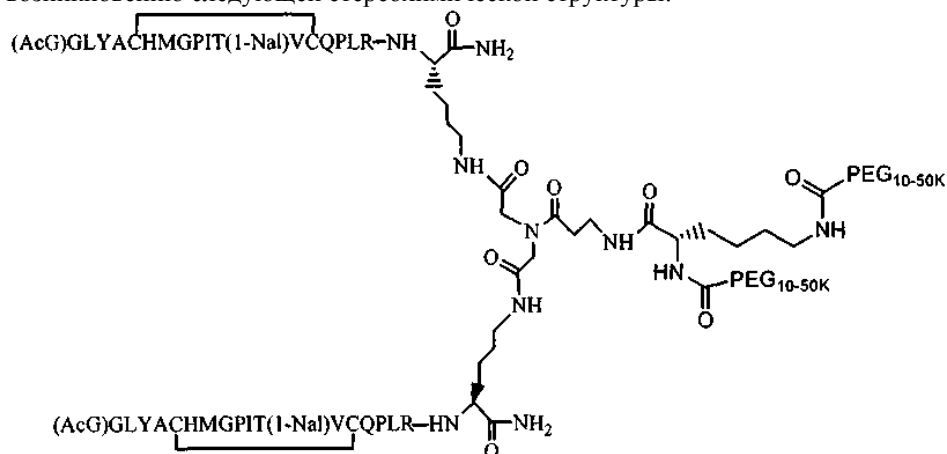


В качестве альтернативы, один или более остатков лизина могут представлять собой D-лизин, что, как хорошо понятно специалистам в данной области, приводит к возникновению альтернативных стереохимических структур.

В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

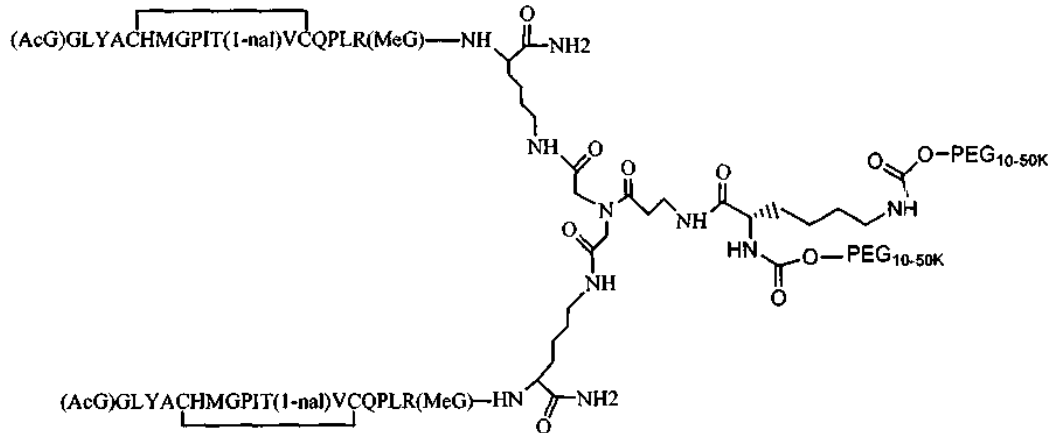


И снова, молекулы лизина в этом соединении представляют собой предпочтительно L-лизин, что приводит к возникновению следующей стереохимической структуры:

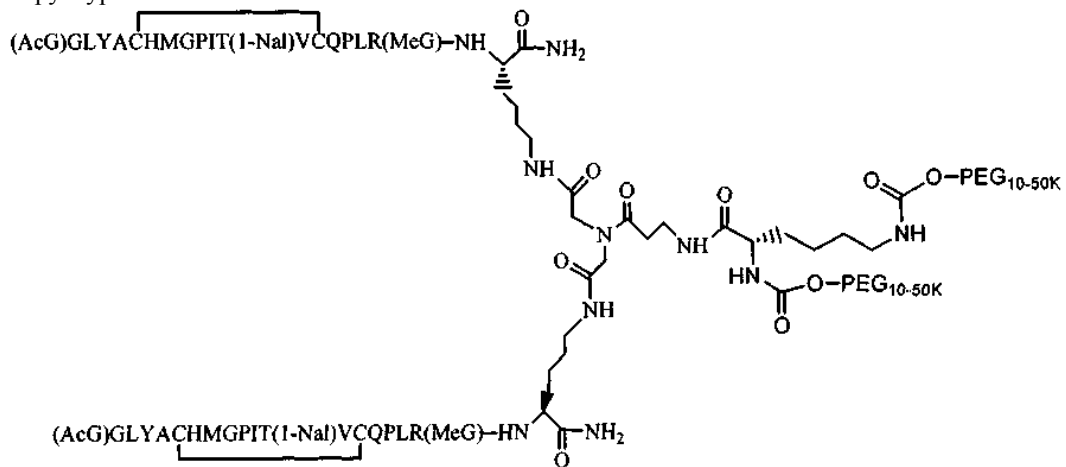


В качестве альтернативы, один или более остатков лизина могут представлять собой D-лизин, что, как хорошо понятно специалистам в данной области, приводит к возникновению альтернативных стереохимических структур.

В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), где Y обозначает карбаматную группу, новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

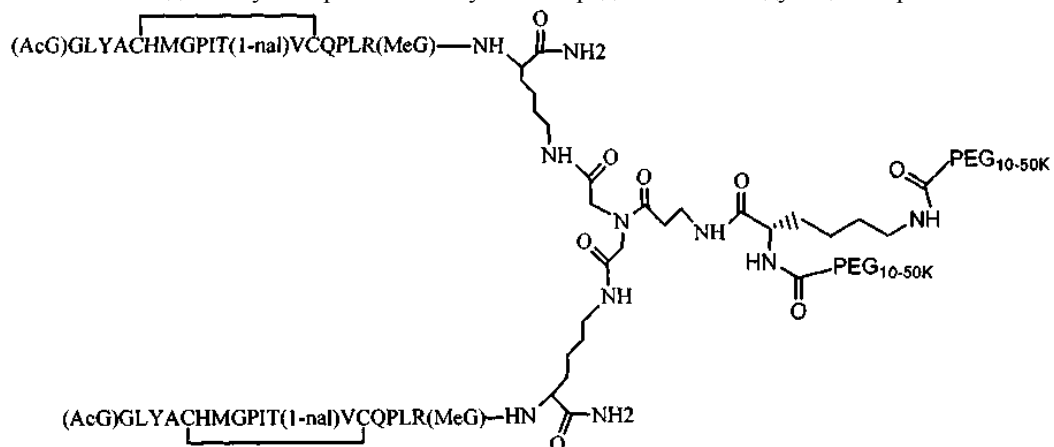


Остатки лизина, соединяющие пептидный мономер и линейные фрагменты ПЭГ в этой молекуле, предпочтительно представляют собой L-лизин, что приводит к возникновению следующей стереохимической структуры:

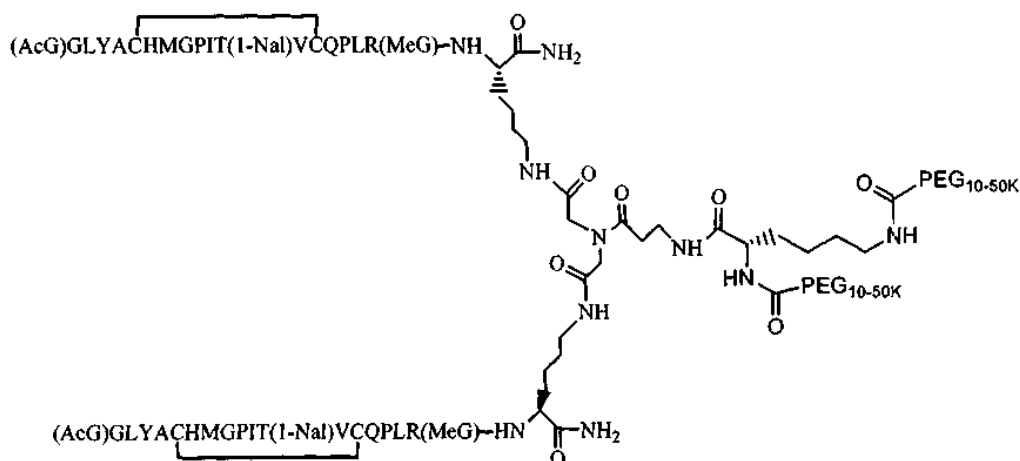


В качестве альтернативы, один или более остатков лизина могут представлять собой D-лизин, что, как хорошо понятно специалистам в данной области, приводит к возникновению альтернативных стереохимических структур.

В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот $(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K$ (SEQ ID NO: 2), а N^1 и N^2 спейсера ковалентно присоединены амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



Остатки лизина, соединяющие пептидный мономер и линейные фрагменты ПЭГ в этой молекуле, предпочтительно представляют собой L-лизин, что приводит к возникновению следующей стереохимической структуры:



В других способах реализации один или более остатков лизина могут представлять собой D-лизин, что, как хорошо понятно специалистам в данной области, приводит к возникновению альтернативных стереохимических структур.

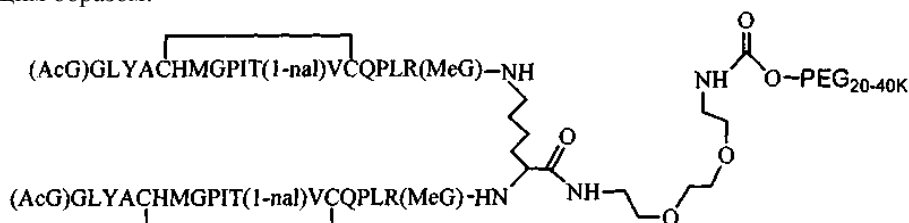
Пептидные мономеры могут также быть димеризованы путем присоединения к лизиновому линкеру (связывающему агенту). В этом случае один пептидный мономер присоединен своим С-концом к ϵ -аминогруппе лизина, а второй пептидный мономер присоединен своим С-концом к α -аминогруппе лизина.

Пептидные димеры согласно данному изобретению содержат также спейсерный фрагмент (спейсер) следующей структуры:

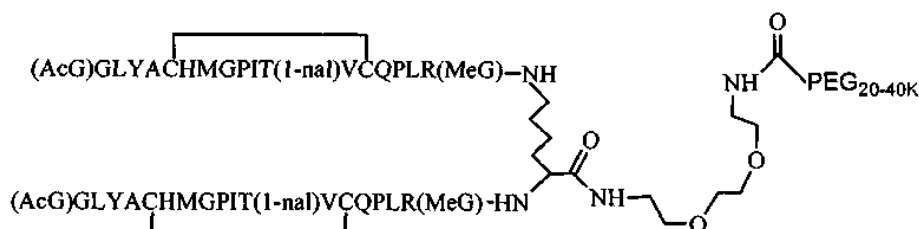


На одном конце N^1 спейсера присоединен амидной связью к углероду карбонильной группы лизинового линкера. На противоположном конце N^2 спейсера присоединен карбаматной связью или амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), имеющему молекулярную массу от примерно 20000 до примерно 40000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса). Каждый фрагмент ПЭГ может, независимо от других, иметь массу 10000 Да (10 кДа), 20 кДа, 30 кДа, 40 кДа или 50 кДа.

В случае, когда спейсер присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые пептидные соединения согласно данному изобретению можно представить следующим образом:



В случае, когда спейсер присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), новые белковые соединения согласно данному изобретению можно представить следующим образом:



Изобретение также предусматривает фармацевтические составы, состоящие из таких пептидных соединений, и способы лечения разнообразных медицинских состояний с применением таких пептидных соединений.

Подробное описание изобретения

Определения.

Названия остатков аминокислот в пептидах имеют следующие сокращения (аббревиатуры): Фенилаланин - Phe или F, Лейцин - Leu или L, Изолейцин - Ile или I, Метионин - Met или M, Валин - Val или V, Серин - Ser или S, Пролин - Pro или P, Треонин - Thr или T, Аланин - Ala или A, Тирозин - Tyr или Y, Гистидин - His или H, Глутамин - Gln или Q, Аспарагин - Asn или N, Лизин - Lys или K, Аспарагиновая кислота - Asp или D, Глутаминовая кислота - Glu или E, Цистеин - Cys или C, Триптофан - Trp или W, Аргинин - Arg или R, Глицин - Gly или G. Минорные аминокислоты в пептидах имеют следующие аббревиатуры: 1-нафтилаланин - 1-nal или Np, N-метилглицин (также известный как саркозин) - MeG или Sc, а ацетилированный глицин (N-ацетилглицин) - AcG.

Термин «полипептид» или «белок» обозначает здесь полимер, мономерами которого являются аминокислоты, которые представляют собой альфа-аминокислоты, соединенные между собой амидными связями. Длина полипептидов равна, следовательно, по меньшей мере двум остаткам аминокислот, а обычно полипептиды длиннее. Обычно термин «пептид» обозначает полипептид, длина которого составляет всего несколько остатков аминокислот. Длина новых пептидов - агонистов ЭПО-рецептора согласно настоящему изобретению составляет предпочтительно не больше, чем примерно 50 остатков аминокислот. Более предпочтительно, их длина составляет от примерно 17 до примерно 40 остатков аминокислот. Полипептид, в отличие от пептида, может содержать любое число остатков аминокислот. Следовательно, термин полипептид включает пептиды, а также более длинные последовательности аминокислот.

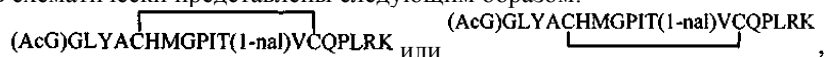
Фраза «фармацевтически приемлемый» обозначает здесь молекулы или составы, которые «считают в целом безопасными», например, те, которые являются физиологически приемлемыми и обычно не вызывают при введении человеку аллергических или аналогичных нежелательных реакций, таких как расстройство желудка, головокружение и т.п. Термин «фармацевтически приемлемый» предпочтительно употребляется здесь в значении одобренный органом федерального или государственного регулирования, либо перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее, как пригодный для применения у животных, а точнее - у людей.

Термин «носитель» обозначает дилуэнт, адъювант, наполнитель или разбавитель, с которым вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. В качестве носителей, особенно для инъекционных растворов, используют предпочтительно воду или водные буферные растворы, а также водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие фармацевтические носители описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» (автор E.W. Martin).

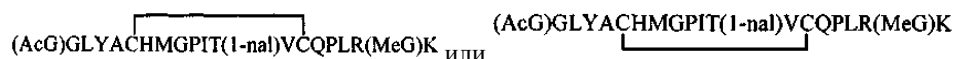
Термин «агонист» обозначает здесь биологически активный лиганд, который связывается с комплементарным ему биологически активным рецептором и активирует последний, что либо вызывает биологический ответ рецептора, либо усиливает уже существующую биологическую активность рецептора.

Новые пептиды, которые являются агонистами ЭПО-рецептора.

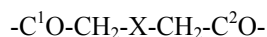
Настоящее изобретение предусматривает новые пептидные соединения, которые являются агонистами ЭПО-рецептора и обладают существенно повышенными эффективностью и активностью. Эти пептидные соединения представляют собой гомодимеры из пептидных мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), либо из пептидных мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), где каждая аминокислота обозначена стандартной однобуквенной аббревиатурой, «(AcG)» обозначает N-ацетилглицин, «(1-nal)» обозначает 1-нафтилаланин, а «(MeG)» обозначает N-метилглицин, также известный как саркозин. Каждый пептидный мономер пептидного димера содержит внутримолекулярную дисульфидную связь между остатками цистеина данного мономера. Такие мономеры могут быть схематически представлены следующим образом:



и



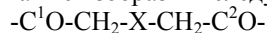
Эти мономерные пептиды димеризуют с получением в результате димеров с повышенной активностью агонистов ЭПО-рецепторов. Линкерный фрагмент (L_k) представляет собой линкер на основе разветвленного третичного амида, который соединяет C-концы двух пептидных мономеров путем одновременного присоединения к C-концевому остатку лизина каждого мономера. Третичный амидный линкер можно изобразить следующим образом:



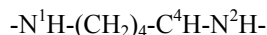
где X представляет $NCO-(CH_2)_2-N^1H$, C^1 линкера образует амидную связь с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина первого белкового мономера, C^2 линкера образует амидную связь с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина второго белкового мономера, а N^1 , входящий в X, прикреплен карбаматной связью или амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), имеющему

молекулярную массу от примерно 20000 до примерно 40000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанные молекулярные массы).

Третичный амидный линкер можно также изобразить следующим образом:



где X обозначает $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$, C^1 линкера образует амидную связь с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина первого пептидного мономера, а C^2 линкера образует амидную связь с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина второго пептидного мономера. Пептидные димеры согласно данному изобретению также содержат спейсерный фрагмент (спейсер, разделяющий фрагмент) следующей структуры:



где C^4 спейсера ковалентно связан с C^3 , входящим в X, N^1 спейсера ковалентно присоединен карбаматной или амидной связью к активированному фрагменту ПЭГ, а N^2 спейсера ковалентно присоединен карбаматной или амидной связью к активированному фрагменту ПЭГ, где ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 10000 до примерно 60000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса).

Новые пептиды согласно данному изобретению могут также содержать фрагмент ПЭГ, который ковалентно присоединен посредством карбаматной или амидной связи с третичным амидным линкером к пептидному димеру. ПЭГ представляет собой водорастворимый полимер, который и является фармацевтически приемлемым. ПЭГ для применения в настоящем изобретении может представлять собой линейный, неразветвленный ПЭГ, имеющий молекулярную массу от примерно 20 до примерно 60 кДа («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса). Более предпочтительно, ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 30 до примерно 40 кДа. Специалист в данной области сможет подобрать желаемый размер полимера, основываясь на таких параметрах, как желаемая дозировка, время циркуляции, устойчивость к протеолизу, влияние, если оно есть, на биологическую активность, простота в обращении, степень антигенности или ее отсутствие, а также другие известные воздействия ПЭГ на терапевтический пептид.

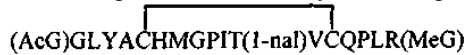
Пептиды, пептидные димеры и другие молекулы на основе пептидов согласно данному изобретению могут быть присоединены к водорастворимым полимерам (например, ПЭГ) при помощи разнообразных химических способов, которые позволяют связать водорастворимый(е) полимер(ы) с рецептор-связывающей частью молекулы (например, пептид + спейсер). В обычном способе реализации для ковалентного присоединения водорастворимого полимера(ов) к рецептор-связывающей части задействовано единственное место (сайт) присоединения. Однако в альтернативных способах реализации изобретения можно применять связывание во множественных сайтах присоединения, включая дальнейшие варианты, в которых разные виды водорастворимых полимеров присоединяют к рецептор-связывающей части в различных сайтах присоединения, которые могут включать сайты ковалентного присоединения (присоединений) к спейсеру и/или одной или обоим пептидным цепям. В некоторых способах реализации димер или более крупный полимер будет содержать различные виды пептидных цепей (т.е. будет представлять собой гетеродимер или другой гетеромультимер). В качестве примера, но не ограничения, димер может содержать одну пептидную цепь, имеющую сайт присоединения ПЭГ, а у второй пептидной цепи может либо отсутствовать сайт присоединения ПЭГ, либо для присоединения может быть использована связь не такого, как в первой цепи, химического состава. В некоторых вариантах спейсер может содержать или не содержать сайт присоединения ПЭГ, а в случае присоединения ПЭГ к указанному спейсеру, для присоединения может быть использована связь не такого, как в первой и/или второй цепи, химического состава. В альтернативном способе реализации ПЭГ присоединен к спейсерной части рецептор-связывающей части, а другой водорастворимый полимер (например, углеводород) конъюгирован с боковым радикалом одной из аминокислот пептидной части молекулы.

Для присоединения ПЭГ (пегилирования) к рецептор-связывающей части (пептиды+спейсер) может быть использовано множество разных видов полиэтиленгликоля (ПЭГ). Можно использовать практически любой подходящий химически активный реагент ПЭГ. В предпочтительных способах реализации применение химически активного реагента ПЭГ приведет к образованию карбаматной или амидной связи после конъюгирования с рецептор-связывающей частью. Подходящие химически активные реагенты ПЭГ включают, без ограничения, коммерчески доступные реагенты, которые можно приобрести по каталогу Drag Delivery Systems (2003) корпорации NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuyaku, Tokyo 150-6019) и каталогу Molecular Engineering 2003 компании Nectar Therapeutics (490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806). В качестве примера, но не ограничения, здесь приводятся следующие часто предпочитаемые в разных способах реализации реагенты ПЭГ: m-PEG2-NHS, mPEG2-ALD, multi-Arm PEG, mPEG(MAL)2, mPEG(MAL), m-PEG2-NH2, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-тиоэфир, mPEG-двойные сложные эфиры, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, гетерофункциональные ПЭГ (NH2-PEG-COOH, Вос-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), акрилаты ПЭГ (ACRL-PEG-NHS), ПЭГ-фосфолипиды (например, mPEG-DSPE), многолучевые

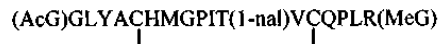
(разветвленные) ПЭГ серии SUNBRITE, включая серию GL ПЭГ на основе глицериновых, активированных химическим способом, выбранным специалистом, любой из активированных ПЭГ серии SUNBRITE, включая, без ограничения, карбоксил-ПЭГи, р-NP-ПЭГ, Тресил-PEGs, альдегид ПЭГи, ацеталь-ПЭГи, амино-ПЭГи, тиол-ПЭГи, имид-малеиновые ПЭГи, гидроксил-ПЭГ-амин, амино-ПЭГ-СООН, гидроксил-ПЭГ-альдегид, ПЭГ карбоксильно-ангидридного типа, функционализированные фосфолипид-ПЭГ и другие аналогичные и/или подходящие химически активные ПЭГ, выбираемые специалистами в данной области для конкретного применения и использования.

Новые пептиды согласно данному изобретению могут также содержать два фрагмента ПЭГ, ковалентно присоединенных карбаматной или амидной связью к спейсерному фрагменту, который ковалентно присоединен к третичному амидному линкеру пептидного димера. Каждый из двух фрагментов ПЭГ, использованный в таком способе реализации настоящего изобретения, может быть линейным, или они могут быть связаны вместе в одной (общей) точке присоединения. Каждый фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу предпочтительно от примерно 10 до примерно 60 кДа («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанные молекулярные массы). Линейные фрагменты ПЭГ особенно предпочтительны. Более предпочтительно каждый из двух фрагментов ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 20 до примерно 40 кДа, а еще более предпочтительно в интервале от примерно 20 до примерно 40 кДа. Еще более предпочтительно, чтобы каждый из двух фрагментов ПЭГ имел молекулярную массу примерно 20 кДа. Специалист в данной области сможет подобрать желаемый размер полимера, основываясь на таких параметрах, как желаемая дозировка, время циркуляции, устойчивость к протеолизу, влияние, если оно есть, на биологическую активность, простота в обращении, степень антигенности или ее отсутствие, а также другие известные воздействия ПЭГ на терапевтический пептид.

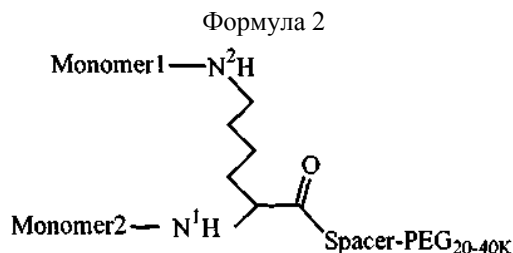
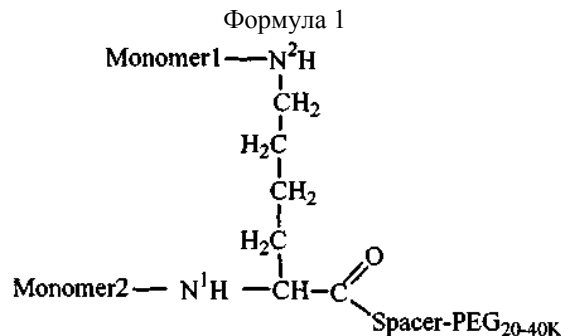
Настоящее изобретение также включает пептиды - агонисты, которые представляют собой гомодимеры из пептидных мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (SEQ ID NO: 3), где каждая аминокислота обозначена стандартной однобуквенной аббревиатурой, «(AcG)» обозначает N-ацетилглицин, «(1-nal)» обозначает 1-нафтилаланин, а «(MeG)» обозначает N-метилглицин, известный также как саркозин. Каждый пептидный мономер пептидного димера содержит внутримолекулярную дисульфидную связь между остатками цистеина данного мономера. Такие мономеры могут быть схематично представлены следующим образом:



или



Эти мономерные пептиды димеризуют, получая в результате димеры с повышенной активностью агонистов ЭПО-рецепторов. Линкерный фрагмент (Lk) представляет собой остаток лизина, который соединяет С-концы двух пептидных мономеров путем одновременного присоединения к С-концевой аминокислоте каждого мономера. Один пептидный мономер присоединен своим С-концом к ε-аминогруппе лизина, а второй пептидный мономер своим С-концом присоединен к α-аминогруппе лизина. Например, структура данного димера может быть изображена, как показано в формуле 1. Обобщенное изображение показано в формуле 2.



В формуле 1 и формуле 2 N² представляет атом азота ε-аминогруппы лизина, а N¹ представляет атом азота α-аминогруппы лизина.

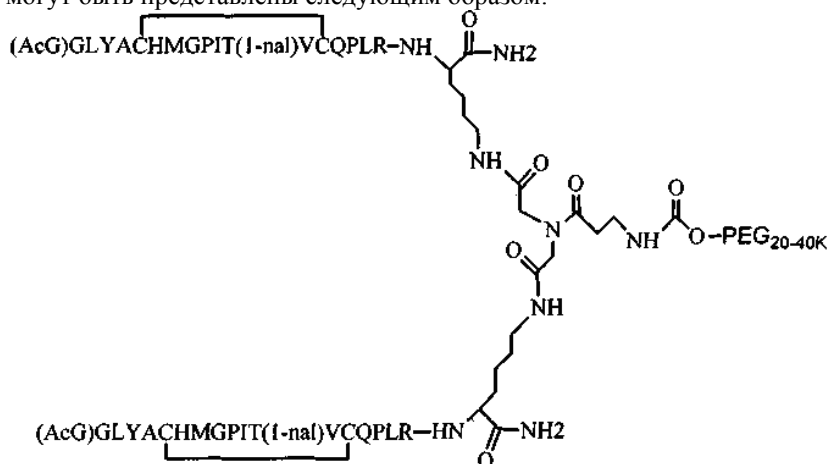
Пептидные димеры согласно данному изобретению также содержат спейсерный фрагмент (спейсер, разделяющий фрагмент) следующей структуры:



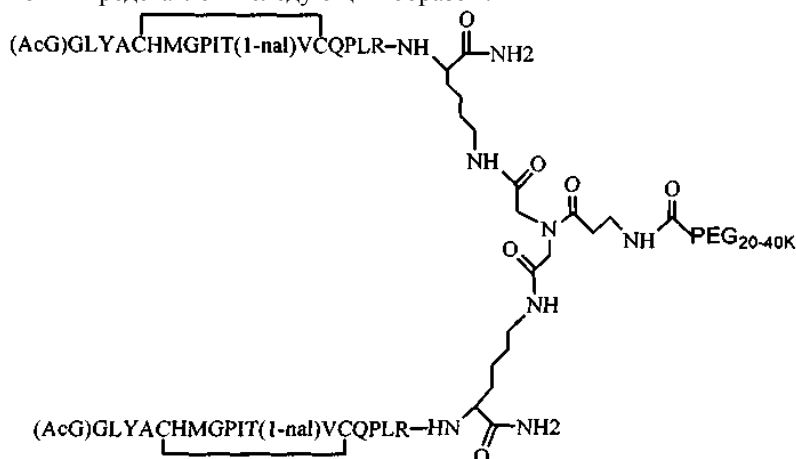
На одном конце N¹ спейсера присоединен амидной связью к углероду карбонильной группы лизинового линкера. На противоположном конце N² спейсера присоединен карбаматной связью или амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG), имеющему молекулярную массу от примерно 10000 до примерно 60000 Да («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса). Более предпочтительно ПЭГ имеет молекулярную массу примерно от 20000 до 40000 Да.

Таким образом, новые пептиды согласно данному изобретению также содержат фрагмент ПЭГ, ковалентно присоединенный к пептидному димеру. ПЭГ представляет собой водорастворимый полимер и является фармацевтически приемлемым. ПЭГ для применения в настоящем изобретении может представлять собой линейный, неразветвленный ПЭГ, имеющий молекулярную массу примерно от 20 до примерно 60 кДа («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше, чем указанная молекулярная масса). Наиболее предпочтительно ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 30 до примерно 40 кДа. Специалист в данной области сможет подобрать желаемый размер полимера, основываясь на таких параметрах, как желаемая дозировка, время циркуляции, устойчивость к протеолизу, влияние, если оно есть, на биологическую активность, простота в обращении, степень антигенности или ее отсутствие, а также другие известные воздействия ПЭГ на терапевтический пептид.

В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ линкера присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

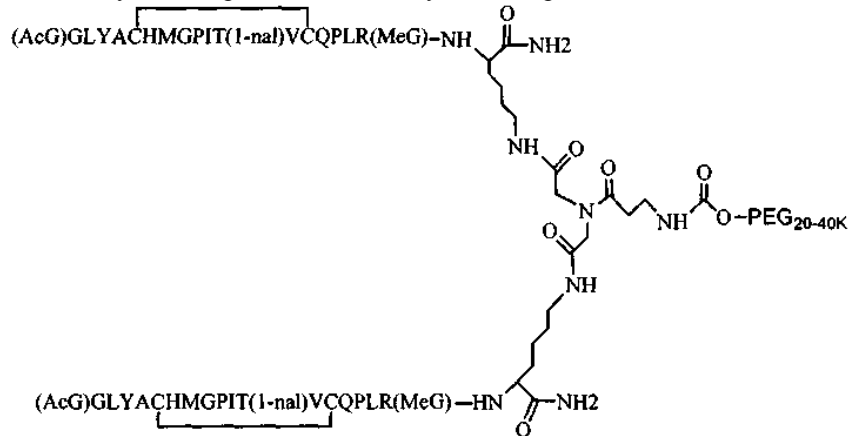


В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ линкера присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

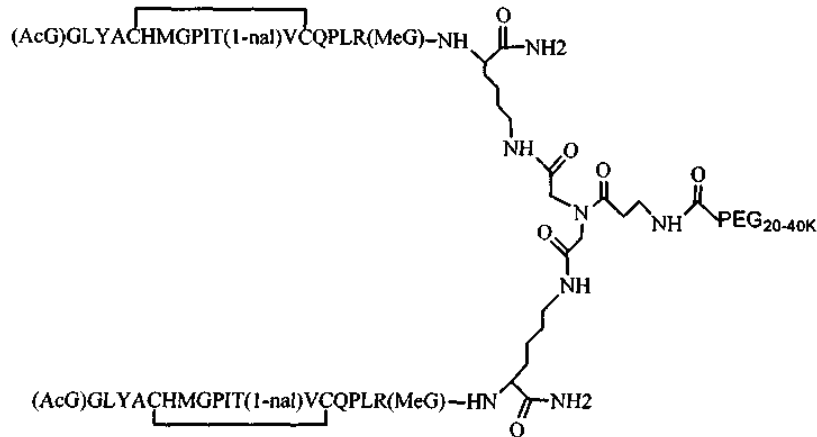


В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот

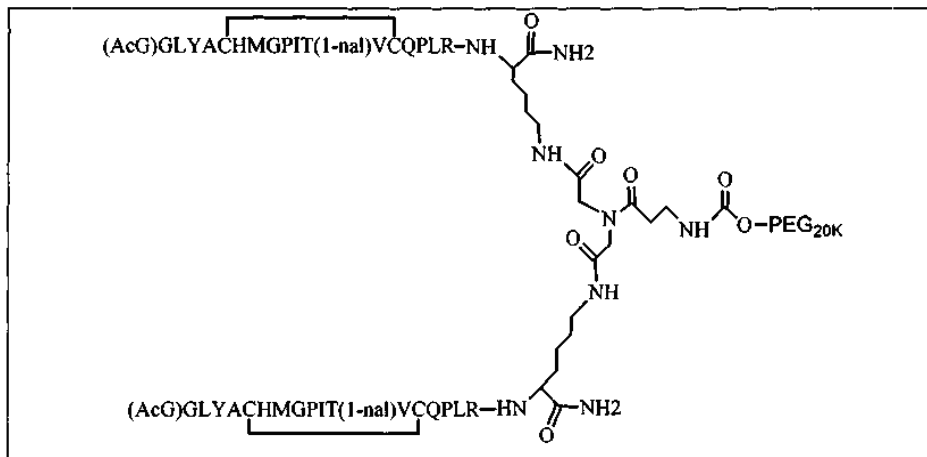
(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ линкера присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

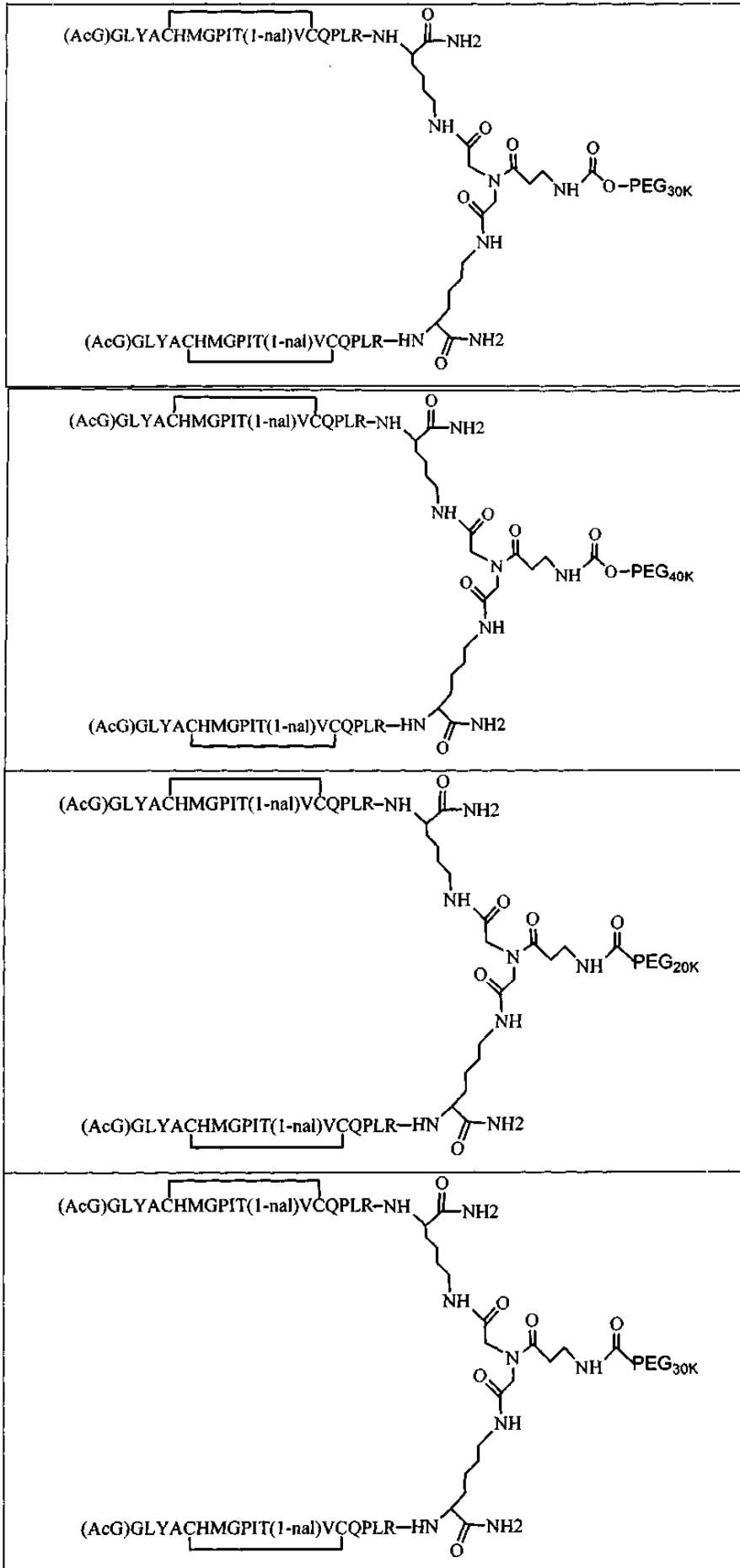


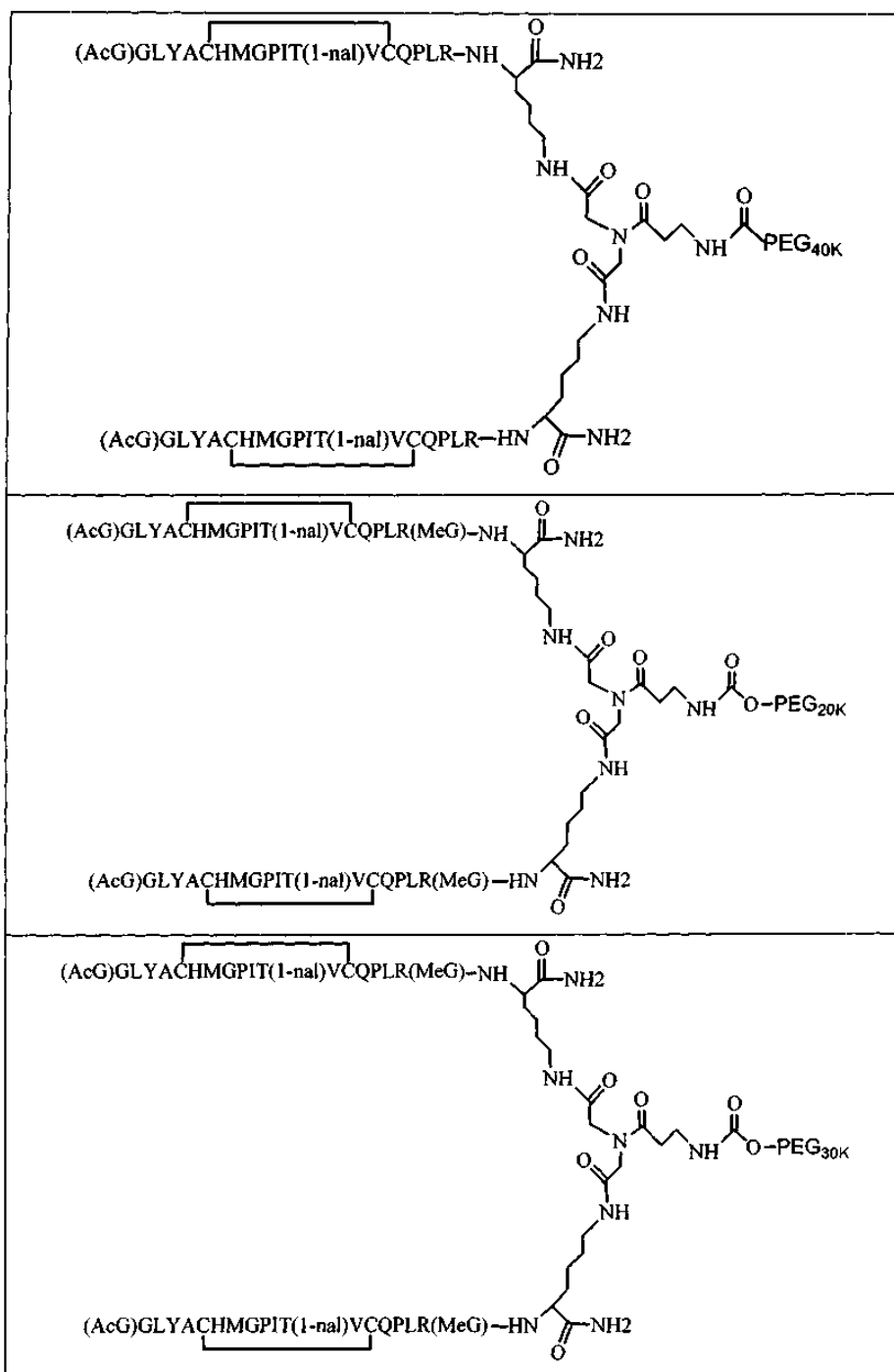
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ линкера присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

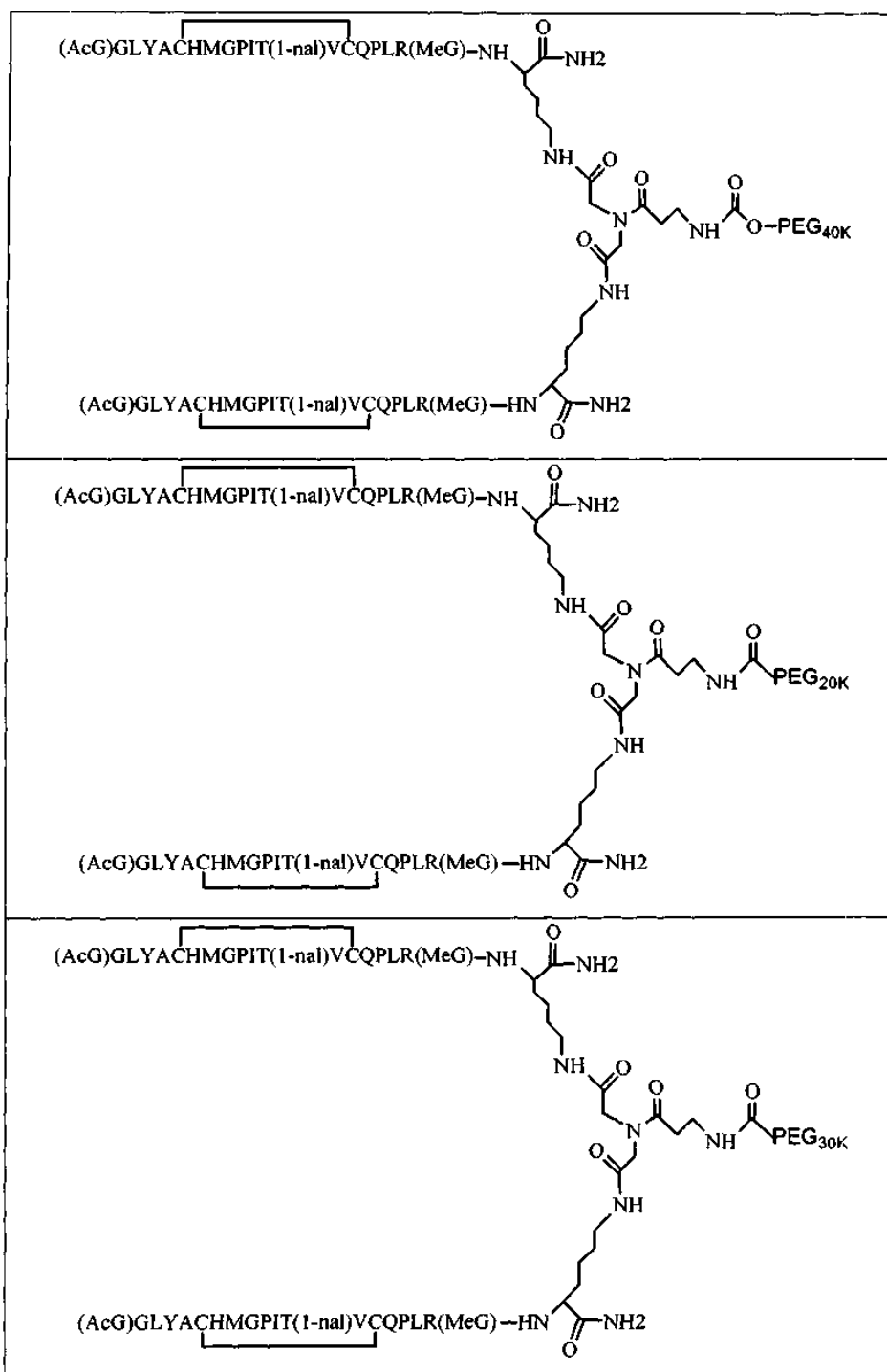


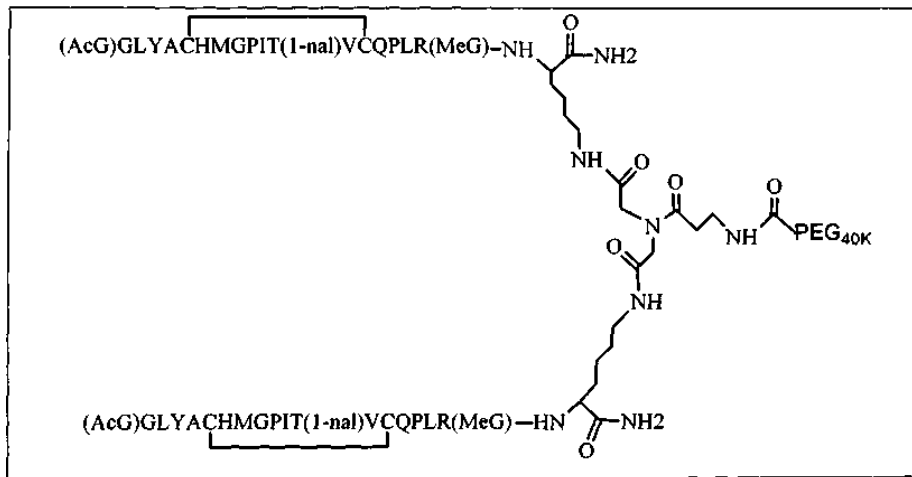
Предпочтительные пептидные димеры согласно настоящему изобретению включают, без ограничения:



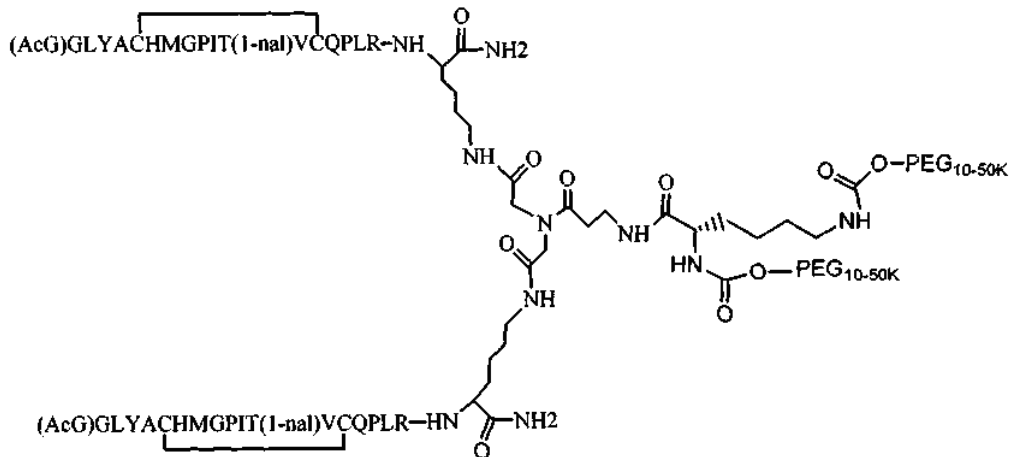




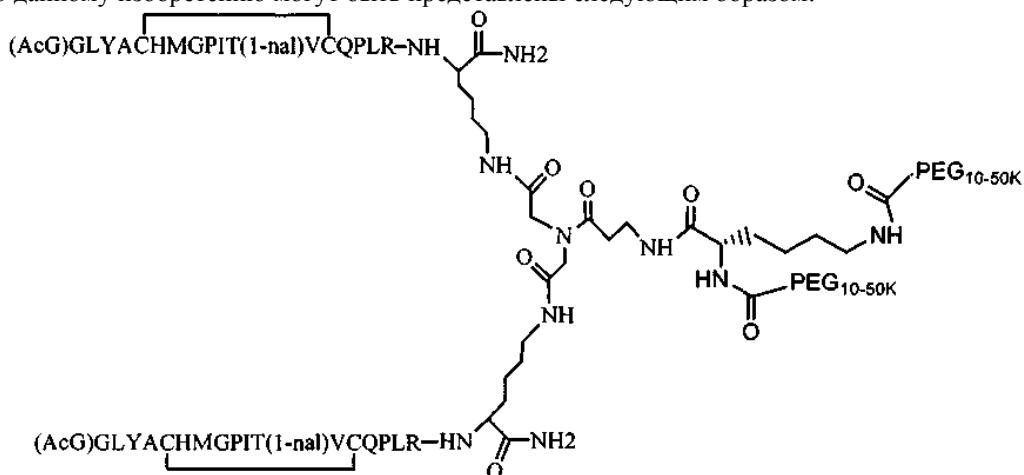




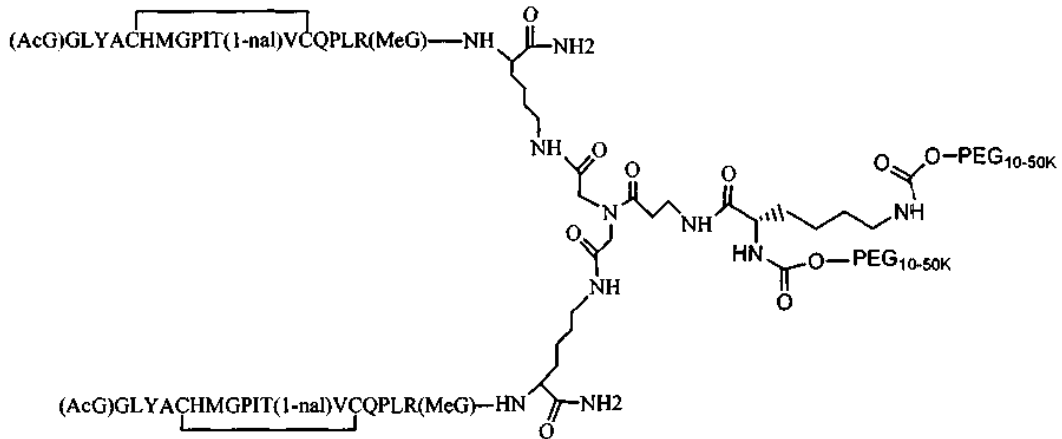
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



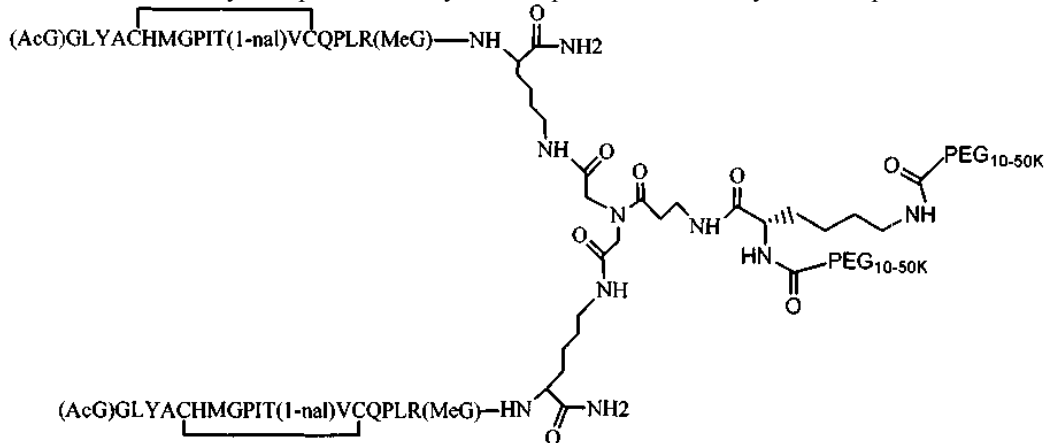
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



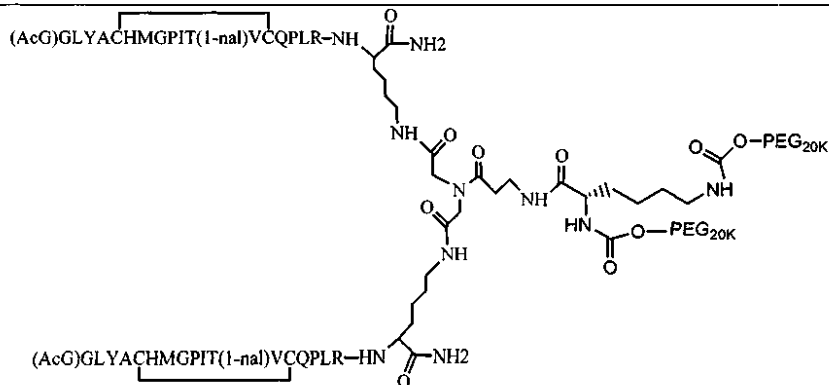
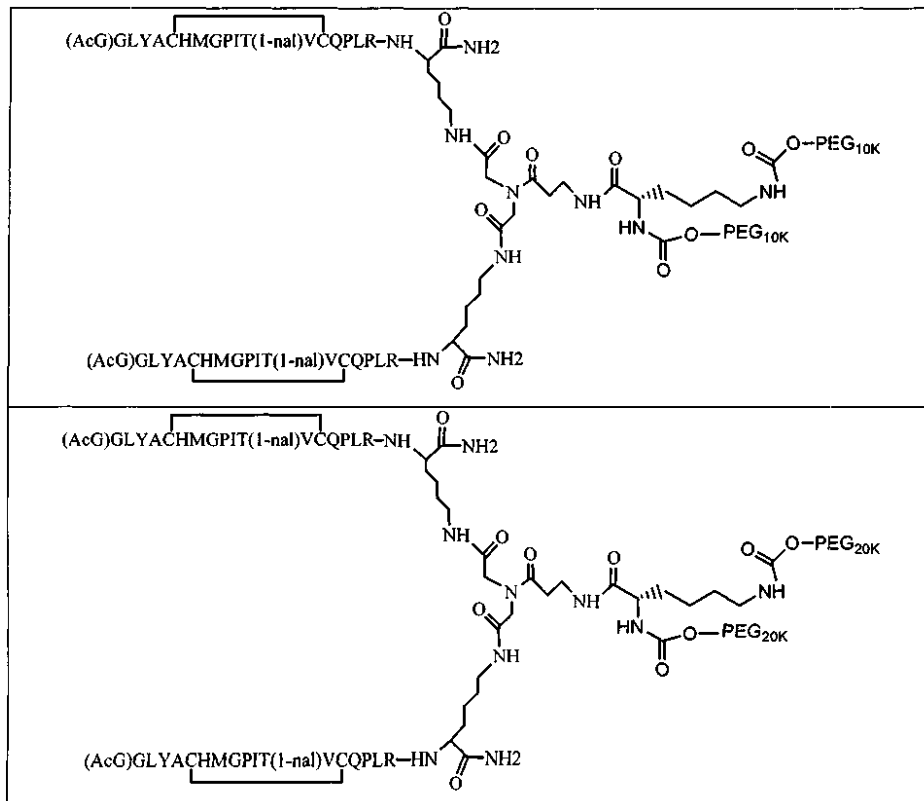
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

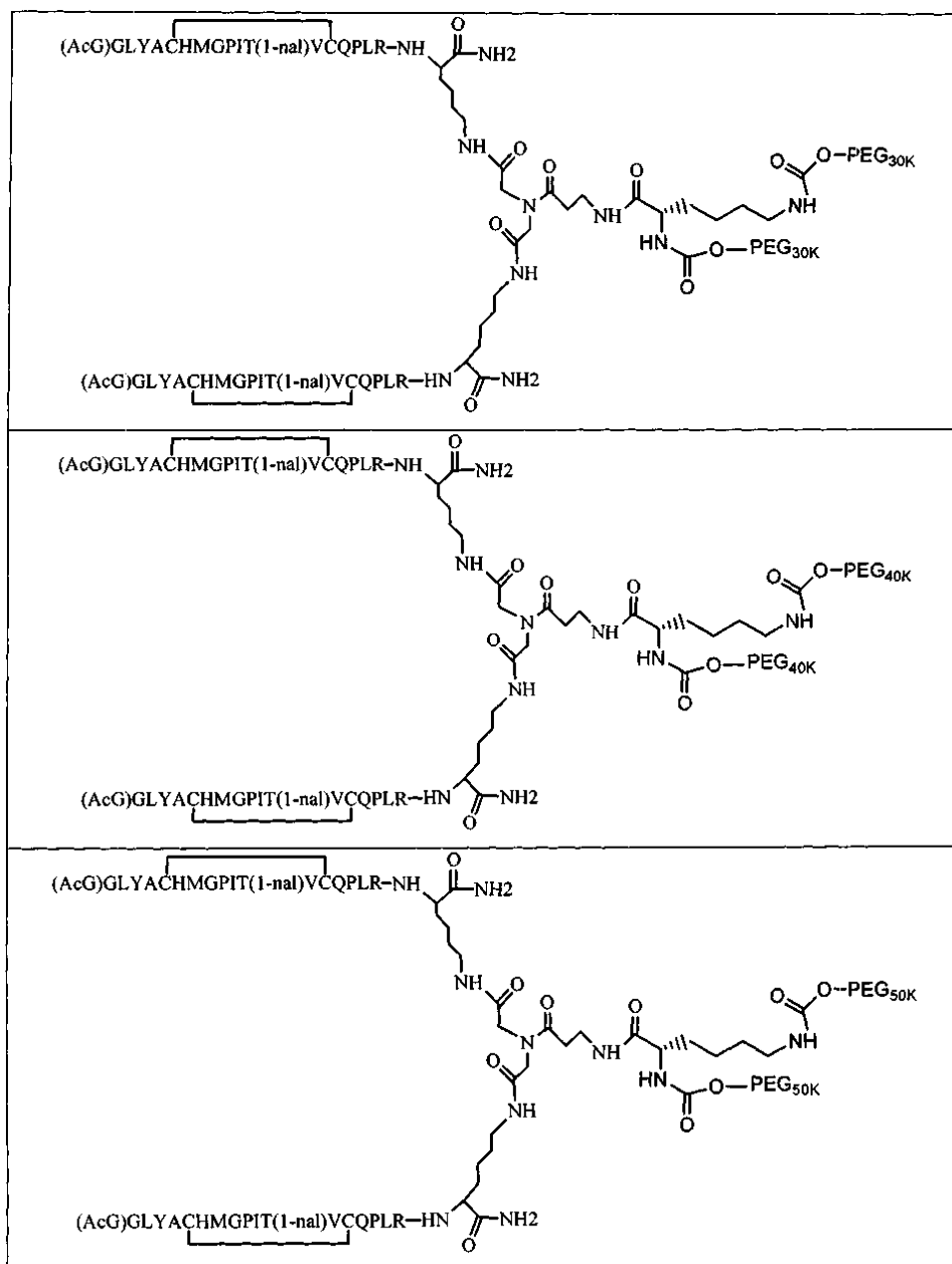


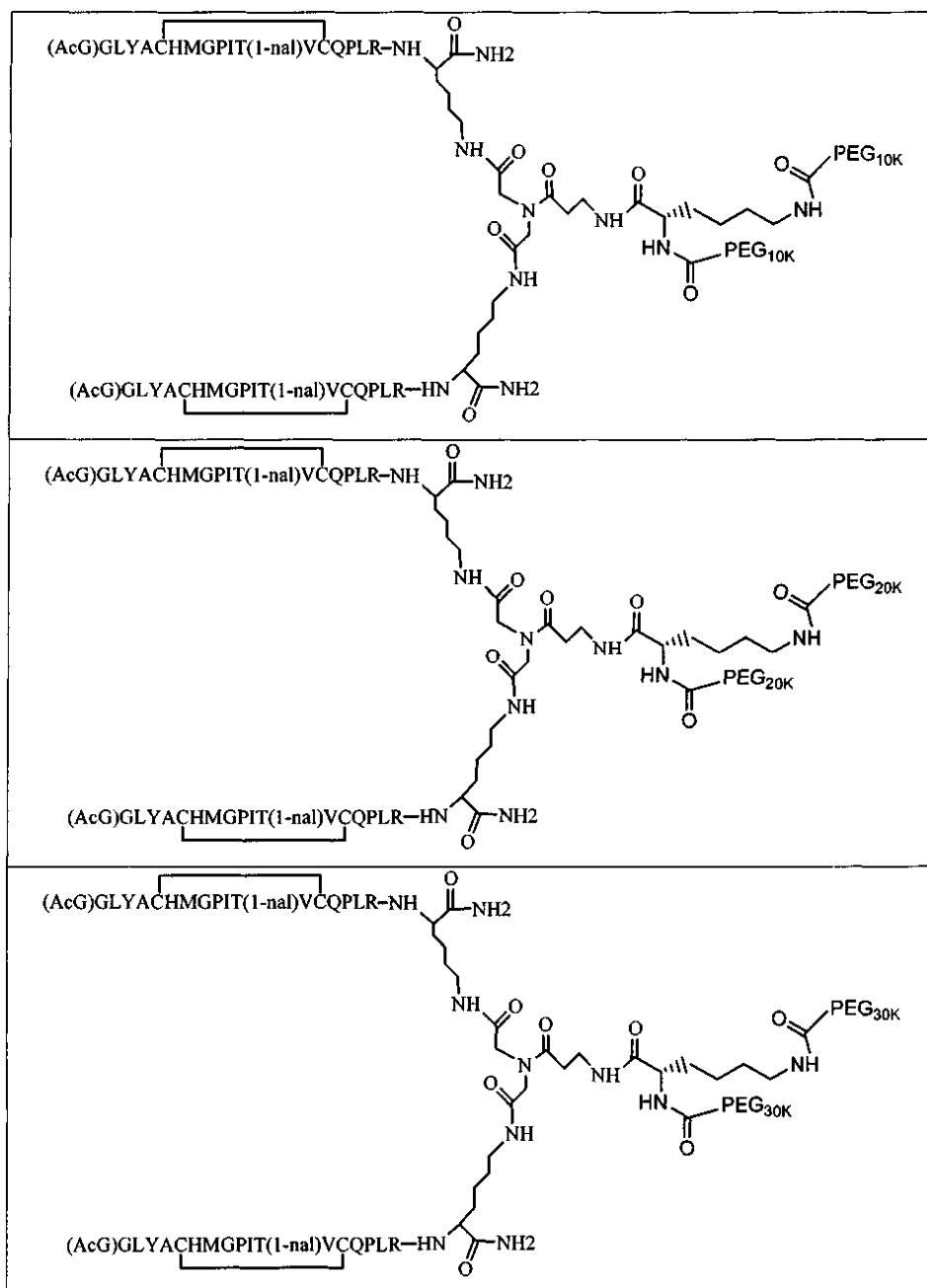
В случае, когда каждый мономер гомодимера имеет последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), а N¹ и N² спейсера ковалентно присоединены амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

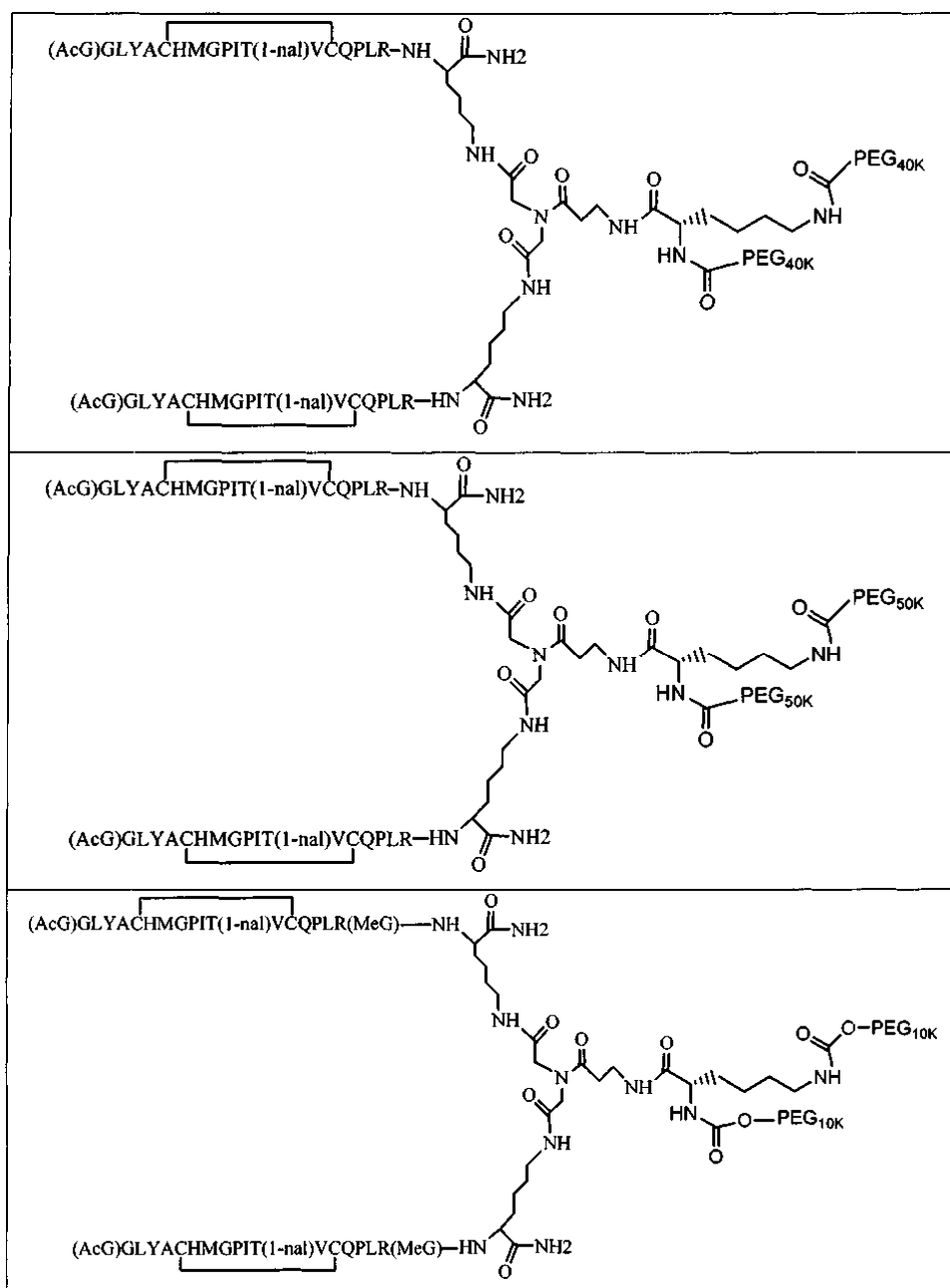


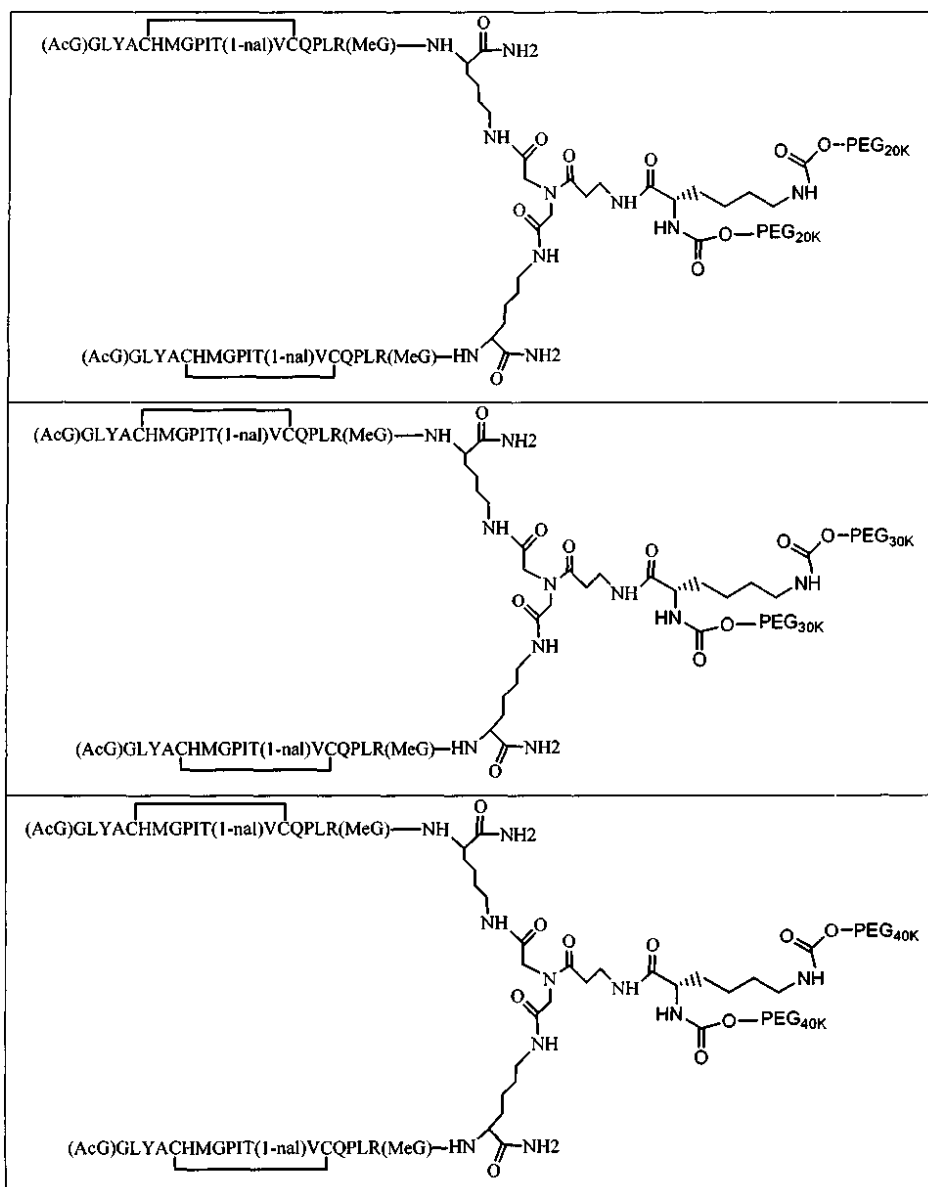
Предпочтительные пептидные димеры согласно настоящему изобретению включают, без ограничения:

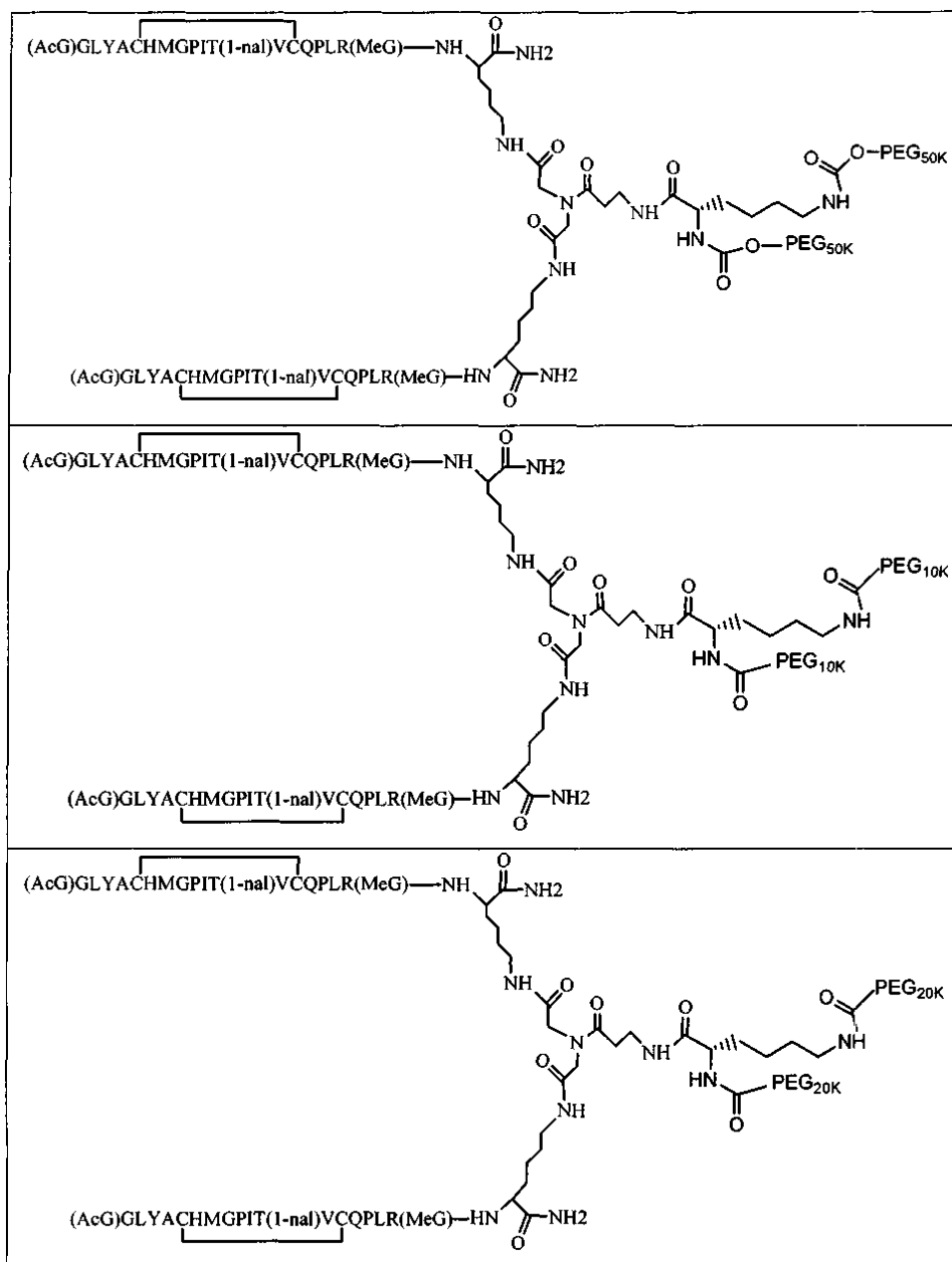


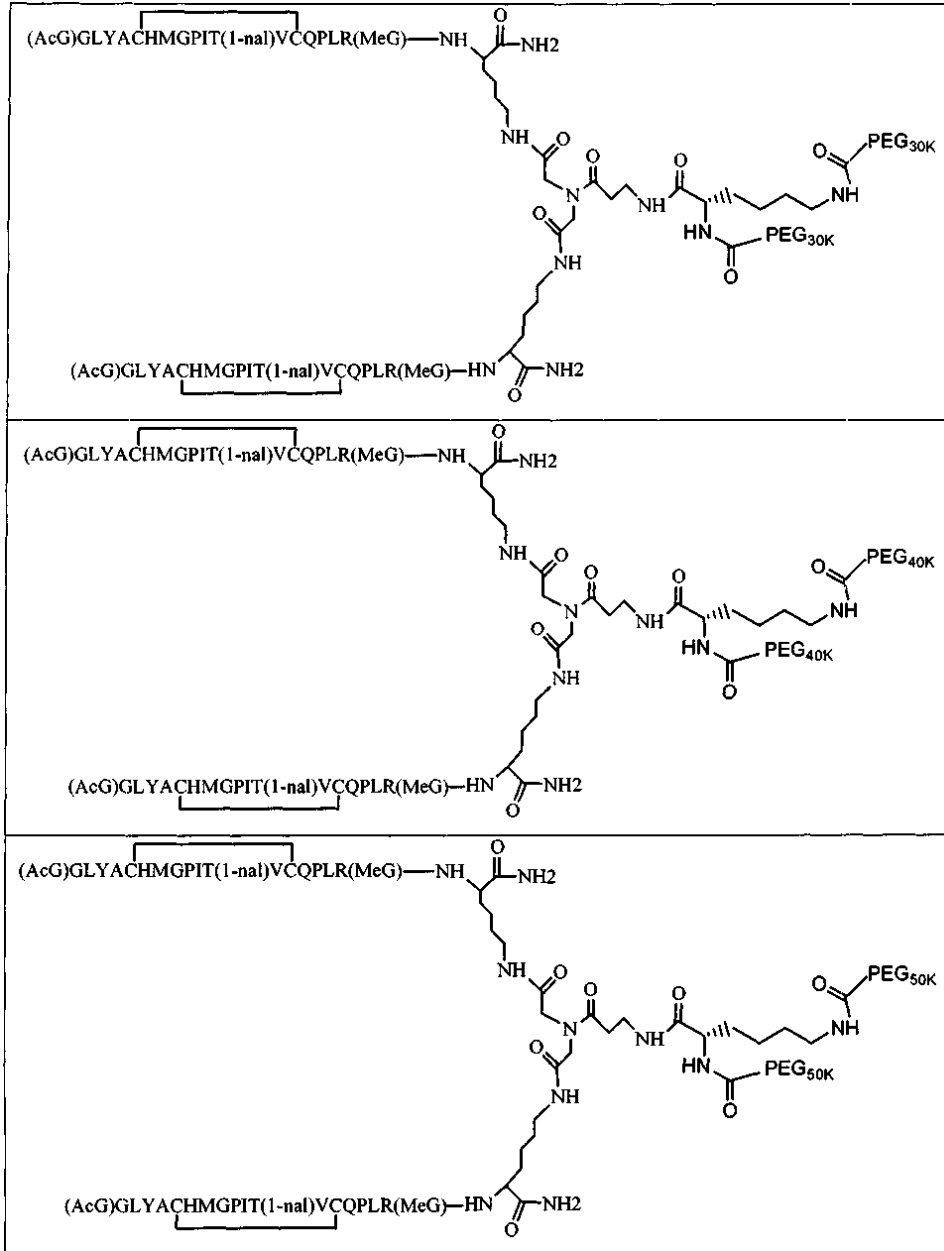




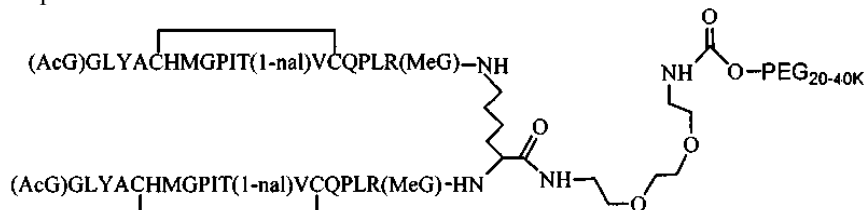




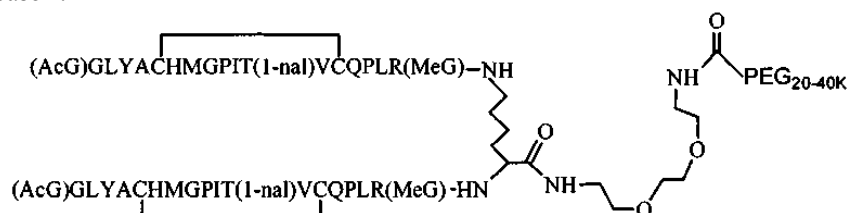




В случае, когда спейсер присоединен карбаматной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:

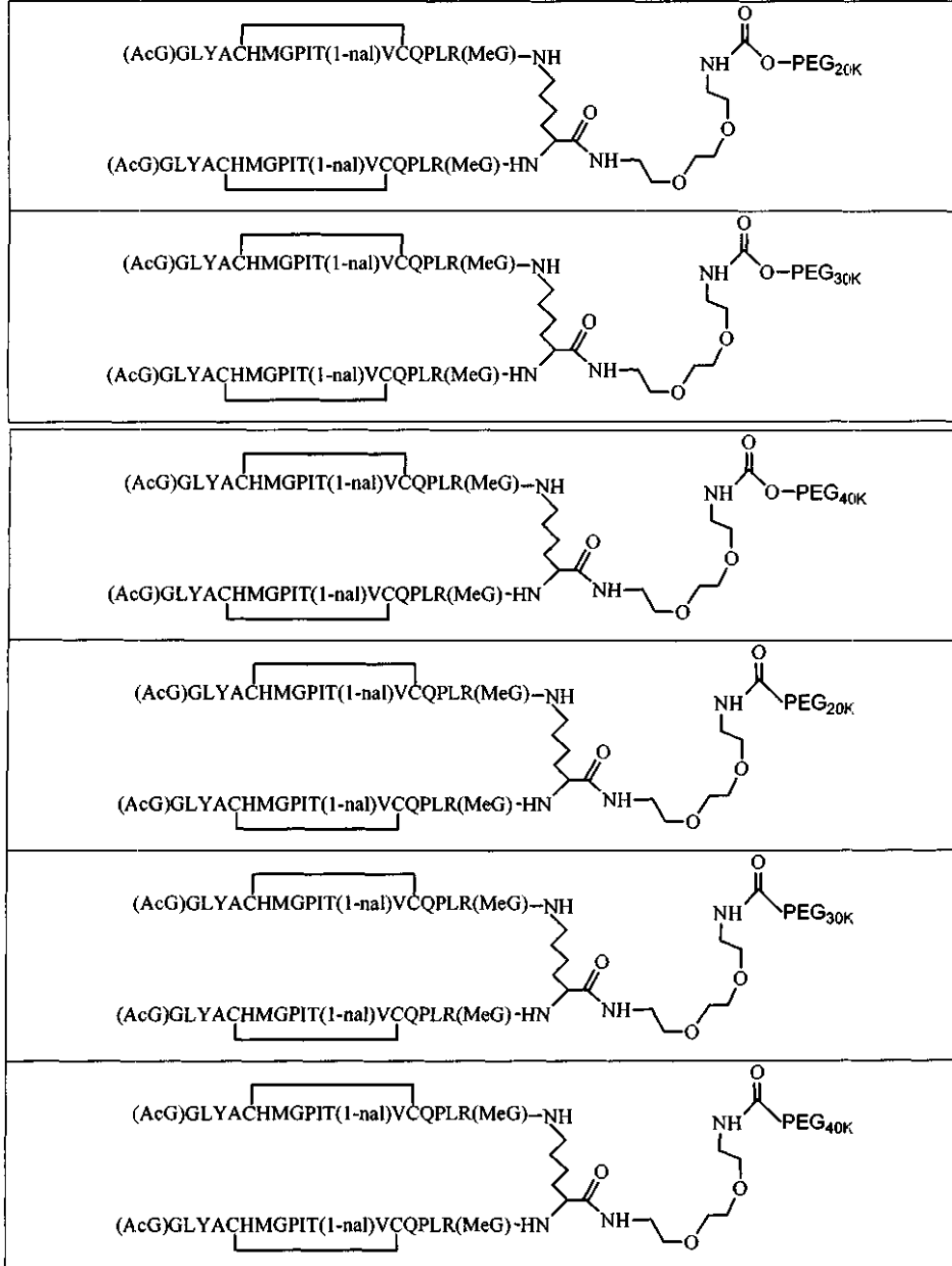


В случае, когда спейсер присоединен амидной связью к активированному фрагменту полиэтиленгликоля (ПЭГ), новые пептидные соединения согласно данному изобретению могут быть представлены следующим образом:



Димерную структуру можно записать как [Ас-пептид, дисульфид]₂Lys-спейсер-PEG_{20-40К}, чтобы обозначить ацелированный на N-конце пептид, связанный как с α-, так и с ε-аминогруппами лизина, причем каждый пептид содержит внутримолекулярную дисульфидную петлю, а спейсерная молекула образует ковалентную связь между C-концом лизина и фрагментом ПЭГ, имеющим молекулярную массу от примерно 20000 до примерно 40000 Да.

Предпочтительные пептидные димеры согласно настоящему изобретению включают, без ограничения:



Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как α,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и другие минорные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами соединений согласно настоящему изобретению. Примеры минорных аминокислот включают, без ограничения, β-аланин, 3-пирридилаланин, 4-гидроксипролин, O-фосфосерин, N-метилглицин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 5-гидроксилизин, норлейцин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты. Возможны также другие модификации, включая модификацию N-конца, модификацию C-конца, замену одной или более встречающихся в природе, генетически кодируемых аминокислот минорными аминокислотами, модификацию боковых радикалов одного или более остатков аминокислот, фосфорилирование пептида и т.п.

Последовательности пептидов согласно настоящему изобретению могут присутствовать отдельно

или в виде конъюгатов с дополнительными отрезками пептидной цепи на N-конце или C-конце (N-концевыми или C-концевыми «продолжениями»). Такие «продолжения» могут представлять собой естественно кодируемые последовательности пептидов, возможно с не встречающимися в природе последовательностями, или практически без них. «Продолжения» могут включать, по решению специалиста в данной области, любые добавления, делеции, точечные мутации или другие модификации последовательности, либо их комбинации. В качестве примера, но не ограничения, встречающиеся в природе последовательности могут представлять собой полноразмерные или укороченные последовательности, а также могут включать замены аминокислот, которые создают сайт присоединения углевода, ПЭГ, другого полимера и т.п. путем соединения с боковым радикалом. В одном из вариантов замена аминокислоты приводит к гуманизации последовательности, что делает ее совместимой с иммунной системой человека. Предусмотрены все типы белков слияния, включая такие, в которых последовательности иммуноглобулина примыкают к последовательностям согласно настоящему изобретению, активирующим ЭПО-рецепторы, или расположены вблизи от них, с последовательностью неиммуноглобулинового спейсера или без нее. Один вид реализации представляет собой цепь иммуноглобулина, содержащую вместо вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи последовательность, активирующую ЭПО-рецептор.

Приготовление пептидных соединений согласно данному изобретению.

Синтез пептидов.

Пептиды согласно данному изобретению могут быть приготовлены классическими способами, известными в данной области. Эти стандартные способы включают синтез полностью в твердой фазе (твердофазный синтез), способы синтеза частично в твердой фазе, конденсации фрагментов, классический синтез в растворе и технологию рекомбинантных ДНК [С., например, Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149].

В одном из способов реализации пептидные мономеры пептидного димера синтезируют отдельно, после чего подвергают димеризации.

В другом способе реализации пептидные мономеры пептидного димера соединяют их C-концами через разветвленный третичный амидный линкерный фрагмент L_K , который имеет две функциональные группы, которые могут служить сайтами инициации для синтеза пептидов, и третью функциональную группу (например, карбоксильную группу или аминогруппу), которая обеспечивает связывание с другим молекулярным фрагментом (который может, например, присутствовать на поверхности твердого носителя (подложки)). В этом случае, два пептидных мономера могут быть синтезированы непосредственно на двух химически активных азотных группах линкерного фрагмента L_K (варианта методики твердофазного синтеза). Такой синтез может быть последовательным или одновременным (параллельным).

В другом способе реализации два пептидных мономера могут быть синтезированы непосредственно на двух химически активных азотных группах линкерного фрагмента L_K (в качестве варианта методики твердофазного синтеза). Такой синтез может быть последовательным или одновременным. В этом способе реализации применяют лизиновый линкерный фрагмент (L_K), имеющий две аминогруппы, которые могут служить сайтами инициации для синтеза пептидов, и третью функциональную группу (например, карбоксильную группу лизина, либо аминогруппу амида лизина, остатка лизина, в котором карбоксильная группа была трансформирована в амидный фрагмент $-CONH_2$), которая обеспечивает связывание с другим молекулярным фрагментом (который может, например, присутствовать на поверхности твердого носителя (подложки)).

В случае, когда предстоит провести последовательный синтез пептидных цепей димера на линкере, две функциональные аминогруппы защищают двумя разными ортогонально удаляемыми защитными группами для аминогрупп (аминзащитающую группу). Защищенный линкер связывают («сшивают») с твердым носителем через третью функциональную группу линкера. Удаляют первую аминзащитающую группу и на первом лишенном защиты аминокостатке синтезируют первый пептид димера. Затем удаляют вторую аминзащитающую группу и на втором лишенном защиты аминокостатке синтезируют второй пептид димера. Например, первый аминокостаток линкера может быть защищен группой Alloc (аллилоксикарбонил), а второй - группой Fmoc (9-флуоренилметилкарбоксил). В этом случае группу Fmoc (но не группу Alloc), можно удалить обработкой слабым основанием [например, 20% пиперидином в диметилформамиде (DMF, DMF)] и синтезировать первую пептидную цепь. После этого можно удалить группу Alloc подходящим реагентом (например, $Pd(PPh_3)_4$ -метил морфолин и хлороформ) и синтезировать вторую пептидную цепь. Необходимо отметить, что в тех случаях, когда предстоит использовать тиолзащитающие группы для цистеина с целью контроля образования дисульфидных связей (как обсуждается ниже), необходимо применять эту методику, даже если последовательности аминокислот пептидных цепей димера идентичны.

В случаях, когда предстоит провести одновременный (параллельный) синтез пептидных цепей димера на линкере, две функциональные аминогруппы защищают одной и той же удаляемой аминзащитающей группой. Защищенный линкер связывают с твердым носителем через третью функциональную группу линкера. В этом случае защиту с двух защищенных функциональных групп удаляют одновременно, и на лишенных защиты аминогруппах синтезируют одновременно две пептидные цепи. Необходимо отметить, что при применении этой методики последовательности пептидных цепей будут

идентичными, а все тиолзащищающие группы для остатков цистеина одинаковы.

Предпочтительным способом синтеза пептидов является твердофазный синтез. Процедуры синтеза пептидов в твердой фазе хорошо известны в данной области [См., например, *Stewart Solid Phase Peptide Syntheses* (изд-во Freeman and Co.: San Francisco) 1969; каталог 2002/2003 General Catalog компании Novabiochem Corp, San Diego, USA (Сан-Диего, США); *Goodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (изд-во Houben-Weyl, Stuttgart (Штедгарт)) 2002]. В твердофазном синтезе, синтез обычно начинают с С-конца пептида, используя α -аминозащищенную смолу. Подходящий исходный материал можно приготовить, например, путем присоединения требуемой α -аминокислоты к хлорометилированной смоле, карбоксиметиловой смоле, полистиреновой смоле, бензгидриламиновой смоле и т.п. Одну из таких хлорометилированных смол продает компания Bio Rad Laboratories (Ричмонд, Калифорния) под торговой маркой BIO-BEADS SX-1. Препарат гидроксиметиловой смолы был описан Bodonszky et al. (1966) *Chem. Ind. London* 38:1597. Бензгидриламиновая смола (ВНА) была описана Pietta, Marshall (1970) *Chem. Commun.* 650, а гидрохлоридная форма доступна коммерчески (Beckman Instruments, Inc, Пало Альто, Калифорния, США). Например, α -аминозащищенная аминокислота может быть связана с хлорометилированной смолой с помощью бикарбонат цезия (катализатор), согласно способу, описанному у Gisin (1973) *Helv. Chim. Acta* 56:1467.

После первоначального связывания α -аминозащищающую группу удаляют, например, используя растворы трифторуксусной кислоты (ТФА, TFA) или соляной кислоты (HCl) в органических растворителях при комнатной температуре. После этого α -аминозащищенные аминокислоты успешно связываются с растущей пептидной цепью, связанной с носителем, α -аминозащищающие группы представляют собой те группы, которые применяют в области поэтапного синтеза пептидов, включая защитные группы алкильного типа (например, формил, трифторацетил, ацетил), ароматические защитные группы уретанового типа [например, бензилоксикарбонил (Cbz) и замещенный Cbz], алифатические уретановые защитные группы [например, *t*-бутилоксикарбонил (Boc), изопропилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил], и защитные группы акрильного типа (например, бензил, трифенилметил), флуоренилметил оксикарбонил (Fmoc), аллилоксикарбонил (Alloc) и 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этил (Dde).

Группы, защищающие боковые радикалы (обычно эфиры, сложные эфиры, тритил, РМС и т.п.) остаются неповрежденными в ходе связывания и не отщепляются в ходе удаления защиты N-концевых групп или в ходе связывания. Удаление групп, защищающих боковые радикалы, должно становиться возможным после завершения синтеза конечного пептида и при таких условиях реакции, которые не приведут к изменению целевого пептида. Группы, защищающие боковой радикал тирозина, включают тетрагидропиранил, трет-бутил, тритил, бензил, Cbz, Z-Br-Cbz и 2,5-дихлоробензил. Группы, защищающие боковой радикал аспарагина, включают бензил, 2,6-дихлоробензил, метил, этил и циклогексил. Группы, защищающие боковой радикал треонина и серина, включают ацетил, бензоил, тритил, тетрагидропиранил, бензил, 2,6-дихлоробензил и Cbz. Группы, защищающие боковой радикал аргинина, включают нитро-, Tosyl (Tos), Cbz, адамантилоксикарбонил, мезитоилсульфонил (Mts), 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf), 4-метокси-2,3,6-триметил-бензансульфонил (Mtr) или Boc. Группы, защищающие боковой радикал лизина, включают Cbz, 2-хлоробензилоксикарбонил (2-Cl-Cbz), 2-бромобензилоксикарбонил (2-Br-Cbz), Tos или Boc.

После удаления α -аминозащищающих групп остающиеся защищенными аминокислоты поэтапно связывают в желаемом порядке. Обычно проводят реакцию каждой защищенной аминокислоты в примерно 3-кратном избытке, используя подходящий активатор карбоксильной группы, такой как 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурион гексафлуорофосфат (HBTU) или дициклогексилкарбодимид (DDC), растворенный, например, в метиленхлориде (CH_2Cl_2), N-метилпирролидоне, диметилформамиде (DMF) или их смесей.

После завершения синтеза желательной последовательности аминокислот, желательные пептиды отсоединяют от носителя (смолы) путем обработки реагентом, таким как трифторуксусная кислота (TFA) или фтороводород (HF), который не только отщепляет пептид от смолы, но и отщепляет все оставшиеся группы, защищающие боковые радикалы. В случае использования хлорометилированной смолы в результате обработки фтороводородом получают пептидные кислоты в растворе. В случае использования бензгидриламино смолы в результате обработки фтороводородом получают непосредственно амид пептида. В качестве альтернативы, в случае применения хлорометилированной смолы, пептид с защищенными боковыми радикалами может быть отсоединен путем обработки смолы, к которой присоединен пептид, аммиаком, что дает желаемый амид с защищенными боковыми радикалами, или алкиламином, что дает алкиламид или диалкиламид с защищенными боковыми радикалами. Защиту боковых радикалов затем удаляют стандартным образом путем обработки фтороводородом с получением свободных амидов, алкиламидов или диалкиламидов.

При приготовлении сложных эфиров согласно данному изобретению применяют смолы, используемые для приготовления кислот пептидов, а пептиды с защищенными боковыми радикалами соединяют с использованием основания и соответствующим спирта (например, метанола). Затем группы, защищающие боковые радикалы, удаляют обычным способом путем обработки фтороводородом, в результате

чего получают желаемый эфир.

Для синтеза пептидов можно также применять процедуры, в которых произведены замены 20 встречающихся в природе генетически кодируемых аминокислот на другие аминокислоты в одной, двух или более позиций состава позиций согласно данному изобретению. Синтетические аминокислоты, которые могут быть введены путем замены в пептиды согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, N-метил, L-гидроксипропил, L-3, 4-дигидроксифенилаланин, δ-аминокислоты, такие как L-δ-гидроксилизил, D-δ-метилаланинил, L-α-метилаланил, β-аминокислоты и изоквинолил. Не встречающиеся в природе синтетические аминокислоты могут также быть введены в пептиды согласно настоящему изобретению.

Модификация пептидов.

Также можно модифицировать amino- и/или карбоксильные концы пептидных соединений согласно настоящему изобретению для того, чтобы получить другие соединения согласно данному изобретению. Например, N-конец может быть ацетилирован уксусной кислотой или ее галоген-производными, такими как α-хлоруксусная кислота, α-бромуксусная кислота или α-йодуксусная кислота.

Можно заменить встречающиеся в природе боковые радикалы 20 генетически кодируемых аминокислот (или стереоизомерических D-аминокислот) другими боковыми радикалами, например, такими группами, как алкильные группы, низшие алкилы, 4-, 5-, 6- до 7-членных алкилов, низший алкил-амид-, алкокси-, гидроксид-, карбоксигруппы и их производные с низшими эфирами, а также 4-, 5-, 6- до 7-членных гетероциклические группы. В частности, можно применять аналоги пролина, в которых размер кольца остатка пролина изменили с 4-членного на 5-, 6- или 7-членное. Циклические группы могут являться насыщенными или ненасыщенными, а ненасыщенные - ароматическими или неароматическими. Гетероциклические группы предпочтительно содержат следующие гетероатомы (один или более): азот, кислород и/или серу. Примеры таких групп включают фуразанил-, фуранил-, имидазолил-, имидазолил-, изотиазолил-, изоксазолил-, морфолинил- (например, морфолино-), оксазолил-, пиперазинил- (например, 1-пиперазил-), пиперидил- (например, 1-пиперидил-, пиперидино-), пиранил-, пиразинил-, пиразолил-, пиразонил-, пиразолил-, пиридазинил-, пиридил-, пиримидинил-, пирролидинил- (например, 1-пирролидинил-), пирролинил-, пирролил-, тиадиазолил-, тиазолил-, тиенил-, тиоморфолинил- (например, тиоморфолино-) и триазолилгруппы. Эти гетероциклические группы могут являться замещенными или незамещенными. В случае замещенной группы, заместитель может представлять собой алкил, алкоксигруппу, галоген, кислород, либо замещенный или незамещенный фенил.

Можно без труда модифицировать пептиды путем фосфорилирования, а также другими способами [например, как описано в Hruby et al. (1990) *Biochem. J.* 268:249-262].

Пептидные соединения согласно данному изобретению также могут служить структурной моделью непептидных соединений со сходной биологической активностью. Специалисты в данной области осознают, что доступно множество методик, позволяющих конструировать соединения с биологической активностью, идентичной или аналогичной активности пептидного соединения-образца, но с более подходящей, чем у взятого за образец пептида, активностью в отношении растворимости, стабильности и подверженности гидролизу и протеолизу [См. Morgan, Gainor (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252]. Эти методики включают замену пептидного остова остовом, составленным из фосфонатов, амидатов, карбаматов, сульфонамидов, вторичных амидов и N-метиламинокислот.

Образование дисульфидных связей.

Соединения согласно настоящему изобретению содержат две внутримолекулярные дисульфидные связи. Такие дисульфидные связи могут быть образованы путем окисления остатков цистеина в каждом пептидном мономере.

В одном из способов реализации образование связей между остатками цистеина контролируют, выбирая тип и концентрацию окисляющего вещества таким образом, чтобы эффективно оптимизировать образование желательного изомера. Например, окисления пептидного димера с преимущественным (по сравнению с образованием межмолекулярных дисульфидных связей) образованием двух внутримолекулярных дисульфидных связей (по одной в каждой пептидной цепи) достигают, когда окисляющее вещество представляет ДМСО (DMSO) или йодин (I₂).

В других способах реализации образование связей между остатками цистеина контролируют путем выборочного применения тиолзащитающих групп в ходе синтеза пептидов. Например, если желательно получить димер с двумя межмолекулярными дисульфидными связями, первый мономер синтезируют с двумя остатками цистеина в последовательности каркаса, защищенными первой тиолзащитающей группой [например, тритильной (Trt), аллилоксикарбонильной (Alloc), 1-(4,4-диметил-2,6-дициклооксигекс-1-илиден)этильной (Dde) и т.п.], затем синтезируют второй мономерный пептид с двумя остатками цистеина в коровой последовательности, защищенными второй тиолзащитающей группой [например, ацетамидометильной (AcM) t-бутильной (tBu) и т.п.]. После этого первую тиолзащитающую группу удаляют, что приводит к бисульфидной циклизации первого мономера, а затем удаляют вторую тиолзащитающую группу, что приводит к бисульфидной циклизации второго мономера.

В других способах реализации данного изобретения предусмотрены аналоги этих дисульфидных

производных, в которых один из атомов серы был заменен на группу CH_2 или другой изотер серы. Эти аналоги могут быть приготовлены из соединений согласно настоящему изобретению, в которых каждый пептидный мономер содержит по меньшей мере один остаток С или гомоцистеина и α -амино- γ -масляную кислоту вместо второго остатка цистеина, путем внутримолекулярного или межмолекулярного замещения, которое производят, известными в данной области способами [см., например, Barker et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048 и Or et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149]. Специалист в данной области легко поймет, что этого замещения может также добиться, используя другие гомологи α -амино- γ -масляной кислоты и гомоцистеина.

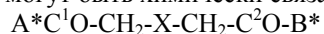
В дополнение к описанным выше стратегиям циклизации, можно применять другие стратегии циклизации пептидов, не связанные с образованием дисульфидных связей. Такие альтернативные стратегии циклизации включают, например, стратегии амидной циклизации наравне со стратегиями, связанными с образованием тиоэфирных связей. Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в циклической форме, либо с внутримолекулярной амидной связью, либо с внутримолекулярной тиоэфирной связью. Например, может быть синтезирован пептид, в котором один цистеин коровой последовательности заменен на лизин, а второй цистеин заменен на глутаминовую кислоту. Следовательно, циклический мономер может быть образован посредством образования амидной связи между боковыми радикалами этих двух остатков. В качестве альтернативы может быть синтезирован пептид, в котором один цистеин последовательности каркаса заменен на лизин (или серин). Тогда циклический мономер может быть образован посредством образования тиоэфирной связи между боковыми радикалами этого лизина (или серина) и второго остатка цистеина последовательности каркаса. По существу, в дополнение к стратегиям дисульфидной циклизации для циклизации пептидов согласно настоящему изобретению можно без труда применять как стратегию амидной циклизации, так и стратегию тиоэфирной циклизации. В качестве альтернативы, к N-концу пептида может быть присоединена α -замещенная уксусная кислота («экспирование конца пептида»), где α -замещенная уксусная кислота представляет собой отделяемую группу, такую как α -галоуксусная кислота, например, α -хлоруксусная кислота, α -бромуксусная кислота или α -йодоуксусная кислота.

Добавление линкера на основе разветвленного третичного амида.

Пептидные мономеры могут быть димеризованы разветвленным третичным амидным линкерным фрагментом. В одном из способов реализации линкер вводят в пептид в ходе синтеза пептида. Например, если линкерный L_k фрагмент содержит две функциональные группы, которые могут служить сайтами инициации для синтеза пептида и одну или более других функциональных групп (например, карбоксильную группу или аминогруппу), которые дают возможность связывать один или более молекулярных фрагментов, линкер может быть конъюгирован с твердым носителем. После этого можно синтезировать два пептидных мономера непосредственно на двух химически активных группах азота линкерного L_k фрагмента (вариант методики твердофазного синтеза).

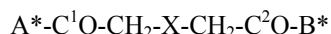
В альтернативных способах реализации линкер может быть конъюгирован с двумя пептидными мономерами пептидного димера после синтеза пептидов. Такая конъюгация может быть достигнута способами, хорошо разработанными в данной области. В одном из способов реализации линкер содержит две функциональные группы, подходящие для присоединения к функциональным группам-мишеням синтезированных пептидных мономеров. Например, может быть проведена реакция линкера, содержащего две карбоксильные группы, либо предварительно активированные, либо в присутствии подходящего связующего реагента с аминогруппами-мишенями бокового радикала лизина каждого из двух пептидных мономеров.

Например, пептидные мономеры могут быть химически связаны с третичным амидным линкером

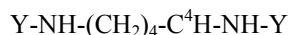


где X обозначает $\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-Y$, а Y обозначает подходящую защитную группу, такую как *t*-бутилоксикарбонильная (Boc) защитная группа, A^* обозначает подходящую функциональную группу, такую как N-оксисукцинимид, используемый для конъюгирования C^2 линкера с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина второго пептидного мономера.

Дополнительно, например, пептидные мономеры могут быть химически связаны с третичным амидным линкером



где X обозначает $\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-C^3O$, A^* обозначает подходящую функциональную группу, такую как N-оксисукцинимид, используемую для конъюгирования C^1 линкера с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина первого пептидного мономера, а B^* обозначает подходящую функциональную группу, такую как N-оксисукцинимид, используемую для конъюгирования C^2 линкера с ϵ -аминогруппой C-концевого остатка лизина второго пептидного мономера, а третичный амидный линкер химически связан со спейсерным фрагментом



где C^3 , входящий в X, ковалентно связан с C^4 спейсера, а Y обозначает подходящую защитную группу, такую как *t*-бутилоксикарбонильная (Boc) защитная группа.

Добавление линкера на основе лизина.

Пептидные мономеры могут быть димеризованы лизиновым L_k линкерным фрагментом. В одном из способов реализации лизиновый линкер вводят в пептид в ходе синтеза пептида. Например, если лизиновый линкерный L_k фрагмент содержит две функциональные группы, которые могут служить сайтами инициации для синтеза пептида, и одну или более функциональных групп (например, карбоксильную группу или аминогруппу), которая дает возможность связывать один или более молекулярных фрагментов, линкер может быть конъюгирован к твердому носителю. После этого можно синтезировать два пептидных мономера непосредственно на двух химически активных группах азота лизинового линкерного L_k фрагмента (вариант методики твердофазного синтеза).

В альтернативных способах реализации, в которых пептидные димер димеризуют лизиновым линкерным L_k фрагментом, указанный линкер может быть конъюгирован с двумя пептидными мономерами пептидного димера после синтеза пептидов. Такая конъюгация может быть достигнута способами, хорошо разработанными в данной области. В одном из способов реализации линкер содержит по меньшей мере две функциональные группы, подходящие для присоединения к функциональным группам-мишеням синтезированных пептидных мономеров. Например, может быть проведена реакция двух свободных аминогрупп лизина с С-концевыми карбоксильными группами каждого из пептидных мономеров.

Добавление спейсера.

Пептидные соединения согласно данному изобретению содержат также спейсерный фрагмент. В одном из способов реализации спейсерный фрагмент может быть введен в пептид в ходе синтеза пептида. Например, если спейсер содержит свободную аминогруппу и вторую функциональную группу (например, карбоксильную группу или аминогруппу), которая дает возможность связывания с другим молекулярным фрагментом, спейсер может быть конъюгирован с твердым носителем.

В одном из способов реализации спейсер, содержащий две функциональные группы, вначале связывают с твердым носителем при помощи первой функциональной группы. Затем лизиновый линкерный L_k фрагмент, имеющий две функциональные группы, которые могут служить сайтами инициации синтеза пептидов, и третью функциональную группу (например, карбоксильную группу или аминогруппу), которая обеспечивает связывание с другим молекулярным фрагментом, конъюгируют со спейсером через вторую функциональную группу спейсера и третью функциональную группу линкера. После этого можно синтезировать два пептидных мономера непосредственно на двух функциональных азотных группах лизинового линкерного L_k фрагмента (вариант методики твердофазного синтеза). Например, можно провести реакцию связанного с твердым носителем спейсера со свободной аминогруппой с лизиновым линкером через свободную карбоксильную группу линкера.

В альтернативных способах реализации спейсер может быть конъюгирован с двумя пептидными мономерами пептидного димера после синтеза пептидов. Такая конъюгация может быть достигнута способами, хорошо разработанными в данной области. В одном из способов реализации линкер содержит по меньшей мере одну функциональную группу, подходящую для присоединения к функциональным группам-мишеням синтезированных пептидных мономеров. Например, может быть проведена реакция спейсера со свободной аминогруппой с С-концевой карбоксильной группой пептида. В другом примере, может быть проведена реакция свободной карбоксильной группы линкера со свободной аминогруппой амида лизина.

Присоединение полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG).

В последние годы водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, применяют для модификации диагностически и терапевтически важных пептидов. Считается, что присоединение таких полимеров увеличивает биологическую активность, продлевает время циркуляции в крови, снижает иммуногенность, увеличивает растворимость в воде и повышает устойчивость к расщеплению протеазами. Например, сообщалось, что ковалентное присоединение ПЭГ к терапевтическим пептидам, таким как интерлейкины [Knauf et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15064; Tsutsumi et al. (1995) *J. Controlled Release* 33:447], интерфероны (Kita et al. (1990) *Drug Des. Delivery* 6:157), каталаза (Abuchowski et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:582), супероксид дисмутаза (Beauchamp et al. (1983) *Anal. Biochem.* 131:25) и аденозин деаминаза (Chen et al. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 660:293), увеличивает время их полужизни *in vivo* и/или снижает их иммуногенность и антигенность.

Пептидные соединения согласно данному изобретению могут содержать фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), который ковалентно присоединен к разветвленному третичному амидному линкеру карбаматной связью или амидной связью. Пример ПЭГ, используемый в настоящем изобретении, представляет собой линейный неразветвленный ПЭГ, имеющий молекулярную массу от примерно 20 до примерно 40 кДа («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше указанной молекулярной массы). Предпочтительно ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 30 до примерно 40 кДа.

Другой пример ПЭГ, используемого в настоящем изобретении, представляет собой линейный ПЭГ, имеющий молекулярную массу от примерно 10 до примерно 60 кДа («примерно» указывает на то, что в препаратах ПЭГ некоторые молекулы будут иметь массу больше, а некоторые - меньше указанной моле-

кулярной массы). Предпочтительно ПЭГ имеет молекулярную массу от примерно 20 до примерно 40 кДа. Более предпочтительно ПЭГ имеет молекулярную массу примерно 20 кДа.

Примеры способов ковалентного присоединения ПЭГ (ПЭГирования) описаны ниже. Эти иллюстративные описания не призваны быть ограничивающими. Средний специалист в данной области поймет, что в данной области хорошо известно множество различных способов ковалентного присоединения разнообразных видов ПЭГ. Также, настоящее изобретение охватывает пептидные соединения, к которым был присоединен ПЭГ любым из ряда известных в данной области способов присоединения.

Например, ПЭГ может быть ковалентно связан с линкером через химически активную группу, с которой может быть связана молекула ПЭГ (например, свободная карбоксильная или аминогруппа). Молекулы ПЭГ можно присоединить к аминогруппе, используя метоксилированный ПЭГ («мПЭГ», «mPEG»), имеющий различные химически активные фрагменты. Такие полимеры включают мПЭГ-сукцинимидил сукцинат, мПЭГ-сукцинимидил карбонат, мПЭГ-имидаз, мПЭГ-4-нитрофенил карбонат и хлорид мПЭГ-циануровой кислоты. Аналогично, молекулы ПЭГ можно присоединить к карбоксильным группам, используя метоксилированный ПЭГ со свободной аминогруппой («мПЭГ-NH₂», «mPEG-NH₂»).

В некоторых способах реализации линкер или спейсер содержит концевую аминогруппу (т.е. расположенную на конце спейсера). Можно проводить реакции этой концевой аминогруппы с подходящей активированной молекулой ПЭГ, такой как мПЭГ-пара-нитрофенилкарбонат (мПЭГ-НФК, mPEG-NPC), в результате которой образуется прочная карбаматная связь. В качестве альтернативы, можно проводить реакции этой концевой аминогруппы с подходящим образом активированной молекулой ПЭГ, такой как мПЭГ-сукцинимидил бутират (mPEG-SBA) или мПЭГ-сукцинимидил протиионат (mPEG-SPA), содержащей химически активную N-гидроксил-сукцинимидную группу (NHS), в результате которой образуется стабильная карбаматная связь. В других способах реализации химически активная группа линкера содержит карбоксильную группу, которую можно активировать для образования ковалентной связи с аминсодержащей молекулой ПЭГ в подходящих реакционных условиях. Подходящие молекулы ПЭГ включают мПЭГ-NH₂, а подходящие реакционные условия включают карбоимид-опосредованное образование амидов или ему подобные.

Методики анализа активности агонистов ЭПО-рецепторов.

Методики функционального анализа *in vitro*.

При анализе конкурентного связывания *in vitro* количественно определяют способность тестируемых пептидов конкурировать с ЭПО за связывание с ЭПО-рецептором. Например (см., например, описание в патенте США U.S. Patent 5733569), внеклеточный домен ЭПО-рецептора человека (ЭПО-связывающий белок, ЭСБ) может быть получен по технологии рекомбинантных ДНК в клетках *E.coli*, а рекомбинантный белок, связанный с твердым носителем (подложкой), таким как поверхность ячейки микротитрационного планшета или синтетическая гранула (bead) [например, Sulfolink beads от Pierce Chemical Co. (Рокфорд, Иллинойс, США)]. Затем иммобилизованный ЭСБ инкубируют с меченым рекомбинантным ЭПО, либо с меченым рекомбинантным ЭПО и тестируемым пептидом. В таких экспериментах применяют серийные разведения тестируемого пептида. По результатам анализа без добавления тестируемого пептида определяют полное связывание ЭПО с ЭСБ. Для реакций, в которых присутствует тестируемый пептид, определяют количество связанного ЭПО и выражают его в процентных долях от связывания контроля (полное связывание=100%). Строят график, на котором эти значения откладывают против концентрации пептида. Значение IC₅₀ определяют как концентрацию тестируемого пептида, при которой связывание ЭПО с ЭСБ уменьшается на 50% (т.е. 50% ингибирование связывания ЭПО).

В другом способе анализа конкурентного связывания *in vitro* измеряют световой сигнал, генерируемый как функция близости двух гранул: ЭПО-конъюгированной гранулы и ЭПО-рецептор-конъюгированной гранулы. Близость гранул порождается связыванием ЭПО и ЭПР-рецептора. Тестируемый пептид, который конкурирует с ЭПО за связывание с ЭПО-рецептором, будет препятствовать этому связыванию, вызывая уменьшение свечения. Концентрацию тестируемого пептида, при которой происходит ослабление свечения на 50%, определяют как значение IC₅₀.

Пептиды согласно настоящему изобретению очень эффективно конкурируют с ЭПО за связывание с ЭПО-рецепторами. Проявлением этой усиленной функции является их способность ингибировать связывание ЭПО в очень низких концентрациях (т.е. они обладают очень низкими значениями IC₅₀).

Биологическую активность и эффективность мономерных и димерных пептидов - агонистов ЭПО-рецептора можно измерить, используя клеточные функциональные методики анализа.

Один способ анализа основан на применении В-клеток-предшественников, экспрессирующих ЭПО-рецептор человека и трансфецированных с конструкцией, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем промотора *fos*. На воздействие ЭПО или другого агониста ЭПО-рецептора, такие клетки отвечают синтезом люциферазы. При добавлении к своему субстрату, люциферину, люцифераза вызывает свечение. Следовательно, уровень активации ЭПО-рецепторов в таких клетках можно количественно определить, измеряя активность люциферазы. Активность тестируемого пептида измеряют путем добавления серийных разведений тестируемого пептида к клеткам, которые затем инкубируют в течение 4 ч. После инкубации к клеткам добавляют субстрат - люциферин и измеряют интенсивность свечения. Концентрация тестируемого пептида, при которой интенсивность свечения равна половине максимального

значения, обозначают как EC50.

Пептиды согласно настоящему изобретению демонстрируют в этом способе анализа существенно повышенную способность усиливать зависимую от передачи сигнала с ЭПО-рецептора экспрессию люциферазы. Проявлением этой усиленной функции является их способность давать интенсивность свечения, равную половине максимального значения, при значительно более низких концентрациях пептида (т.е. они обладают очень низкими значениями EC50). Этот способ анализа является предпочтительным способом оценки эффективности и активности пептида - агониста ЭПО-рецептора согласно данному изобретению.

Можно применить другую методику анализа с использованием клетки линии FDC-P1-ER [Dexter et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152:1036-1047], хорошо описанной нетрансформированной клеточной линии, полученной из костного мозга мыши, в которую был стабильно трансфицирован ЭПО-рецептор. Эти клетки демонстрируют ЭПО-зависимую пролиферацию.

В одном из вариантов этого способа анализа клетки выращивают до получения половины стационарной плотности в присутствии необходимых факторов роста (См., например, описание в патенте США U.S. Patent 5773569). Затем клетки промывают ФБР и оставляют на 16-24 ч в полной среде без факторов роста. После определения жизнеспособности клеток (например, окрашиванием трипановым синим), готовят маточные растворы (в полной среде без факторов роста) с концентрацией примерно 10^5 клеток на 50 мкл. Готовят серийные разведения пептидных соединений - агонистов ЭПО-рецептора (обычно свободный пептид в фазе раствора, в отличие от фаг-связанного или иммобилизованного пептида), которые необходимо протестировать, в 96-луночной планшете для культур тканей; конечный объем разведений - 50 мкл в каждой лунке. В каждую лунку добавляют клетки (50 мкл), клетки инкубируют в течение 24-48 ч, после чего клетки в негативных контролях должны перейти в состояние покоя или прекратить деление. Затем измеряют клеточную пролиферацию, применяя хорошо известные в данной области методики, такие как тест с МТТ, в котором определяют включение H^3 -тимидина в качестве индикатора клеточной пролиферации [См. Mosmann (1983) *J. Immunol. Methods* 65:33-63]. Действие пептидов проверяют как на линии клеток, экспрессирующих ЭПО-рецептор, так и родительской, неэкспрессирующей клеточной линии. Концентрацию тестируемого пептида, необходимую для того, чтобы получить половину максимальной клеточной пролиферации, вносят в протокол как EC50.

Пептиды согласно настоящему изобретению демонстрируют существенно повышенную способность стимулировать клеточную пролиферацию. Проявлением этой усиленной функции является их способность давать половину максимальной пролиферации при существенно более низких концентрациях пептида (т.е. они обладают очень низкими значениями EC50). Этот способ анализа является предпочтительным способом оценки эффективности и активности пептида - агониста ЭПО-рецептора согласно данному изобретению.

В другом способе анализа клетки выращивают до стационарной фазы в среде, дополненной ЭПО, собирают, а затем культивируют в течение дополнительных 18 ч в среде без ЭПО. Клетки делят на три группы с равной плотностью клеток: одна группа без добавления чего-либо (отрицательный контроль), группа с ЭПО (положительный контроль) и экспериментальная группа с тестируемым пептидом. Затем в разные моменты времени культивируемые клетки собирают, фиксируют и красят ДНК-связывающимся флуоресцентным красителем (например, коммерчески доступными (Sigma) йодидом пропидия или красителем Hoechst). Затем измеряют флуоресценцию, например, на поточном сканирующем цитометре FACS. Процентное отношение клеток в каждой фазе клеточного цикла можно определить, например, используя модель SOBR программного пакета CallFit (Becton Dickinson). Клетки, обработанные ЭПО или активным пептидом, продемонстрируют увеличенную, по сравнению с группой отрицательного контроля долю клеток в фазе S (что определяется по повышенной флуоресценции (индикатор повышенного содержания ДНК)).

Можно проводить аналогичные тесты с использованием клеточных линий FDCP-1 [См., например, Dexter et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152:1036-1047] или TF-1 [Kitamura et al. (1989) *Blood* 73:375-380]. FDCP-1 представляет собой линию зависимых от фактора роста мультипотентных примитивных клеток мыши - предшественников клеток гематопозитического ряда, способных к пролиферации, но не к дифференцировке, в среде, кондиционированной WEHI-3 (среда, которая содержит интерлейкин IL-3, коллекция ATCC номер TIB-68). Для таких экспериментов клетки линии FDCP-1 трансфицируют ЭПО-рецептором человека или мыши, в результате чего получают клеточные линии FDCP-1-hEPO-R или FDCP-1-mEPO-R, соответственно, способные к пролиферации, но не к дифференцировке, в присутствии ЭПО. ЭПО-зависимая клеточная линия TF-1 может также быть использована для измерения воздействия пептидных агонистов ЭПО-рецептора на пролиферацию клеток.

В другом способе анализа для выяснения способности соединений согласно настоящему изобретению служить агонистами ЭПО может быть использована процедура, изложенная в Krystal (1983) *Exp. Hematol* 11:649-660 для микроанализа, основанного на включении H^3 -тимидина в клетки селезенки. Вкратце, мышам В6С3F₁ ежедневно в течение двух дней путем инъекции вводят фенилгидразин (60 мг/кг). На третий день берут клетки селезенки и МТТ-способом анализа выясняют их способность пролиферировать в течение 24 ч.

Связывание ЭПО с ЭПО-рецептором в эритропоэтин-чувствительных клетках индуцирует фосфорилирование остатков тирозина как рецептора, так и многочисленных внутриклеточных белков, включая киназы She, *vav* и JAK2. Соответственно, в другом способе анализа *in vitro* измеряют способность пептидов согласно данному изобретению индуцировать фосфорилирование остатков тирозина ЭПО-рецептора и следующих за ним рецепторов белков системы внутриклеточной сигнализации. Пептиды, идентифицированные как активные в ходе описанных выше анализов связывания и пролиферации, вызывают фосфорилирование остатков тирозина по схеме, практически идентичной схеме фосфорилирования остатков тирозина, вызываемого ЭПО в эритропоэтин-чувствительных клетках. При этом способе анализа клетки FDC-P1/ER [Dexter et al. (1980) *J Exp Med* 152:1036-47] выдерживают в среде, дополненной ЭПО, до тех пор, пока не будет достигнута стационарная фаза роста. Затем эти клетки культивируют в среде без ЭПО в течение 24 ч. Затем определенное число таких клеток инкубируют с тестируемым пептидом в течение приблизительно 10 мин при 37°C. В каждый анализ также включают контрольные пробы клеток с ЭПО. Затем обработанные клетки собирают путем центрифугирования, ресуспендируют в лизирующем буфере с SDS, и подвергают электрофорезу в SDS-полиакриламидном геле. После электрофореза белки переносят на нитроцеллюлозу и визуализируют фосфотирозинсодержащие белки на блоте (фильтре) по стандартным иммунологическим методикам. Например, на блот можно нанести антифосфотирозинное антитело (например, антифосфотирозин IgG мыши, Upstate Biotechnology, Inc), промыть, а затем нанести второе антитело [например, меченное пероксидазой антитело козы против мышиных IgG, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Вашингтон, Колумбия, США)]. После этого фосфотирозинсодержащие белки можно визуализировать по стандартным методикам, включающим колориметрический, хемилюминесцентный и флуоресцентный анализы. Например, можно провести хемилюминесцентный анализ, используя систему ECL Western Blotting System (Amersham).

Другим способом анализа в клеточной системе *in vitro*, который можно использовать для оценки активности пептидов, является анализ колоний, в котором используют клетки костного мозга мыши или клетки периферической крови человека. Костный мозг мыши может быть получен из бедренных костей мышей, а периферическую кровь человека можно получить у здорового донора. В случае, когда используют периферическую кровь, вначале из крови выделяют мононуклеары путем, например, центрифугирования в градиенте фиколла Ficoll-Hypack [Stem Cell Technologies, Inc. (Ванкувер, Канада)]. В этом анализе для того, чтобы определить число и концентрацию ядерных клеток в первоначальной пробе, проводят подсчет клеток. Определенное число клеток наносят на метилцеллюлозу согласно инструкциям производителя [Stem Cell Technologies, Inc. (Ванкувер, Канада)]. Экспериментальную группу клеток обрабатывают тестируемым пептидом, ЭПО, группу положительного контроля обрабатывают ЭПО, а группу отрицательного контроля не подвергают обработке. Затем после определенных периодов инкубации (обычно, 10 дней и 18 дней) подсчитывают число растущих колоний для каждой группы. Активный пептид будет стимулировать образование колоний.

Другие *in vivo* биологические анализы, которые можно использовать для демонстрации активности пептидов согласно настоящему изобретению, описаны в Greenberger et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2931-2935 (линия ЭПО-зависимых клеток-предшественников гематопоза), Quelle and Wojchowski (1991) *J. Biol. Chem.* 266:609-614 (фосфорилирование остатков тирозина белков в клетках B6StU.EP), Dusanter-Fourt et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:10670-10678 (фосфорилирование остатков тирозина ЭПО-рецептора в ЭПО-чувствительных клетках человека), Quelle et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:17055-17060 (фосфорилирование остатков тирозина цитоплазматического белка, pp100 в клетках FDC-ER), Worthington et al. (1987) *Exp. Hematol.* 15:85-92 (колориметрический анализ для гемоглобина), Kaiho and Miuno (1985) *Anal. Biochem.* 149:117-120 (определение гемоглобина при помощи 2,7-диаминофлуорена), Patel et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:21300-21302 (экспрессия *c-myc*), Witthuhn et al. (1993) *Cell* 74:227-236 (сборка и фосфорилирование остатков тирозина белка JAK2), Leonard et al. (1993) *Blood* 82:1071-1079 (экспрессия факторов транскрипции GATA), Ando et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9571-9575 (регуляция перехода G1 путем циклизации D2 и D3).

Недавно появились сообщения о том, что прибор, разработанный Molecular Devices Corp. и известный как микрофизиометр, успешно применяют для измерения воздействия агонистов и антагонистов на различные рецепторы. Основу действия этого аппарата составляет измерение изменений скорости закисления внеклеточной среды в ответ на активацию рецептора.

Методики функционального анализа *in vivo*.

Одной из методик функционального анализа *in vivo*, которая может быть использована для оценки эффективности тестируемого пептида, является биотест с использованием постгипоксийных полицистемических мышей. Для этого анализа мышей в течение нескольких дней подвергают циклу чередующихся тренировок. В этом цикле мыши попеременно проходят периоды гипобарических условий и условий с повышенным давлением окружающей среды. После этого мышей в течение 2-3 дней до введения тестируемых проб держат при повышенном давлении окружающей среды. Пробы пептидов, либо, в случае положительного контроля, стандартный ЭПО, вводят кондиционированным (тренированным) мышам путем подкожной инъекции. Через 2 дня вводят радиомеченное железо (например, Fe⁵⁹), а через 2 дня после введения радиомеченного железа берут пробы крови. Затем для каждой пробы крови определяют

гематокрит и радиоактивность по стандартным методикам. Пробы крови мышей, которым путем инъекции были введены активные тестируемые пептиды, будут демонстрировать более высокую радиоактивность (вследствие связывания Fe^{59} гемоглобином эритроцитов), чем пробы крови мышей, не получавших тестируемые пептиды или ЭПО.

Другим способом функционального анализа *in vivo*, который можно использовать для оценки эффективности тестируемых пептидов, является анализ ретикулоцитов. Для проведения этого анализа нормальным, не получающим никаких веществ мышам, в течение трех дней (последовательно) вводят путем подкожной инъекции либо ЭПО, либо тестируемый пептид. На третий день мышам также вводят путем внутрибрюшинной инъекции декстрана железа (Iron Dextran). На пятый у мышей отбирают кровь. Определяют процент (%) ретикулоцитов в каждом образце крови путем окраски тиазоловым оранжевым и поточного цитометрического анализа (программа подсчета эритроцитов *retic-count*). Дополнительно, ручным способом определяют Гематокрит. Уточненный процент ретикулоцитов определяют по следующей формуле:

$$\% \text{РЕТИКУТОЧЕННЫЙ} = \% \text{РЕТИКУНАБЛЮДАЕМЫЙ} \times (\text{Гематокритиндивидуальный} / \text{Гематокритнормальный})$$

Применение пептидов - агонистов ЭПО-рецептора согласно данному изобретению.

Пептидные соединения согласно данному изобретению полезны в качестве применяемых *in vitro* инструментов для понимания биологической роли ЭПО, включая исследование многих факторов, которые, как считают, влияют на продуцирование ЭПО и связывания ЭПО с ЭПО-рецептором и на которые влияет продуцирование ЭПО и связывание ЭПО с ЭПО-рецептором (например, механизм передачи сигналов с ЭПО/ЭПО-Р/активации рецепторов). Настоящие пептиды также могут быть полезны в разработке других соединений, которые связываются с ЭПО-рецептором, поскольку настоящие пептиды дают важную информацию об отношении структура-активность, которая облегчает эти разработки.

Более того, благодаря своей способности связываться с ЭПО-рецептором, пептиды согласно настоящему изобретению могут быть использованы в качестве реагентов для определения ЭПО-рецептора на живых клетках, фиксированных клетках, в биологических жидкостях, в гомогенатах тканей, в очищенных, природных биологических материалах и т.д. Например, снабжая такие пептиды меткой, можно идентифицировать клетки, имеющие на своих поверхностях ЭПО-рецептор. Дополнительно, благодаря их способности связывать ЭПО-рецептор, пептиды согласно настоящему изобретению можно применять для окрашивания *in situ*, в методе FACS (активированной флуоресценцией сортировки клеток), Western blotting, в твердофазном ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ) и т.д. Дополнительно, благодаря их способности связывать ЭПО-рецептор, пептиды согласно настоящему изобретению можно применять для очистки рецепторов или очистки клеток, экспрессирующих ЭПО-рецептор на свою поверхность (или внутри клеток с нарушенной мембраной).

Пептиды согласно данному изобретению можно также применять в качестве коммерческих реагентов для различных медицинских исследовательских и диагностических целей. Такие применения включают, без ограничения, (1) применение в качестве калибровочных стандартов для количественного определения активности предполагаемых агонистов ЭПО-рецепторов в различных функциональных анализах, (2) применение в качестве блокирующих реагентов в случайном скрининге пептидов (т.е. при поиске новых семейств пептидов - лигандов ЭПО-рецептора, которые можно выявлять по блокированию связывания пептидов согласно данному изобретению), (3) применение в сокристаллизации с ЭПО-рецептором, т.е. могут быть образованы кристаллы пептида согласно настоящему изобретению, связанного с ЭПО-рецептором, что делает возможным определение структуры рецептора/пептида путем рентгеноструктурного анализа, (4) применение для измерения способности клеток-предшественников эритроцитов индуцировать синтез глобина и синтез железосодержащих комплексов, а также увеличивать число рецепторов к ферритину путем инициации дифференцировки, (5) применение для поддержания пролиферации и роста ЭПО-зависимых клеточных линий, таких как EDCP-1-mEPO-R и TF-1, (6) применение, относящееся к присоединению радиоактивного хромофора (метки) к пептидам согласно данному изобретению, и (7) другие исследовательские и диагностические приложения, в которых ЭПО-рецептор предпочтительно является активированным, либо такая активация удобно откалибрована относительно количества ЭПО-рецептора и т.п.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения и изготовления лекарства. Пептидные соединения согласно настоящему изобретению можно вводить теплокровным животным, включая человека, с целью стимулировать связывание ЭПО с ЭПО-рецептором *in vivo*. Следовательно, настоящее изобретение включает способы терапевтического лечения нарушений, связанных с недостаточностью (дефицитом) ЭПО, каковые методы включают введение пептида согласно данному изобретению в количествах, достаточных, чтобы стимулировать ЭПО-рецепторы и, следовательно, облегчить симптомы, связанные с недостаточностью ЭПО *in vivo*. Например, пептиды согласно этому изобретению найдут применение в лечении почечной недостаточности и/или терминальной стадии нарушения функции почек/диализа, анемии на фоне СПИД, анемии, ассоциированной с хроническими воспалительными заболеваниями (например, ревматоидным артритом или хроническим воспалением кишечника) и аутоиммунным заболеванием, а также для стимуляции увеличения числа эритроцитов у пациента

перед операцией. Другие болезненные состояния, нарушения и состояния гематологических нарушений включают бета-талассемию, кистозный фиброз (муковисцидоз), нарушения менструального цикла и беременности, анемии недоношенных детей, повреждения спинного мозга, космический полет, старение, инсульт, ишемия (как ЦНС, так и сердца) разнообразные опухолевые заболевания, сопровождающиеся нарушенным эритропоэзом.

В других способах реализации пептидные соединения согласно данному изобретению можно применять для лечения расстройств, которые не характеризуются низким или недостаточным (дефицитным) содержанием эритроцитов, например подготовка к переливанию крови. Дополнительно, введение соединений согласно этому изобретению может привести к уменьшению продолжительности кровотечения, и, следовательно, найдут применение для введения пациентам перед хирургическими операциями или в случаях, когда можно ожидать, что произойдет кровотечение. Дополнительно, соединения согласно этому изобретению найдут применение в активации мегакариоцитов.

Поскольку было показано, что ЭПО обладает митогенетическим и хемотактическим эффектом на центральные холинэргические нейроны [См., например, Amagnostou et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5978-5982 и Konishi et al. (1993) Brain Res. 609:29-35], соединения согласно этому изобретению также найдут применение в лечении различных сосудистых нарушений, таком как стимуляция заживления ран, стимуляция роста коллатеральных кровеносных сосудов сердца (такое, как может иметь место после инфаркта миокарда), лечение травм и лечение после трансплантации сосудов. Соединения согласно этому изобретению также найдут применение в лечении различных неврологических расстройств, характеризующихся в целом низким абсолютным уровнем ацетилхолина или низкими относительными уровнями ацетилхолина по сравнению с другими нейроактивными веществами, например, нейротрансмиттерами.

Фармацевтические составы.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические составы вышеупомянутых пептидных соединений - агонистов ЭПО-рецепторов. Состояния, которые облегчает или корректирует введение таких составов, включают указанные выше. Такие фармацевтические составы могут предназначаться для перорального, парентерального (внутримышечного, внутривенного, внутривенного или подкожного), чрескожного (пассивного либо с применением ионофореза или электропорации) путей введения, введения через слизистые оболочки (назально, ректально, вагинально или сублингвально), либо с использованием биоразрушаемых вставок, и могут быть приготовлены в виде лекарственных форм, подходящих для каждого из путей введения. В целом, данное изобретение охватывает фармацевтические составы, содержащие терапевтически эффективные количества пептида-агониста ЭПО-рецептора, или производных продуктов, согласно данному изобретению вместе с фармацевтически приемлемыми дилуентами (разбавителями), консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями. Такие составы включают дилуенты, содержащие различные буферные вещества (например, Трис-НСI, ацетат, фосфат), с различными значениями pH и ионной силы, добавки, такие как ПАВ и солюбилизирующие вещества (например, Tween 20, Tween 80, Polysorbate 80), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфат натрия), консерванты (например, Thimersol, бензиловый спирт) и наполнители (например, лактоза, маннитол); продукты слияния данного материала с конкретными препаратами полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота и т.д. или с липосомами. Также может быть использована гиалуроновая кислота. Такие составы могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo*, и скорость клиренса *in vivo* настоящих белков и производных. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е издание (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) с. 1435-1712, которые включены сюда путем ссылки. Составы могут быть приготовлены в жидкой форме или в форме высушенного порошка (например, лиофилизованного).

Пероральная доставка.

Здесь рассмотрено применение твердых лекарственных форм для перорального применения, которые описаны в Главе 89 18-го издания Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), которая включена сюда путем ссылки. Твердые лекарственные формы включают таблетки, капсулы, пилюли, троше или пастилки, саше (облатки), болюсы, порошки или гранулы. Также для приготовления лекарственных форм составов согласно данному изобретению может быть применено заключение в липосомальную или белковую капсулы (как, например, белковые микросферы, описанные в патенте США U.S. Patent № 4925637). Может быть применено заключение в липосому, а липосомы могут быть модифицированы разнообразными полимерами (например, патент США U.S. Patent № 5013556).

Описание возможных лекарственных форм для терапевтических веществ дано у Marshall, K. в Modern Pharmaceutics под ред. G.S. Banker, C.T. Rhodes, Глава 10, 1979 и включено в данное описание путем ссылки. В целом, рецептура будет включать пептиды-агонисты ЭПО-рецептора (или их химически модифицированные формы) и инертные ингредиенты, которые обеспечивают защиту от среды желудка и высвобождение биологически активного материала в кишечнике.

Также здесь рассмотрено применение жидких лекарственных форм для перорального введения,

включая фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии и сиропы, которые могут содержать другие компоненты, включая инертные дилуенты, адьюванты, такие как смачивающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подслащивающие вкусовые и ароматизирующие вещества.

Пептиды могут быть химически модифицированы таким образом, что пероральная доставка производных становится эффективной. Обычно, рассмотренная химическая модификация заключается в присоединении по крайней мере одного фрагмента молекулы самого компонента, где указанный компонент обеспечивает (а) ингибирование протеолиза и (б) всасывание в кровоток из желудка или кишечника. Также желателно увеличить общую стабильность компонента или компонентов, а также увеличить время циркуляции в организме. Как обсуждалось выше, присоединение ПЭГ является предпочтительной химической модификацией для фармацевтического применения. Другие фрагменты, которые могут быть использованы, включают пропиленгликоль, сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, спирт поливинил пирролидона, полипролин, поли-1,3-диоксолан и поли-1,3,6-тиоксолан [См., например, Abuchowski, Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," в *Enzymes as Drugs*, изд-во Hoenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY (Нью-Йорк)) pp. 367-383; и Newmark et al. (1982) *J. Appl. Biochem.* 4:185-189].

В случае лекарственных форм для перорального введения местом высвобождения может быть желудок, тонкий кишечник (двенадцатиперстная кишка, тощая кишка и подвздошная кишка) или толстый кишечник. Специалистам в данной области доступны лекарственные формы, которые не растворяются в желудке, но высвобождают материал в двенадцатиперстной кишке или каком-либо другом участке кишечника. Предпочтительно избегать отрицательного воздействия среды желудка на высвобождение либо путем защиты пептида (или производной), либо путем высвобождения пептида (или производной) вне среды желудка, например в тонком кишечнике.

Для того чтобы обеспечить устойчивость к среде желудка, необходима оболочка, непроницаемая при pH, равного по меньшей мере 5,0. Примерами наиболее обычных инертных ингредиентов, которые применяют в качестве растворяющихся в кишечнике оболочек, являются ацетат тримеллитат целлюлозы (САТ), фталат гидроксипропилметил целлюлозы (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, поливинилацетата фталат (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ацетат фталат целлюлозы (САР), Eudragit L, Eudragit S и Shellac. Эти оболочки можно применять в виде смешанных пленок.

Для таблеток можно также применять покрытие или смесь покрытий, которые не предназначены для защиты от среды желудка. Эти покрытия могут включать сахарные оболочки или оболочки, которые облегчают проглатывание таблеток. Капсулы могут состоять из твердой оболочки (такой, как желатиновая), предназначенной для доставки сухих терапевтических (т.е. порошка), для жидких форм можно применять мягкий желатин. Материал оболочки даже может представлять собой густой крахмал или другую съедобную бумагу. Для пилюлей, пастилок, формовых таблеток или таблетированных порошков можно применять методики обработки влажной массы.

Пептиды (или производные) могут быть включены в лекарственную форму в виде отдельных мелких частиц в форме гранул или шариков с размером частиц примерно 1 мм. Лекарственная форма материала для введения в капсуле может также представлять собой порошок, прессованную пластинку или даже таблетки. Эти терапевтические вещества могут быть приготовлены путем прессования.

Красители и/или вкусовые вещества также могут быть включены. Например, можно изготовить (таким способом, как инкапсулирование в липосому или микросферу) лекарственную форму, содержащую пептид (или производную) и затем ввести ее в съедобный продукт, такой как охлажденный напиток, содержащий краситель и вкусовое вещество.

Пептид (или производную) можно разбавить или увеличить его объем инертным материалом. Эти дилуенты (разбавители) могут включать углеводы, в особенности маннитол, α -лактозу, безводную лактозу, целлюлозу, сахарозу, модифицированные декстраны и крахмал. Также в качестве наполнителей можно использовать определенные неорганические соли, такие как трифосфат кальция, карбонат магния и хлорид натрия. Некоторые коммерчески доступные дилуенты: Fast-flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcoompress и Avicell.

В рецептуру терапевтического вещества в твердой лекарственной форме могут также быть включены дезинтегрирующие вещества. Материалы, используемые в качестве дезинтегрирующих веществ, включают, без ограничения, крахмал, коммерческое дезинтегрирующее вещество на основе крахмала, Explotab. Можно использовать крахмал гликолят натрия, Amberlite, натрий карбоксиметилцеллюлозу, ультрамилопектин, альгинат натрия, желатин, кожуру апельсина, кислую карбоксиметилцеллюлозу, природную губку и бентонит. Дезинтегрирующие вещества могут также представлять собой нерастворимые катионообменные смолы. В качестве дезинтегрирующих веществ можно также применять порошковые камеди, которые могут включать такие порошковые камеди, как агар, камедь карайи или трагакантовую камедь. Альгеновая кислота и ее натриевая соль также пригодны в качестве дезинтегрирующих веществ.

Для того чтобы связать пептидное (или производное) вещество для формирования твердой таблетки, можно применять связывающие вещества, которые включают натуральные материалы, такие как акация, трагакант, крахмал и желатин. Другие включают метилцеллюлозу (МЦ, МС), этилцеллюлозу (ЭЦ,

ЕС) и карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ, СМС). Для гранулирования пептида (или производных) можно применять поливинилпирролидон (ПВП, PVP) и карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ, СМС) в спиртовых растворах.

Для того чтобы предотвратить слипание в ходе приготовления, в рецептуру пептида (или производной) могут быть включены антифрикционные вещества. Смазывающие вещества можно применять в виде прослойки между пептидом (или производной) и стенкой гнезда матрицы. Эти смазывающие вещества могут включать, без ограничения, стеариновую кислоту, включая ее магниевые и кальциевые соли, политетрафлюороэтилен (ПТФЕ), жидкий парафин, масла и воски растительного происхождения. Можно также использовать растворимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния, полиэтиленгликоль разных молекулярных масс, Carbowax 4000 и 6000.

Скользкие вещества могут улучшить реологические свойства лекарственного вещества в ходе приготовления, и их можно добавлять для того, чтобы облегчить преобразования в ходе прессования. Скользящие вещества могут включать крахмал, тальк, пирогенный кварц и гидратный силикоалюминат.

Чтобы облегчить растворение пептида (или производной) в водной среде можно добавить поверхностно-активное вещество в качестве смачивающего вещества. Поверхностно-активные вещества могут включать анионные детергенты, такие как лаурилсульфат натрия, сульфосукцинат диоксида натрия и сульфонат диоксида натрия. Можно использовать катионные детергенты, которые могут включать хлорид бензалкония или хлорид бензэтония. Список потенциальных неионных детергентов, которые могут быть включены в рецептуру в качестве поверхностно-активных веществ, составляют lauromacrogol 400, polyoxyl 40 stearate (полиоксил стеарат), polyoxyethylene castor oil 10, 50 и 60 (полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло), glycerol monostearate (моностеарат глицерина), polysorbate 20, 40, 60, 65 и 80, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза. Эти поверхностно-активные вещества могут присутствовать в рецептуре белка или производной либо самостоятельно, либо в разных соотношениях в составе смесей.

Добавки, которые потенциально повышают всасывание пептида (или производной) представляют собой, например, жирные кислоты, олеиновую кислоту, линолевую кислоту и линоленовую кислоту.

Может быть желательно получить лекарственные формы для перорального введения с отложенным высвобождением. Пептид (или производная) может быть связан с инертным матриксом (основой), который делает возможным высвобождение по механизму диффузии или выщелачивания. Такой матрикс может представлять собой, например, камедь. Также в лекарственную форму могут быть введены медленно разрушающиеся матриксы. Некоторые растворяющиеся в кишечнике оболочки обладают эффектом отложенного высвобождения. Другая форма контролируемого высвобождения представлена способом, основанным на терапевтической системе Oros (Alza Corp.), т.е. лекарственное вещество заключено в полупроницаемую мембрану, которая позволяет воде проникать внутрь и выталкивать лекарственное вещество наружу через единственное маленькое отверстие благодаря осмотическим эффектам.

Для приготовления лекарственной формы могут быть использованы другие оболочки. Эти оболочки включают разнообразные сахара, которые могут быть нанесены на форму для изготовления оболочки. Пептид (или производную) также можно давать в виде покрытой пленкой таблетки, использованные в этом примере материалы разделены на две группы. К первой группе относятся «некишечные» материалы (т.е. материалы, которые растворяются не в кишечнике). Эта группа включает метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, метилгидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, повидон и полиэтиленгликоли. Вторая группа состоит из растворяющихся в кишечнике материалов, которые обычно представляют собой сложные эфиры фталевой кислоты.

Для получения оптимального пленочного покрытия можно использовать смесь материалов. Нанесение пленочного покрытия может быть произведено в формовом устройстве для нанесения покрытий, либо в псевдооживленном слое, либо путем напрессовывания покрытия.

Парентеральная доставка.

Препараты согласно этому изобретению для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии или эмульсии. Примерами неводных растворителей или разбавителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, такие как оливковое масло и кукурузное масло, желатин и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Такие лекарственные формы могут также содержать адьюванты, такие как консервирующие, смачивающие, эмульгирующие и диспергирующие вещества. Эти вещества могут быть стерилизованы, например, путем фильтрации через бактериальный фильтр, путем введения в состав стерилизующих средств, путем облучения составов или путем нагревания составов. Они также могут быть изготовлены с применением стерильной воды или какой-либо другой стерильной среды для инъекций, непосредственно перед использованием.

Ректальная или вагинальная доставка.

Составы для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые могут содержать, в дополнение к активному веществу, наполнители, такие как какао-масло или воск для суппозитория. Составы для назального или сублингвального введения также готовят

со стандартными наполнителями, хорошо известными в данной области.

Пулмональное введение (через легкие).

Здесь также рассмотрена пулмональная доставка пептидов-агонистов ЭПО-рецептора (или их производных). Пептид (или производная) доставляется в легкие млекопитающих при вдыхании и переходит через эпителиальную выстилку легкого в кровеносное русло [См., например, Adjei et al. (1990) *Pharmaceutical Research* 7:565-569; Adjei et al. (1990) *Int. J. Pharmaceutics* 63:135-144 (ацетат лейпролида), Braquet et al. (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13 (sup5):143-146 (эндотелин-1), Hubbard et al. (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212 (α 1-антитрипсин), Smith et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α -1-протеиназа), Oswein et al. (1990) "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado*, (рекомбинантный гормон роста человека), Debs et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (интерферон- γ и фактор некроза опухолей α) и Патент США U.S. Pat. № 5284656 (Platz et al.) (гранулоцит-колониестимулирующий фактор)]. Способ и состав для пулмональной доставки лекарственного вещества для системного действия описан в патенте США U.S. Pat. № 5451659, Wong et al.

Для применения в реализации этого изобретения предусмотрен широкий ряд механических приспособлений, сконструированных для пулмональной доставки терапевтических продуктов, включающий, без ограничения, небулайзеры, дозирующие ингаляторы и порошковые ингаляторы, каждый из которых хорошо известен специалистам в данной области. Некоторые конкретные примеры коммерчески доступных приспособлений, подходящих для реализации этого изобретения: небулайзер Ultravent (), небулайзер AcornII, дозирующий ингалятор Ventolin и порошковый ингалятор Spinhaler.

Все подобные приспособления требуют применения лекарственных форм, подходящих для дозирования пептида (или производной). Обычно каждая лекарственная форма специфична по отношению к типу используемого приспособления и может включать применение соответствующего пропеллента в дополнение к обычным дилуэнтам, адьювантам и/или носителям, применяемым в терапии. Также рассмотрено применение липосом, микрокапсул или микросфер, комплексов включений или других типов носителей. Химически модифицированные пептиды также можно приготовить в виде разных лекарственных форм, в зависимости от типа химической модификации или типа используемого приспособления. Также модифицированный пептид может быть приготовлен в разных лекарственных формах, в зависимости от типа химической модификации и применяемого устройства.

Лекарственные формы, подходящие для применения с небулайзерами, струйными или ультразвуковыми, обычно содержат пептид (или производную), растворенный в воде до концентрации примерно от 0,1 до 25 мг биологически активного белка на 1 мл раствора. Лекарственная форма может также включать буфер и обычный сахар (например, для стабилизации белка и регуляции осмотического давления). Лекарственная форма для небулайзера может также содержать поверхностно-активное вещество для предотвращения агрегации пептида (или производной) на поверхности, вызванное атомизацией раствора при образовании аэрозоля.

Лекарственная форма для применения в дозирующем ингаляторе будет, в общем случае, содержать тонкоизмельченный порошок, содержащий пептид (или производную), суспендированный в пропелленте при помощи поверхностно-активного вещества. Пропеллент может представлять собой обыкновенный материал, употребляемый обычно для этой цели, такой как хлорофлуороуглерод, гидрохлорофлуороуглерод, гидрофлуороуглерод, или углеводород, включая трихлорфлуорометан, дихлорфлуорометан, дихлортetraфлуорометанол и 1,1,1,2-тетрафлуорэтан, либо их комбинации. Подходящие поверхностно-активные вещества включают триолеат сорбита и лецитин сои. Также в качестве поверхностно-активного вещества можно применять олеиновую кислоту.

Лекарственные формы для дозирования из порошкового ингалятора будут содержать тонкоизмельченный сухой порошок, содержащий пептид (или производную), и также могут включать наполнитель, такой как лактоза, сорбитол, сахароза, маннитол в количествах, которые облегчают распыление порошка из приспособления, например от 50 до 90% массы лекарственной формы. Наиболее предпочтительно приготовление пептида (или производной) в форме частиц со средним размером, меньшим чем 10 мкм (или микрон), наиболее предпочтительно от 0,5 до 5 мкм, для наиболее эффективной доставки в нижние отделы легкого.

Назальная доставка.

Также рассмотрена назальная доставка пептидов-агонистов ЭПО-рецептора (или их производных). Назальная доставка делает возможным переход пептида в кровеносное русло непосредственно после введения терапевтического продукта в нос, без необходимости накопления этого продукта в легких. Лекарственные формы для назальной доставки включают формы, содержащие декстран или циклодекстран.

Дозировки.

По мере проведения дальнейших исследований будет появляться информация относительно подходящих уровней дозировки для лечения различных состояний у различных пациентов, и работник обычной квалификации сможет, принимая во внимание терапевтический контекст, возраст и общее состояние здоровья пациента, определить подходящую дозу. Выбранные дозировки зависят от желаемого терапев-

тического эффекта, пути введения и желаемой продолжительности лечения. Обычно млекопитающим ежедневно вводят дозировки от 0,001 до 10 мг/кг массы тела. Обычно дозировки для внутривенных инъекций могут быть ниже. Режим дозирования можно варьировать в зависимости от полужизни циркуляции и используемой лекарственной формы.

Пептиды согласно настоящему изобретению (или их производные) можно вводить совместно с одним или более дополнительных активных ингредиентов или фармацевтических составов.

Примеры.

Далее настоящее изобретение описано посредством следующих примеров. Однако эти и другие примеры, встречающиеся в данной спецификации, приведены исключительно в иллюстративных целях и ни в коем случае не ограничивают объем охвата и значение изобретения или какой-либо иллюстративной формы. Аналогично, данное изобретение не ограничивается каким-либо из описанных здесь конкретных предпочтительных способов реализации. Действительно, после прочтения данной спецификации, для специалиста в данной области станут очевидны многочисленные модификации и варианты данного изобретения, которые могут быть сделаны без отступления от идеи и области охвата изобретения. Следовательно, данное изобретение ограничено только приложенной формулой вместе с полной областью охвата, включающие все эквиваленты, на которые данная формула предоставляет право.

Пример 1. Синтез пептидных димеров - агонистов ЭПО-рецептора путем твердофазного синтеза.

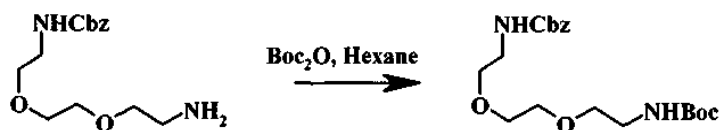
Этап 1. Синтез Cbz-TAP.

Раствор, содержащий коммерчески доступный диамин («TAP», Aldrich Chemical Co) (10 г, 67,27 ммоль) в безводном дихлорметане (DCM) (100 мл), охлаждали до 0°C. Раствор бензил хлороформата (4,82 мл, 33,7 ммоль) в безводном дихлорметане (DCM) (50 мл) медленно добавляли при помощи капельной воронки в течение 6-7 ч, поддерживая температуру реакционной смеси 0°C на протяжении всего времени, а затем давали нагреться до комнатной температуры (~25°C). После ещё 16 ч DCM удаляли под вакуумом, а остаток разделялся между 3-нормальным HCl и эфиром. Водные фазы собирали и нейтрализовали 50% вод. NaOH до значения pH 8-9 и экстрагировали этилацетатом. Фазу этилацетата высушивали над безводной Na₂SO₄, а затем концентрировали под вакуумом, в результате чего получали неочищенный моно-Cbz-TAP (5 г, выход примерно 50%). Это соединение использовали в следующей реакции без какой-либо дальнейшей очистки.



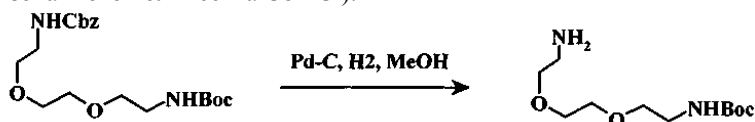
Этап 2. Синтез Cbz-TAP-Boc.

К тщательно перемешанной суспензии Cbz-TAP (5 г, 17,7 ммоль) в гексане (25 мл) добавляли Boc₂O (3,86 г, 17,7 ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли DCM (25 мл) и промывали 10% вод. лимонной кислоты (2X), водой (2X) и концентрированным раствором NaCl. Органический слой высушивали над безводной Na₂SO₄ и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт (выход 5 г) непосредственно использовали в следующей реакции.



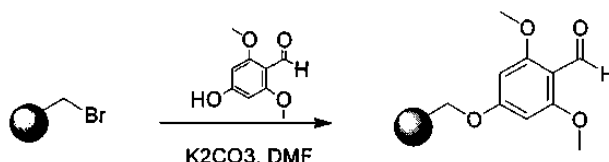
Этап 3. Синтез Boc-TAP.

Неочищенный продукт предыдущей реакции растворяли в метаноле (25 мл) и гидрогенизировали в присутствии 5 мас.% катализатора «палладий на угле» под давлением в баллоне 16 ч. Смесь фильтровали, промывали метанолом и концентрировали фильтрат *in vacuo*, в результате чего получали продукт H-TAP-Boc (выход 3,7 г). Общий выход Boc-TAP после этапов 1-3 составил приблизительно 44% (в расчете относительно использованного количества Cbz-Cl).



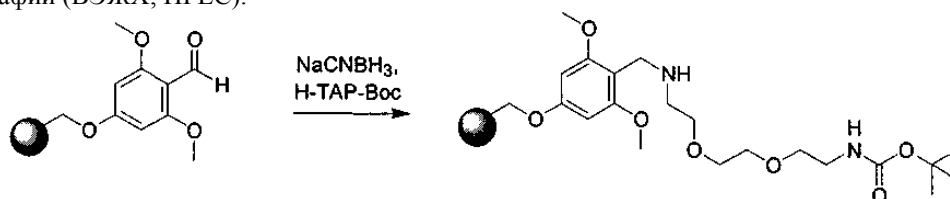
Этап 4. Синтез TentaGel-линкер.

Гранулированный твердый носитель (подложку) TentaGel bromide (2,5 г, 0,48 ммоль/г, Rapp Polymere, Германия), фенольный линкер (5 экв.) и K₂CO₃ (5 экв.) нагревали в 20 мл DMF (диметилформамид) до 70°C в течение 14 ч. После охлаждения до комнатной температуры смолу промывали (0,1-нормальная HCl, вода, ACN (ацетонитрил), DMF, MeOH) и высушивали, в результате чего получали смолистое вещество цвета янтаря.



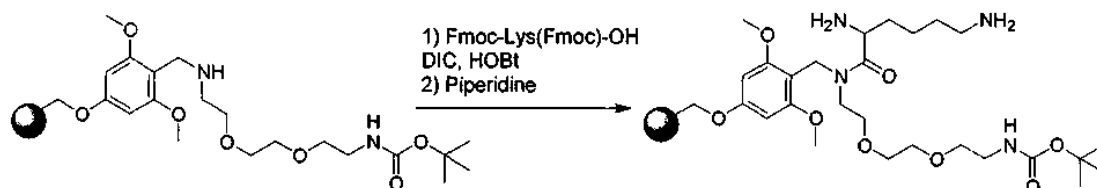
Этап 5. Синтез TentaGel-линкер-ТАР(Вос).

Брали 2,5 г смолы, полученной, как описано выше, Н-ТАР-Вос (1,5 г, 5 экв.) и кристаллической уксусной кислоты (34 мкл, 5 экв.) в смеси 1:1 с MeOH-THF и встряхивали в течение 7 ч. К этой смеси добавляли 1М раствор цианоборогидрида натрия (5 экв.) в THF (тетрагидрофуран) и встряхивали в течение ещё 7 ч. Смолу фильтровали, промывали (DMF, THF, 0,1-нормальная HCl, вода, MeOH) и высушивали. Небольшое количество смолы бензоилировали хлоридом бензола (Bz-Cl) и диизопропилэтиламином (DIEA) в дихлорметане (DCM) и расщепляли 70% TFA-DCM (трифтороуксусная кислота - дихлорметан) и проверяли путем жидкостной хроматомакс-спектрометрии (LCMS) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, HPLC).



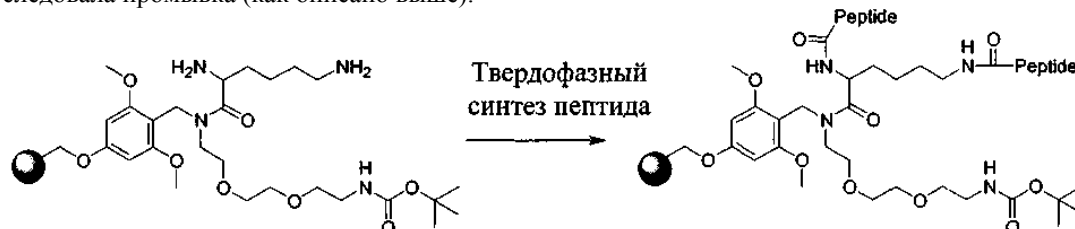
Этап 6. Синтез TentaGel-линкер-ТАР-Lys.

Смолу, полученную, как описано выше, обрабатывали активированным раствором Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (приготовленного из 5 экв. и 5 экв. HATU (реагент для связывания белков), растворенного в концентрации 0,5М в DMF, с последующим добавлением 10 экв. DIEA) и оставляли при слабом встряхивании на 14 ч. Смолу промывали (DMF, THF, DCM, MeOH) и высушивали. В результате получали защищенную смолу. Остаточные аминогруппы кэпировали путем обработки смолы раствором 10% уксусного ангидрида, 20% пиридина в DCM в течение 20 мин с последующей промывкой (как описано выше). Группы Fmoc удаляли путем мягкого встряхивания смолы в 30% пиперидина в DMF в течение 20 мин, за которым следовали промывка (DMF, THF, DCM, MeOH) и высушивание.



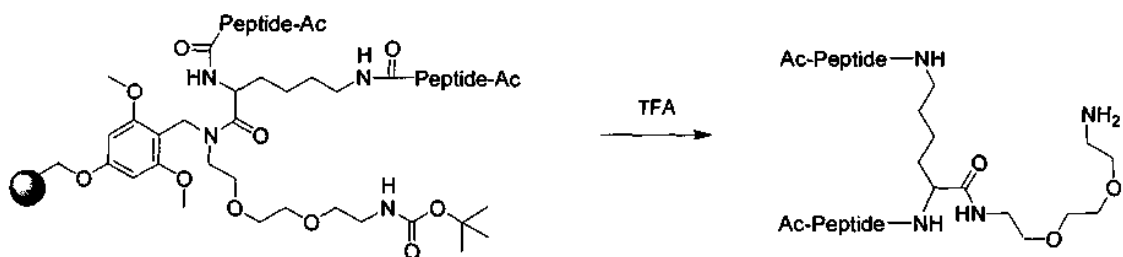
Этап 7. Синтез TentaGel-линкер-ТАР-Lys(Пептид)2.

Смолу, полученную, как описано выше, подвергали повторяющимся циклам присоединения Fmoc-аминокислоты с активацией HBTU/HOBT и удаления групп Fmoc пиперидином для одновременной постройки обеих пептидных цепей. Эту процедуру с легкостью выполняли на автоматическом синтезаторе пептидов ABI 433 (Applied Biosystems, Inc). После последнего удаления групп Fmoc, терминальные аминогруппы ацетилировали уксусным ангидридом (10 экв.) и DIEA (20 экв.) в DMF в течение 20 мин, после чего следовала промывка (как описано выше).



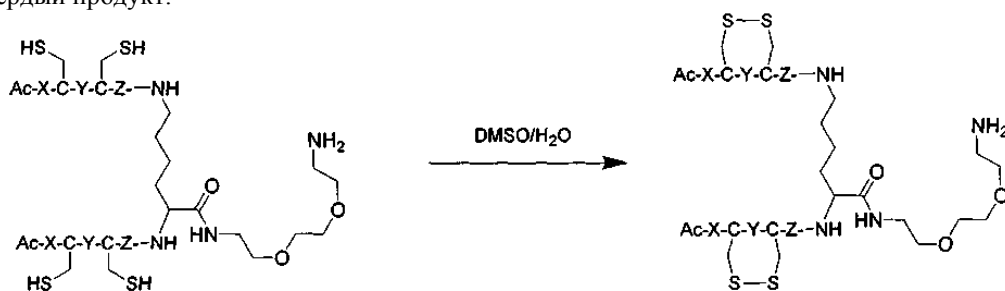
Этап 8. Отщепление от смолы.

Смолу, полученную, как описано выше, суспендировали в растворе TFA (82,5%), фенола (5%), этанедиитола (2,5%) и тиоанизола (5%) в течение 3 ч при комнатной температуре. Можно также использовать альтернативные отщепляющие смеси, такие как TFA (95%), вода (2,5%) и триизопропилсилант (2,5%). Раствор TFA охлаждали до 5°C и вливали в Et₂O для того, чтобы осадить пептид. После фильтрации и высушивания при пониженном давлении получали желаемый пептид. Очистка путем препаративной ВЭЖХ на колонке C18 давала чистый пептид.



Этап 9. Окисление пептидов для образования дисульфидных связей.

Пептидный димер растворяли в 20% DMSO (DMCO, диметилсульфоксид)/вода (1 мг сухой массы пептида/мл) и оставляли стоять при комнатной температуре в течение 36 ч. Пептид очищали, загружая реакционную смесь на колонку C18 для ВЭЖХ (Waters Delta-Pac C18, размер частиц 15 мкм, размер пор 300 Å, длина 40 мм×200 мм), с последующим нанесением на линейный градиент ACN/вода/0,01%TFA от 5 до 95% ACN в течение 40 мин. Лиофилизация фракций, содержащих целевой пептид, дает сыпучий белый твердый продукт.



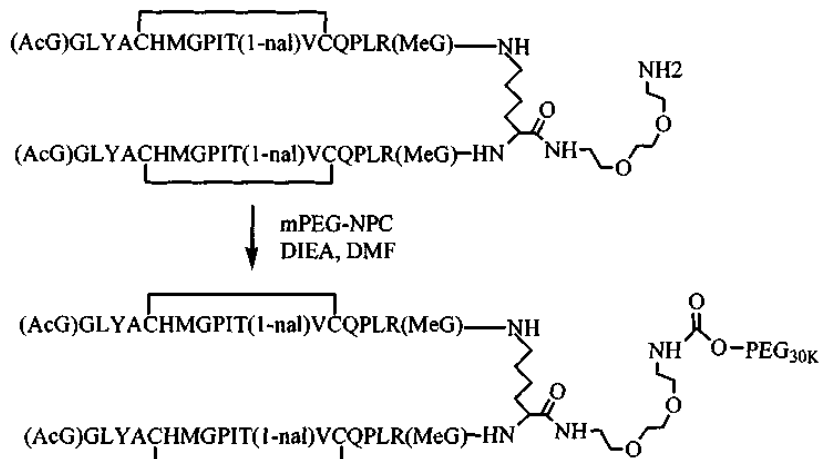
Димерный пептид (XYZ),
содержащий восстановленные
остатки цистеина

Димерный пептид (XYZ),
содержащий окисленные
дисульфидные связи

Этап 10. Присоединение ПЭГ к концевой -NH₂ группе.

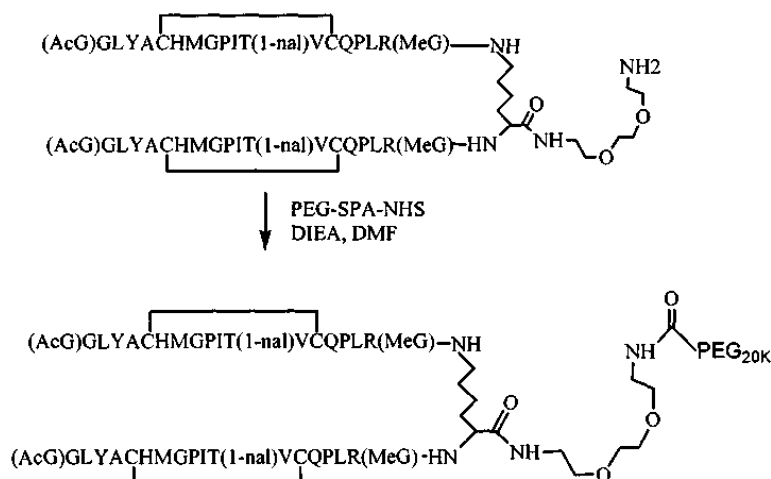
Присоединение ПЭГ карбаматной связью.

Пептидный димер смешивали с 1,5 экв. (в молях) активированных молекул ПЭГ (mPEG-NPC, NOF Corp., Япония) в сухом DMF, в результате чего получали прозрачный раствор. Через 5 мин к этому раствору добавляли 4 экв. DIEA. Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 14 ч, после чего следовала очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждали путем масс-спектрометрии (MALDI). Очищенный пептид также подвергали очистке путем катионообменной хроматографии, схема которой описана ниже.



Присоединение ПЭГ амидной связью.

Пептидные димеры смешивают 1,5 экв. (в молях) активированных молекул ПЭГ (mPEG-SPA-NHS, Shearwater Corp., США) в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор. После 5 мин к этому раствору добавляют 10 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 2 ч, после чего следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждают путем масс-спектрометрии (MALDI). Очищенный пептид также подвергают очистке путем катионообменной хроматографии, схема которой описана ниже.



Этап 11. Ионообменная очистка.

Была исследована способность нескольких обменных носителей отделять полученный, как описано выше, конъюгат пептид-ПЭГ от непрореагировавшего (или гидролизованного) ПЭГ, в дополнение к их способности удерживать исходные димерные пептиды. Ионообменную смолу (2-3 г) загружали в 1 см колонку, после чего колонку переводили в натриевую форму (0,2-нормальную NaOH загружали в колонку до достижения значения pH элюанта 14, приблизительно 5 объемов колонки), а затем - в водородную форму (элюировали либо 0,1-нормальной HCl либо 0,1 М HOAc, до тех пор, пока pH элюанта не совпал с pH загрузки, приблизительно 5 объемов колонки), за этим следовали три промывки в 25% водном растворе ACN, до достижения значения pH 6. Либо пептид до конъюгирования с ПЭГ, либо конъюгат пептид - ПЭГ растворяли в 25% водном растворе ACN и доводили значение pH до <3 при помощи TFA, после чего загружали в колонку. После промывки 2-3 объемами 25% водного раствора ACN и сбора 5 мл фракций, пептид высвобождали из колонки путем элюции 0,1М раствором NH₄OAc в 25% водном растворе ACN, снова собирали 5 мл фракции. Исследование путем ВЭЖХ выявляло фракции, содержащие желаемый пептид.

Анализ на испарительном детекторе светорассеяния (ELSD) показал, что когда пептид удерживался на колонке и его элюировали раствором NH₄OAc (обычно между фракциям 4 и 10), загрязнения неконъюгированным ПЭГ выявлено не было. Когда пептид элюировали исходным промывочным буфером (обычно первые две фракции), не было выявлено разделения желательного конъюгата ПЭГ и избыточного ПЭГ.

Следующие колонки успешно удерживали как пептид, так и конъюгат пептид-ПЭГ, а также успешно очищали конъюгат пептид-ПЭГ от неконъюгированного пептида.

Таблица 1

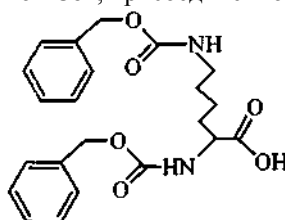
Ионообменные смолы

Носитель	Производитель
Мono S HR 5/5, сильный катионообменный носитель, загруженный в колонка	Amersham Biosciences
Микрогранулированная SE53 Cellulose, сильный катионообменный носитель	Whatman
SP Sepharose Fast Flow, сильный катионообменный носитель	Amersham Biosciences

Пример 2. Синтез пептидных димеров - агонистов ЭПО-рецептора путем конденсации фрагментов.

Этап 1. Синтез (Cbz)₂-Lys.

Проводят реакцию лизина с раствором бензилхлороформата в стандартных условиях, в результате чего получают лизин, защищенный группой Cbz, присоединенной к двум его аминогруппам.

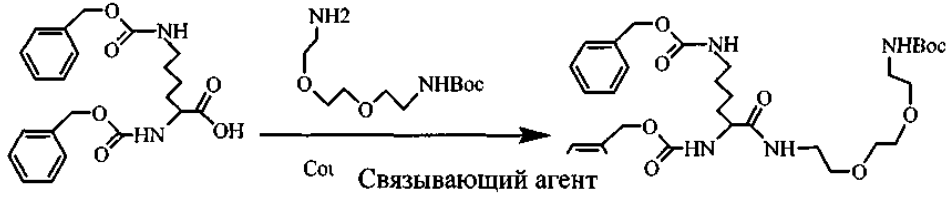


Этап 2. Синтез Вос-ТАР.

Вос-ТАР синтезируют, как описано в этапах 1-3 примера 1.

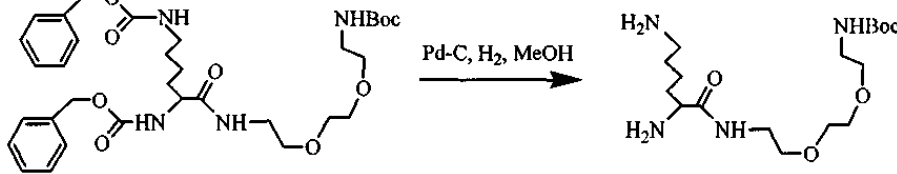
Этап 3. Связывание $(Cbz)_2$ -Lys и Вос-ТАР.

Проводят связывание $(Cbz)_2$ -Lys и Вос-ТАР в стандартных условиях связывания, в результате чего получают $(Cbz)_2$ -Lys-ТАР-Вос.



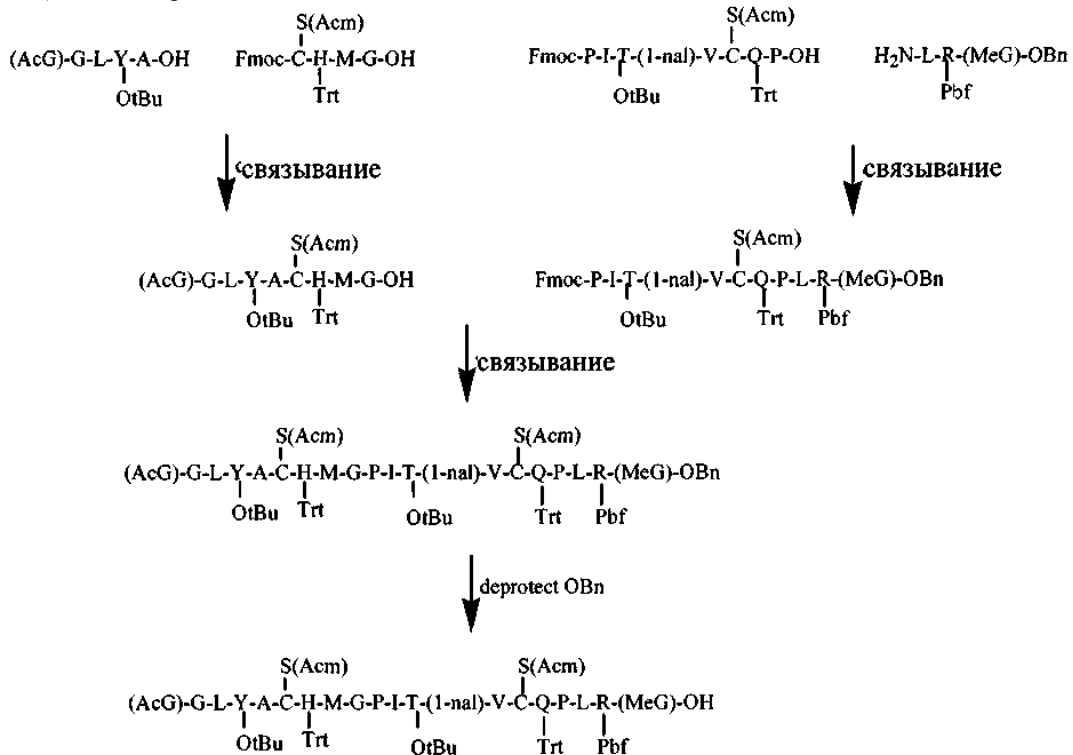
Этап 4. Lys-ТАР-Вос.

Неочищенный продукт предыдущей реакции растворяют в метаноле (25 мл) и гидрогенизируют в присутствии 5 мас.% катализатора «палладий на угле» под давлением в баллоне в течение 16 ч. Смесь фильтруют, промывают метанолом и концентрируют фильтрат *in vacuo*, в результате чего получают неочищенный продукт Н-ТАР-Вос.



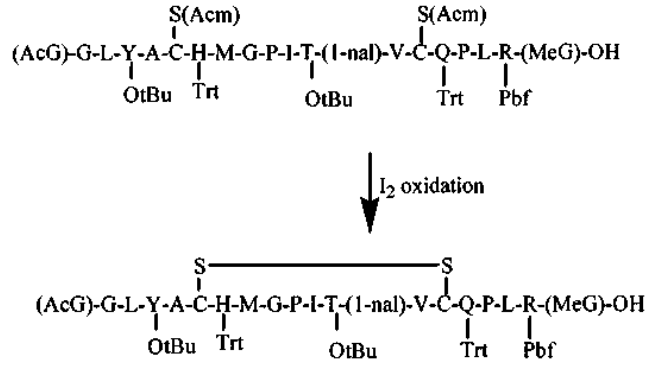
Этап 5. Синтез пептидных мономеров путем конденсации фрагментов.

Четыре пептидных фрагмента последовательности пептидного мономера синтезируют по стандартным методикам. Затем эти частично защищенные фрагменты подвергают двум независимым циклам связывания. В первом цикле путем связывания двух пептидных фрагментов формируют N-концевую половину мономера, в то время как C-концевую половину мономера формируют путем связывания других двух пептидных фрагментов. Во втором цикле связывания N-концевую и C-концевую половины связывают с образованием полностью защищенного мономера. Затем защиту мономера удаляют OBn (Обензолом) по стандартным методикам.



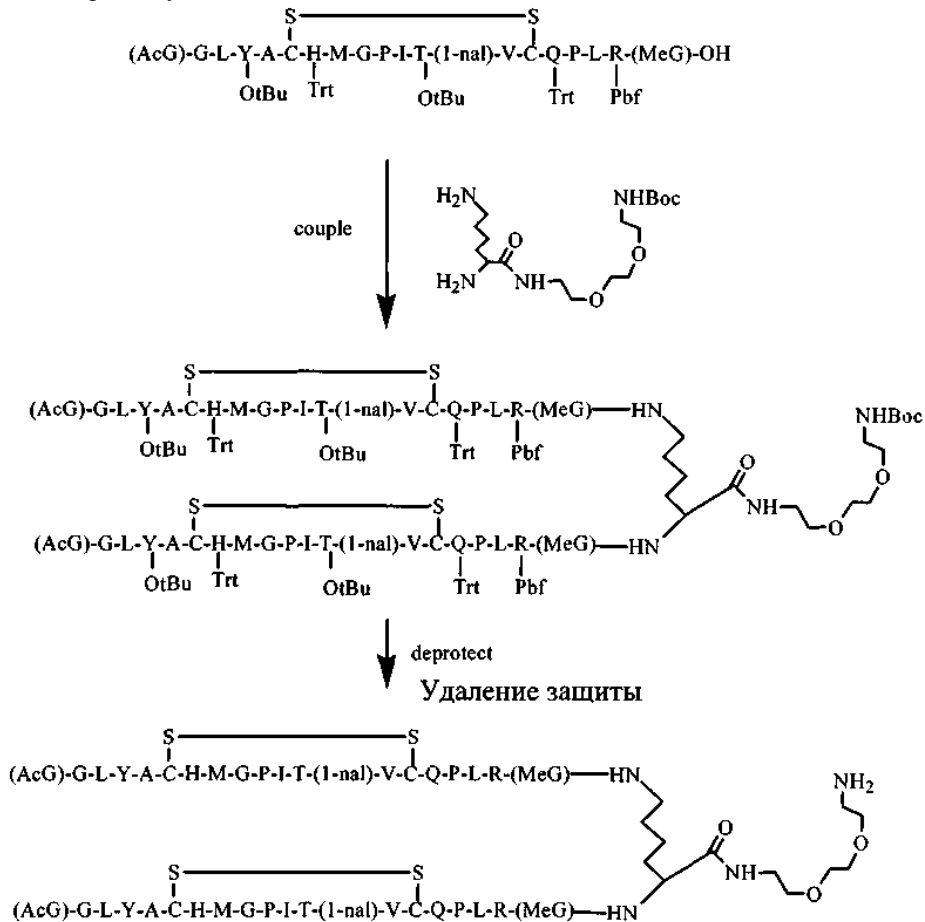
Этап 6. Окисление пептидных мономеров с образованием дисульфидных связей.

Затем конденсированные пептидные мономеры, лишенные защиты при помощи OBn, окисляют в присутствии йодида для образования внутримолекулярных дисульфидных связей между защищенными группой Acм остатками цистеина мономеров.



Этап 7. Присоединение Lys-TAP-Boc к окисленным мономерам, лишенным защиты при помощи OBn, с образованием пептидного димера.

Для образования пептидного димера Lys-TAP-Boc связывают с двукратным избытком (молярным) окисленных мономеров, лишенных защитной группы при помощи OBn. Затем защиту пептидного димера снимают в стандартных условиях.



Этап 8. Присоединение ПЭГ к лишенному защиты димеру.

Затем к лишенному защиты димеру присоединяют ПЭГ, как описано в примере 1 (этап 10).

Этап 9. Ионообменная очистка.

Затем пептидный димер с присоединенным ПЭГ очищают, как описано в примере 1 (этап 11).

Пример 3. Методики анализа активности *in vitro*.

В этом примере описаны различные методики анализа *in vitro*, которые подходят для оценки активности и эффективности пептидов-агонистов ЭПО-рецептора согласно данному изобретению. Результаты этих анализов демонстрируют, что новые пептиды согласно этому изобретению связывают ЭПО-рецептор и активируют опосредуемую ЭПО-рецептором передачу сигналов. Более того, результаты этих анализов показывают, что составы, содержащие новые пептиды, проявляют неожиданное повышение аффинности связывания ЭПО-рецептора и биологической активности по сравнению с описанными ранее пептидами - миметиками ЭПО. Пептидные димеры - агонисты ЭПО-рецептора готовят согласно способам, приведенным в примере 1 или примере 2. Эффективность этих пептидных димеров оценивают путем последовательных анализов активности *in vitro* для определения активности, включая анализ актива-

ции репортерного гена, анализ пролиферации, анализ конкурентного связывания, анализ К/ВОЕ-Э. Более подробно эти четыре вида анализа описаны ниже.

Результаты этих анализов активности *in vitro* суммированы в табл. 2.

1. Исследование активации репортерного гена.

Эта методика анализа основана на применении клетки, меченной репортерным геном («репортерная клетка»), полученной из линии В-клеток-предшественников мыши, Vaf3/EpoR/GCSFRfos/lux. Эта линия репортерных клеток экспрессирует химерный рецептор, состоящий из внеклеточной части ЭПО-рецептора человека и внутриклеточной части Г-КСФ-рецептора человека. Далее, эту клеточную линию трансфецируют конструкцией, содержащей репортерный ген люциферазы, контролируемый промотором fos. Активация этого химерного рецептора добавлением вещества, стимулирующего эритропоэз, вызывает экспрессию репортерного гена люциферазы, и, следовательно, возникновение свечения при добавлении субстрата люциферазы - люциферина. Следовательно, уровень активации ЭПО-рецептора в таких клетках можно количественно определить, измерив активность люциферазы.

Клетки Vaf3/EpoR/GCSFRfos/lux культивируют в среде DMEM/F12 (Gibco), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS, Hyclone), 10% супернатанта WENI-3 (супернатант культуры клеток WENI-3 коллекции ATCC # TIB-68) и пенициллином/стрептомицином. Приблизительно за 18 ч до проведения анализа клетки переводят на среду DMEM/F12, дополненную 10% фетальной сыворотки (FBS, Hyclone) и 0,1% супернатанта WENI-3 (среда с недостатком факторов роста). В день проведения анализа клетки один раз промывают средой DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3), затем 1×10^6 клеток культивируют в присутствии известных концентраций тестируемого пептида, либо с ЭПО (R & D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США). В этом анализе одновременно тестируют серийные разведения тестируемого пептида. Планшеты для анализа инкубируют в течение 4 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, после чего в каждую лунку добавляют люциферин (Steady-Glo, Promega, Мэдисон, Висконсин, США). После 5-минутной инкубации измеряют свечение на люцинометре Packard Topcount Luminometer (Packard Instruments Co. Даунерс Гроув, Иллинойс, США). При помощи программного обеспечения Graph Pad строят график зависимости количества световых импульсов от концентрации тестируемого пептида. Концентрация тестируемого пептида, которая дает свечение, равное половине максимального значения, заносится в протокол как EC50 [см. табл. 2: Репортер EC50].

2. Исследование пролиферации.

Эта методика исследования основана на применении линии В-клеток-предшественников мыши, Vaf3, которые в результате трансфекции экспрессируют ЭПО-рецептор. Пролиферация полученной в результате клеточной линии, Vaf3/Gal4/Elk/EPOR, зависит от активации ЭПО-рецептора. Степень пролиферации клеток количественно определяли при помощи тиазолила синего (МТТ), сигнал о анализе с МТТ пропорционален числу жизнеспособных клеток.

Клетки Vaf3/Gal4/Elk/EPOR культивируют в центрифужной пробирке в среде DMEM/F12 (Gibco), дополненной 10% фетальной сыворотки (FBS, Hyclone) и 2% супернатанта WENI-3 (коллекция ATCC # TIB-68). Культивируемые клетки выдерживают в течение ночи в центрифужных пробирках при плотности 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS и 0,1% супернатанта WENI-3 (среда с недостатком факторов роста). Затем инкубированные в бедной среде клетки дважды промывают фосфатным буферным раствором Дульбекко (Gibco) и ресуспендируют до плотности 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Затем аликвоты суспензии клеток объемом 50 мкл (~50000 клеток) вносили в трипликатах в 96-луночные планшеты для анализа. В эти 96-луночные планшеты добавляли аликвоты объемом 50 мкл (конечный объем в ячейке 100 мкл) серий разведений тестируемых пептидов - миметиков ЭПО, либо 50 мкл ЭПО (R & D Systems Inc., Миннеаполис, Миннесота, США), либо Aranesp™ (дарбепозтин альфа, коммерчески доступный агонист ЭПО-рецептора, Amgen) в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Например, можно тестировать 12 разных разведений, конечная концентрация тестируемого пептида (или контрольного пептида ЭПО) в которых варьируется от 821 до 0,0045 пМ. Затем клетки в планшете инкубируют в течение 48 ч при 37°C. Затем в каждую лунку культурального планшета добавляют по 10 мкл МТТ (Roche Diagnostics) и оставляют для инкубации на 4 ч. Затем реакцию останавливают добавлением 10% SDS (додецилсульфат натрия) + 0,01-нормальная HCl. Затем планшеты инкубируют в течение ночи при 37°C. Затем проводят спектрофотометрическое измерение поглощения в каждой лунке при длине волны 595 нм. При помощи ПО Graph Pad строят график зависимости поглощения от концентрации тестируемого пептида и рассчитывают EC50 (см. табл. 2, Пролиферация EC50).

3. Исследование конкурентного связывания.

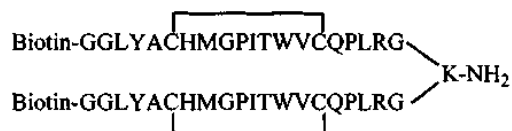
Оценку конкурентного связывания проводят, используя анализ, в котором световой сигнал генерируется как функция близости двух гранул: стрептавидиновой гранулы-донора, покрытой биотинилированной пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, и гранулы-акцептора, к которой присоединен ЭПО-рецептор. Свет порождает неизлучающий перенос энергии, в ходе которого первая гранула вследствие освещения высвобождает синглетный кислород, контакт с которым вызывает испускание света второй гранулой. Эти наборы гранул коммерчески доступны (Packard). Близость гранул порождается

связыванием пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, с ЭПО-рецептором. Тестируемый пептид, конкурирующий с пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, за связывание с ЭПО-рецептором, препятствует этому связыванию, что вызывает снижение свечения.

Более подробно данный метод представляет собой следующее. Добавляют 4 мкл серийных разведенных пептида-агониста ЭПО-рецептора, либо положительного или отрицательного контроля, в лунки 384-луночного планшета. После этого добавляют в каждую лунку смеси рецептора с гранулами. Смесь рецептора с гранулами состоит из 15 мкл стрептавидиновых (5 мг/мл) гранул-доноров (Packard), 15 мкл моноклонального антитела ab179 (5 мг/мл, это антитело распознает часть плацентарной щелочной фосфатазы, содержащаяся в рекомбинантном ЭПО-рецепторе), гранулы-акцепторы, покрытые белком А (белок А будет связывать антитело ab179, Packard), 112,5 мкл разведения 1:6,6 рекомбинантного ЭПО-рецептора (продуцируемого клетками яичника китайского хомячка в виде белка слияния с частью плацентарной щелочной фосфатазы, которая содержит целевой эпитоп для антитела ab179) и 607,5 мкл буфера Alphaquest (40 мм HEPES, pH 7,4, 1 мм MgCl₂, 0,1% БСА, 0,05% Tween 20). Перемешивают постукиванием. Добавляют в каждую лунку по 2 мкл биотинилированной пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, AF33068 (конечная концентрация 30 нМ). AF33068, связывающий ЭПО-рецептор пептид (см. табл. 3 «Репортер EC50(пМ)»), готовят согласно способам, описанным в примере 1. Перемешивают центрифугированием в течение 1 мин. Закрывают планшет пленкой Packard Top Seal и оборачивают фольгой. Инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. После 18 ч измеряют свечение на считывающем устройстве Alpha Quest (Packard). Строят график зависимости свечения от концентрации пептида и анализируют при помощи Graph Pad или Excel.

Концентрацию тестируемого пептида, которая дает 50% снижение свечения по сравнению с наблюдаемым без тестируемого пептида, заносят в протокол как IC50 [см. табл. 2: AQIC50].

AF33068



4. Исследование К/ВОЕ.

Передача сигнала с ЭПО-рецептора стимулирует дифференцировку стволовых клеток костного мозга в пролиферирующие клетки - предшественники эритроцитов. В этом анализе измеряют способность тестируемых пептидов стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток - предшественников эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток костного мозга человека.

Для этого анализа делают серийные разведения тестируемого пептида в среде IMDM (Gibco), дополненной 10% FBS (Nucclone). Затем эти серийные разведения либо положительный контроль (пептид ЭПО) добавляют к метилцеллюлозе до получения конечного объема, равного 1,5 мл. Смесь метилцеллюлозы и пептида тщательно перемешивают в специальном приборе (vortex). Размораживают аликвоты (100000 клеток/мл) CD34+клеток, полученных из костного мозга человека (Poietics/Cambrex). Размороженные клетки осторожно добавляют к 0,1 мл 1 мг/мл ДНКазы (Stem Cells) в пробирке объемом 50 мл. Затем к клеткам осторожно добавляют 40-50 мл среды IMDM: среду добавляют отдельными каплями по стенке пробирки объемом 50 мл до объема 10 мл, а затем доливают оставшийся объем по стенке пробирки. Затем клетки центрифугируют при 900 об/мин в течение 20 мин и осторожно удаляют среду путем аспирации. Клетки ресуспендируют в 1 мл среды IMDM и подсчитывают плотность клеток на 1 мл среды на предметном стекле гемоцитометра (аликвоту объемом 10 мкл помещают на предметное стекло, а плотность клеток считают как среднее число X 10000 клеток/мл). Затем клетки разбавляют в среде IMDM до плотности 15000 клеток/мл. Добавляют по 100 мкл разбавленных клеток на каждые 1,5 мл метилцеллюлозы вместе с пробой пептида (конечная концентрация клеток в анализируемой среде равна 1000 клеток/мл) и смесь перемешивают в специальном приборе (vortex). Ждут, пока исчезнут пузыри в смеси, а затем отбирают путем аспирации 1 мл, используя иглу с тупым концом. Добавляют по 0,25 мл отобранной смеси из каждой пробы в каждую из 4 лунок 24-луночного планшета (марки Falcon). Инкубируют помещенные в планшет смеси при 37°C во влажном инкубаторе с 5% содержанием CO₂ в атмосфере в течение 14 дней. Проводят подсчет эритроидных колоний, используя фазово-контрастный микроскоп (объектив 5X-10X, конечное увеличение 100X). Концентрацию тестируемого пептида, при которой число образованных колоний составляет 90% максимального относительно наблюдаемого в положительном контроле с ЭПО, вносят в протокол как EC90 [см. табл. 2 К/ВОЕ-Э EC90].

5. Радиолигандный анализ конкурентного связывания.

Для измерения значений IC50 пептидов согласно этому изобретению можно также использовать альтернативный радиолигандный анализ конкурентного связывания. В этом анализе измеряют связывание конъюгата ¹²⁵I-ЭПО с ЭПО-рецептором. Анализ предпочтительно проводить согласно следующему иллюстративному протоколу.

А. Материалы.

Рекомбинантный химерный ЧЭПО-р/Fc	<ul style="list-style-type: none"> • Обозначение: Recombinant Human EPO R/Fc Chimera • Поставщик: R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США) • Номер по каталогу: 963-ER • Номер партии (Lot Number): ЕОК033071 • Хранение: 4°C
Йодированный рекомбинантный эритропоэтин человека	<ul style="list-style-type: none"> • Обозначение: (3[¹²⁵I]iodotyrosyl)Erythropoetin, human recombinant, high specific activity, 370kBq, 10 µCi ((3[¹²⁵I]йодотирозил)Эритропоэтин, рекомбинантный человеческий, высокая специфическая активность 370КБеккерелей, 10 мКи) • Поставщик: Amersham Biosciences (Пискалавей, Нью-Йорк, США) • Номер по каталогу: IM219-10µCi • Номер партии: • Хранение: 4°C
Сефароза с белком G	<ul style="list-style-type: none"> • Обозначение: Protein-G Sepharose 4 Fast Flow • Поставщик: Amersham Biosciences (Пискалавей, Нью-Йорк, США) • Номер по каталогу: 17-0681-01 • Номер партии: • Хранение: 4°C
Аналитический буфер	<ul style="list-style-type: none"> • Фосфатный буферный раствор (ФБР, PBS), pH 7.4, содержащий 0.1% бычьего сывороточного альбумина и 0.91 азида натрия • Хранение: 4°

В. Определение подходящей концентрации рецептора.

Один 50 мкг пузырек лиофилизированного рекомбинантного внеклеточного домена ЭПО-рецептора в виде белка слияния с Fc-фрагментом IgG1 человека, восстанавливают в 1 мл аналитического буфера. Для определения соответствующего количества рецептора для использования в анализе, смешивают 100 мкг этого препарата рецептора с йодированным рекомбинантным эритропоэтином человека (¹²⁵I-ЭПО, приблизительно 20000 импульсов в минуту в 200 мкл) в 12×75 мм полипропиленовых пробирках. Пробирки закрывают крышками и помещают для осторожного перемешивания в шейкер LabQuake с вращающейся платформой в течение ночи при 4°C.

На следующий день в каждую пробирку добавляют 50 мкл 50% суспензии сефарозы с белком G. Затем пробирки инкубируют в течение 2 ч при 4°C, при осторожном перемешивании. Затем пробирки центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин (3297G) для осаждения сефарозы с белком G. Супернатанты осторожно отделяют и удаляют. После трехкратной промывки 1 мл аналитического буфера при 4°C измеряют радиоактивность осадка счетчиком гамма-квантов Wellac Wizard. Затем анализируют результаты и рассчитывают разведение, необходимое для того, чтобы достичь 50% максимального значения связывания.

С. Определение IC50 пептида.

Для определения IC50 пептида AF37702, 100 мкл серийных разведений пептида смешивают со 100 мкл рецептора к эритропоэтину (100 пг на пробирку) в 12×75 мм полипропиленовых пробирках. Затем в каждую пробирку добавляют по 100 мкг йодированного эритропоэтина человека (¹²⁵I-ЭПО), пробирки закрывают крышками и осторожно перемешивают в течение ночи при 4°C.

На следующий день определяют количество связанного ¹²⁵I-ЭПО, как описано выше. Анализируют результаты и рассчитывают значение IC50, используя Graphpad Prism version 4.0, Graph Software, Inc (Сан-Диего, Калифорния, США). Анализ повторяют два или более раз для каждого тестируемого пептида для того, чтобы в итоге получить 3 или более определенных в воспроизводимых значений IC50.

сердца. Определяют процент (%) ретикулоцитов в каждой пробе крови путем окраски тиазоловым оранжевым и поточного цитометрического анализа (программа retic-count). Гематокрит определяли вручную. Уточненный процент ретикулоцитов определяют по следующей формуле:

$$\% \text{РЕТИКУТОЧЕННЫЙ} = \% \text{РЕТИКУНАБЛЮДАЕМЫЙ} \times (\text{Гематокритиндивидуальный} / \text{Гематокритнормальный})$$

3. Гематологический анализ.

Нормальным мышам линии CD1 четыре раза в неделю вводят, путем болюсной инъекции, либо положительный контроль ЭПО, либо тестируемый пептид, либо разбавитель. Диапазон доз, выраженных в мг/кг, положительного контроля и тестируемого пептида исследуют путем варьирования концентрации соединения в лекарственной форме. Вводимые путем инъекции объемы равны 5 мг/кг. Контрольная группа, получающая разбавитель, состоит из двенадцати животных, в то время как в каждую из других групп дозирования входит по 8 животных. Регистрируют жизнеспособность (ежедневно) и массу тела (еженедельно).

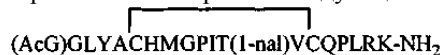
Получающих дозы пептидов мышей лишают питания, а затем анестезируют вдыхаемым изофлюраном и отбирают пробы крови (перед смертью мышей) путем пункции сердца или брюшной аорты в день 1 (для мышей контрольной группы, получающих разбавитель) и в дни 15 и 29 (4 мыши/группа/день). Кровь переносят в пробирки марки Vacutainer®. Предпочтительным антикоагулянтом является этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, EDTA).

Образцы крови исследуют с целью измерения образования эритроцитов в конечных точках и определения таких физиологических показателей, как гематокрит, гемоглобин и общее число эритроцитов, с применением автоматизированных клинических анализаторов, хорошо известных в данной области (например, производства Coulter, Inc.).

Пример 5. Синтез гомодимеров пептидов - агонистов ЭПО-рецептора из мономеров пептидов, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1).

Этап 1. Синтез пептидных мономеров.

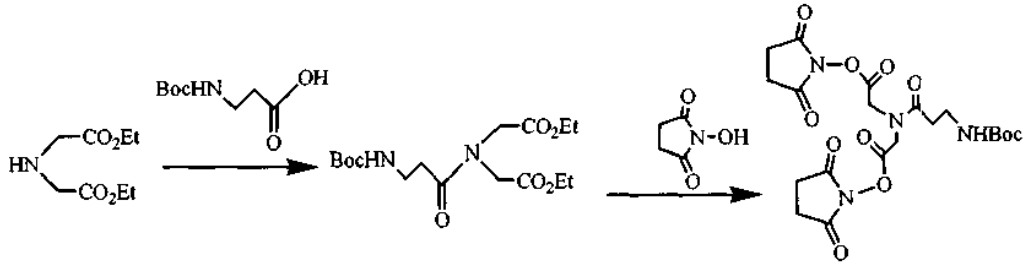
Пептидные мономеры синтезируют, используя группу Fmoc стандартного химического состава, на синтезаторе пептидов ABI 431A, используя смолу TG-RAM (0,18 ммоль/г, Rapp Polymere, Германия). Для синтеза пептидных мономеров с амидированным карбоксильным концом полностью собранный пептид отщепляют от смолы составом, содержащим 82,5% TFA, 5% воды, 6,25% анизол, 6,25% этандитиола. Лишенный защиты продукт отфильтровывают от смолы и осаждают диэтиловым эфиром. После тщательного высушивания продукт очищают обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18 с градиентом водного раствора ацетонитрила в 0,1% трифторацетата. Структуру пептида подтверждают путем масс-спектрометрии (электроспрей). Чтобы вызвать образование дисульфидных связей, пептид растворяют в растворе, состоящем из ДМСО и воды в соотношении 1:1, в концентрации 1 мг/мл. Продукт очищают обращенно-фазной ВЭЖХ (HPLC) на колонке C18 с градиентом водного раствора ацетонитрила в 0,1% трифторацетата. Пептидные мономеры можно изобразить следующим образом:



Этап 2. Синтез трифункционального линкера.

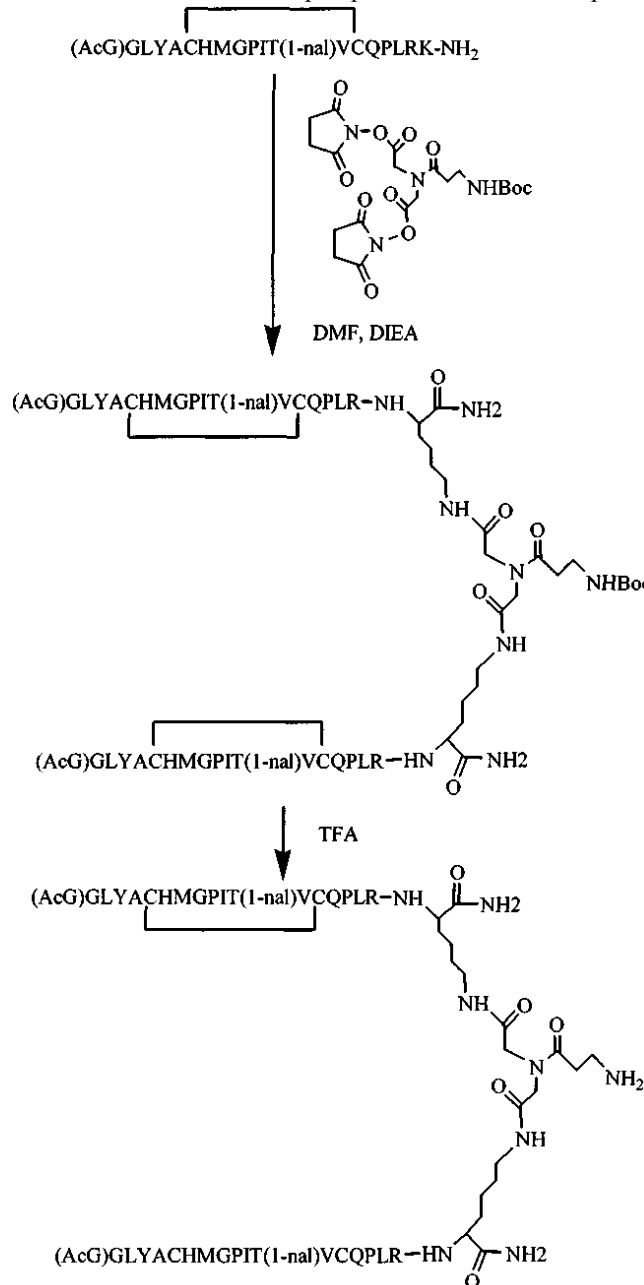
К раствору диэтилиминаоацетата (10,0 г, 52,8 ммоль) и Вос-бета-аланина (10,0 г, 52,8 ммоль) в 100 мл DCM добавляют диизопропилкарбодимид (8,0 мл, 51,1 ммоль) в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревают на ~10°, а затем за ~20 мин смесь вновь остывала до комнатной температуры. Реакционную смесь оставляют для перемешивания в течение ночи и отфильтровывают осажденную диизопропилмочевину. Растворитель удаляют при пониженном давлении, в результате чего получают камедь, а остаток растворяют в этилацетате и снова отфильтровывают для того, чтобы удалить дополнительную осажденную мочевины. Органическую фазу помещают в делительную воронку, промывают (насыщ. NaHCO₃, концентрированный раствор хлорида натрия, 0,5-нормальная HCl), высушивают (MgSO₄), фильтруют и концентрируют при пониженном давлении, получая в результате сложноеэфирный продукт в виде бесцветного масла. Сложный эфир удаляют в смеси (1:1) MeOH и THF (100 мл) и добавляют к этой смеси воду (25 мл), а затем - NaOH (5 г, 125 ммоль). Измеренное значение pH составляло >10. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем подкисляют 6-нормальной соляной кислотой до значения pH, равного 1. Затем водную фазу насыщают NaCl и 4 раза экстрагируют этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывают (концентрированным раствором NaCl), высушивают (MgSO₄), фильтруют и концентрируют при пониженном давлении, получая в результате белый полутвердый продукт. Твердый продукт растворяют в 50 мл DCM и добавляют к этому 300 мл гексана, в результате чего получают белую суспензию. Растворитель удаляют при пониженном давлении, в результате чего получают двукислоту в виде белого твердого продукта (14,7 г, выход для двух этапов 91,5%). К раствору двукислоты (1 г, 3,29 ммоль) в 20 мл DMF добавляют N-гидроксисукцинимид (770 мг, 6,69 ммоль) и диизопропилкарбодимид (1,00 мл, 6,38 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (3 мг, 0,02 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи и удаляют растворитель при пониженном давлении. Органическую фазу удаляют в этилацетате и фильтруют для того, чтобы отделить осажденную мочевины. Органическую фазу помещают в делительную воронку,

промывают (насыщ. NaHCO_3 , концентрированный раствор хлорида натрия, 0,5-нормальная HCl), высушивают (MgSO_4), фильтруют и концентрируют при пониженном давлении, получая в результате сложное вещество ди-N-гидроксисукцинимид в виде белого твердого вещества (1,12 г, выход 68%).



Этап 3. Присоединение трифункционального линкера к пептидным мономерам.

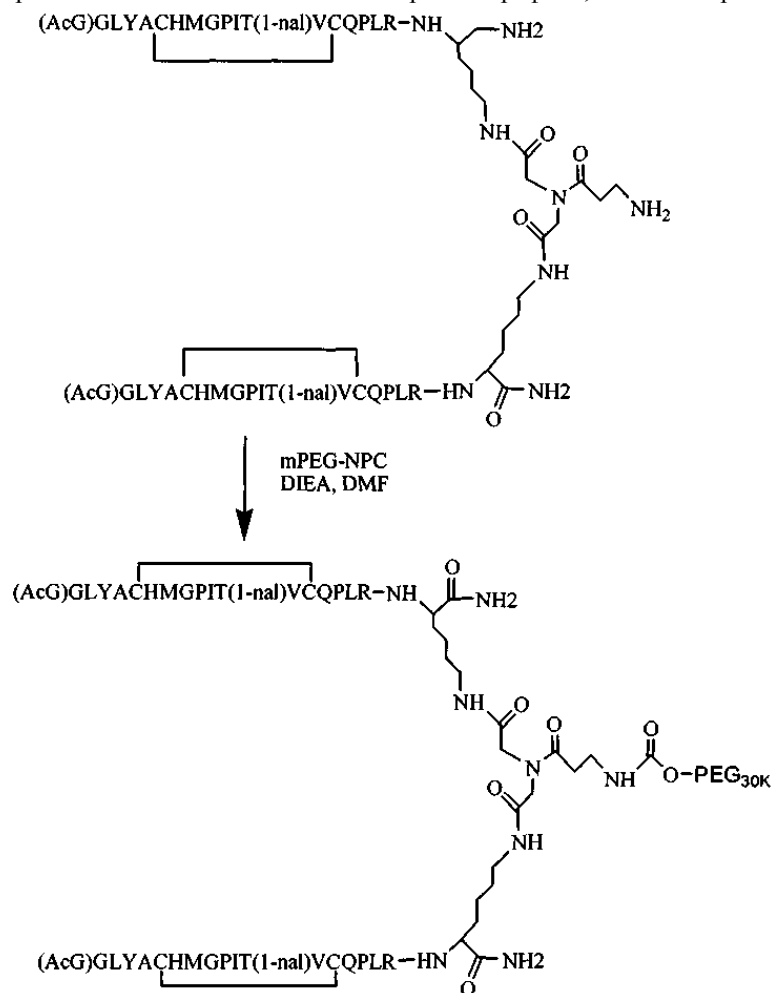
Для присоединения линкера 2 экв. пептида смешивают с 1 экв. трифункционального линкера в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор, к которому через 2 мин добавляют 5 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 14 ч. Растворитель удаляют при пониженном давлении, а неочищенный продукт растворяют в 80% TFA в DCM в течение 30 мин для того, чтобы удалить группу Boc, за чем следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру димера подтверждали масс-спектрометрией (электроспрей). В ходе этой реакции к атому азота ϵ -аминогруппы остатка лизина каждого мономера присоединяется линкер.



Этап 4. Присоединение ПЭГ(пегилирование) к пептидному димеру.

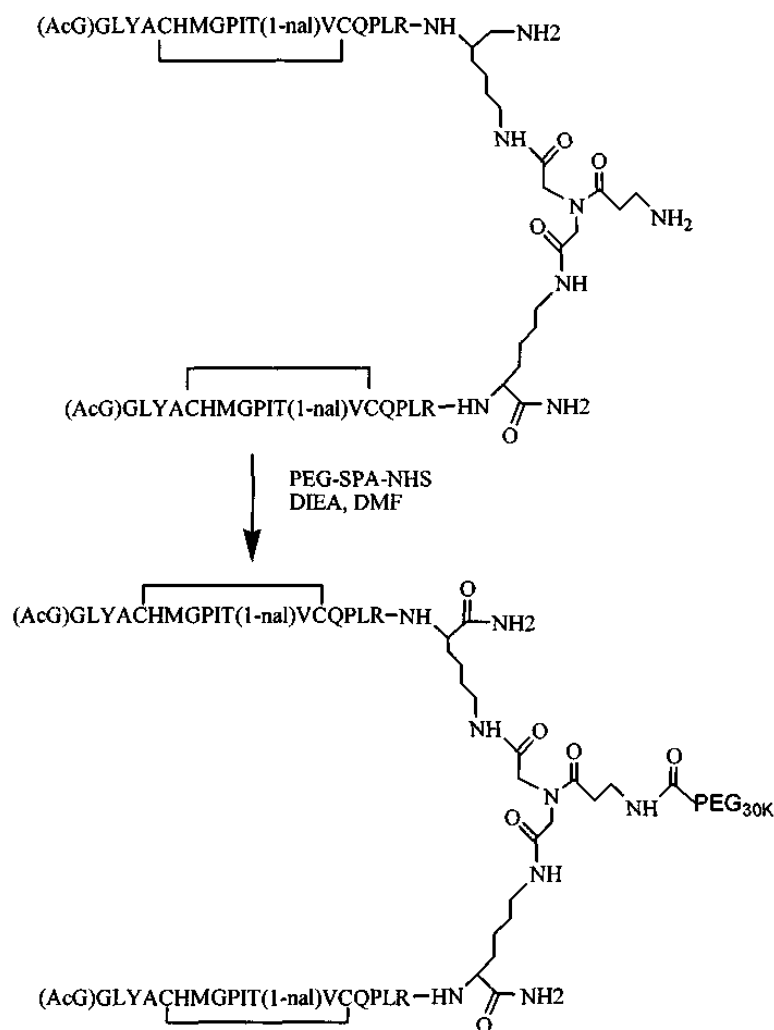
Присоединение ПЭГ карбаматной связью.

Пептидный димер смешивают с равным количеством (в молях) активированных молекул ПЭГ (mPEG-NPC, NOF Corp, Япония) в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор. После 5 мин к полученному раствору добавляют 4 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 14 ч, после чего следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждают путем масс-спектрометрии (MALDI). Очищенный пептид также подвергают очистке катионообменной хроматографией, схема которой описана ниже.



Присоединение ПЭГ амидной связью.

Пептидный димер смешивают с равным количеством (в молях) активированных молекул ПЭГ (mPEG-SPA-NHS, Shearwater Corp., США) в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор. Через 5 мин к полученному, как описано выше, раствору добавляют 10 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 14 ч, после чего следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждают на масс-спектрометрии (MALDI). Очищенный пептид также подвергают очистке катионообменной хроматографией, схема которой описана ниже.



Этап 5. Ионообменная очистка пептидов.

Ионообменная очистка.

Была исследована способность нескольких обменных носителей отделять полученный, как описано выше, конъюгат пептид-ПЭГ от непрореагировавшего (или гидролизованного) ПЭГ в дополнение в способности удерживать исходные димерные пептиды. Ионообменную смолу (2-3 г) загружали в 1 см колонку, после чего колонку переводили в натриевую форму (0,2-нормальную NaOH загружали в колонку до достижения значения pH элюата 14, приблизительно 5 объемов колонки), а затем - в водородную форму (элюировали либо 0,1-нормальной HCl либо 0,1M HOAc, до тех пор, пока pH элюанта не совпадал с pH загрузки, приблизительно 5 объемов колонки), после чего следовали три промывки в 25% водным раствором ACN, до достижения значения pH 6. Либо пептид до конъюгирования с ПЭГ, либо конъюгат пептид - ПЭГ растворяли в 25% водном растворе ACN и доводили значение pH до <3 добавлением TFA, затем загружали в колонку. После промывки 2-3 объемами колонки 25% водного раствора ACN и сбора 5 мл фракций, пептид высвобождали из колонки путем элюирования 0,1M раствором NH₄OAc в 25% водном растворе ACN, снова собирая 5 мл фракций. Исследование путем ВЭЖХ выявляло фракции, содержащие желаемый пептид. Анализ на испарительном детекторе светорассеяния (ELSD) показал, что когда пептид удерживался в колонке и его элюировали раствором NH₄OAc (обычно между фракциям 4 и 10), загрязнения неконъюгированным ПЭГ выявлено не было. В случае, если пептид элюировался при промывке первым буферным раствором (обычно первые две фракции), не наблюдали разделения интересующего ПЭГ-конъюгата и ПЭГ.

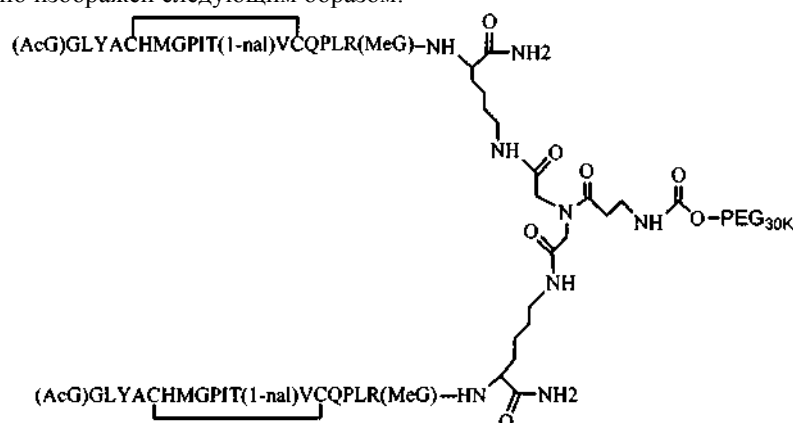
Ионообменные смолы

Носитель	Производитель
Моно S HR 5/5 сильная катионообменная загруженная колонка	Amersham Biosciences
SE53 Cellulose, микрогранулярный сильный катионообменный носитель	Whatman
SP Sepharose Fast Flow сильный катионообменный носитель	Amersham Biosciences

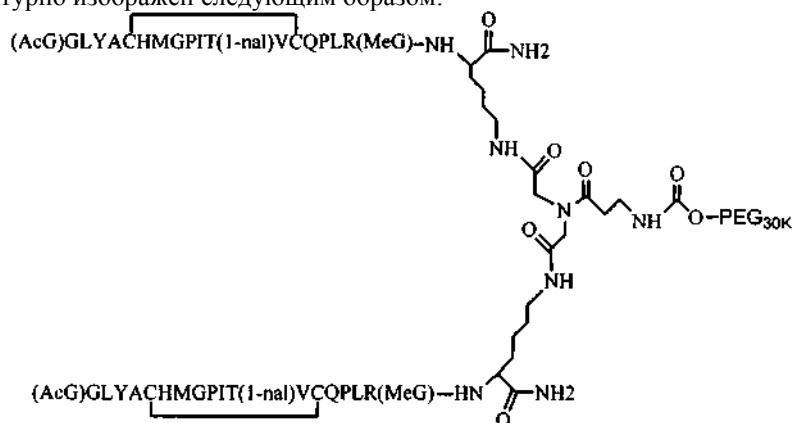
Пример 6. Синтез гомодимеров пептидов - агонистов ЭПО-рецептора из мономеров пептидов, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1).

Гомодимеры пептидов - агонисты ЭПО-рецептора синтезируют из мономеров, имеющих последовательность (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), как описано в примере 1, за исключением того, что синтезируемые на этапе 1 мономеры представляют собой (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K.

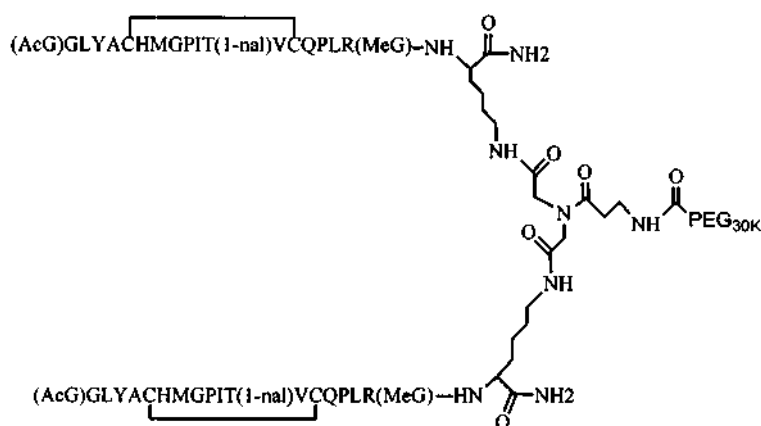
В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкер карбаматной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:



В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкеру карбаматной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:



В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкеру амидной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:



Пример 7. Способы анализа активности *in vitro*.

В этом примере описаны различные способы анализа *in vitro*, которые подходят для оценки активности и эффективности пептидов-агонистов ЭПО-рецептра согласно данному изобретению. Результаты этих анализов демонстрируют, что новые пептиды согласно этому изобретению связывают ЭПО-рецептор и активируют опосредуемую ЭПО-рецептором передачу сигналов. Более того, результаты этих анализов показывают, что составы, содержащие новые пептиды, проявляют неожиданное повышение аффинности связывания ЭПО-рецептра и биологической активности по сравнению с описанными ранее пептидами - миметиками ЭПО.

Пептидные димеры - агонисты ЭПО-рецептора готовят согласно способам, предусмотренным в примере 1 или примере 2.

Эффективность этих пептидных димеров оценивают в последовательных анализах активности *in vitro*, включая анализ активации репортерного гена, анализ пролиферации, анализ конкурентного связывания, анализ К/ВОЕ-Э. Более подробно эти четыре вида анализа описаны ниже.

Результаты этих анализов активности *in vitro* суммированы в табл. 4.

1. Анализ активации репортерного гена.

Этот анализ основан на клетке, меченой репортерным геном («репортерная клетка»), полученной из линии В-клеток-предшественников мыши, Vaf3/EpoR/GCSFRfos/lux. Эта линия репортерных клеток экспрессирует химерный рецептор, состоящий из внеклеточной части ЭПО-рецептора человека и внутриклеточной части Г-КСФ-рецептора человека. Далее, эту клеточную линию трансфецируют конструкцией, содержащей репортерный ген люциферазы, контролируемой промотором fos. Активация этого химерного рецептора добавлением вещества, стимулирующего эритропоэз, вызывает экспрессию репортерного гена люциферазы, и, следовательно, возникновению свечения при добавлении субстрата люциферазы - люциферина. Следовательно, уровень активации ЭПО-рецептора в таких клетках можно количественно определить, измерив активность люциферазы.

Клетки Vaf3/EpoR/GCSFRfos/lux культивируют в среде DMEM/F12 (Gibco), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS, Hyclone), 10% супернатанта WENI-3 (супернатант культуры клеток WENI-3 коллекции ATCC # TIB-68) и пенициллином/стрептомицином. Приблизительно за 18 ч до проведения анализа клетки переводят на среду DMEM/F12, дополненную 10% фетальной сыворотки (FBS, Hyclone) и 0,1% супернатанта WENI-3 (среда с недостатком факторов роста). В день проведения анализа клетки один раз промывают средой DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3), затем 1×10^6 клеток культивируют в присутствии известных концентраций тестируемого пептида, либо с ЭПО (R & D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США). В этом анализе одновременно тестируют серийные разведения тестируемого пептида. Планшеты для анализа инкубируют в течение 4 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, после чего в каждую лунку добавляют люциферин (Steady-Glo, Promega, Мэдисон, Висконсин, США). После 5-минутной инкубации измеряют свечение на люцинометре Packard Topcount Luminometer (Packard Instruments Co. Даунерс Гроув, Иллинойс, США). При помощи программного обеспечения Graph Pad строят график зависимости количества световых импульсов от концентрации тестируемого пептида. Концентрация тестируемого пептида, которая дает свечение, равное половине максимального значения, заносят в протокол как EC50 [см. табл. 4: Репортер EC50].

2. Исследование пролиферации.

Этот анализ основан на применении линии В-клеток-предшественников мыши, Vaf3, которые в результате трансфекции экспрессируют ЭПО-рецептор человека. Пролиферация полученной в результате клеточной линии, Vaf3/Gal4/Elk/EPOR, зависит от активации ЭПО-рецептора. Степень пролиферации клеток количественно определяют при помощи тиазолила синего (MTT), сигнал в анализе с MTT пропорционален числу жизнеспособных клеток.

Клетки Vaf3/Gal4/Elk/EPOR культивируют в центрифужных пробирках в среде DMEM/F12 (Gibco), дополненной 10% фетальной сыворотки (FBS, Hyclone) и 2% супернатанта WENI-3 (коллекция ATCC # TIB-68). Культивируемые выдерживают в течение ночи в центрифужных пробирках при плотности

1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS и 0,1% супернатанта WENI-3 (недостаток супернатанта). Затем инкубированные на бедной среде клетки дважды промывают фосфатным буферным раствором Дульбекко (Gibco) и ресуспендируют до плотности 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Затем аликвоты суспензии клеток объемом 50 мкл (~50000 клеток) вносят в трипликатах в 96-луночные планшеты для анализа. В эти 96-луночные планшеты добавляют аликвоты объемом 50 мкл (конечный объем в ячейке 100 мкл) серий разведений тестируемых пептидов - миметиков ЭПО, либо 50 мкл ЭПО, либо Aranesp™ (дарбепозин альфа, коммерчески доступный агонист ЭПО-рецептора, Amgen) в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Например, можно тестировать 12 разных разведений, конечная концентрация тестируемого пептида (или контрольного пептида ЭПО) в которых варьируется от 821 до 0,0045 пМ. Затем клетки в планшете инкубируют в течение 48 ч при 37°C. Затем, в каждую лунку культурального планшета добавляют по 10 мкл МТТ (Roche Diagnostics) и оставляют для инкубации на 4 ч. Затем реакцию останавливают добавлением 10% SDS (додецилсульфат натрия) + 0,01-нормальная HCl. Затем планшеты инкубируют в течение ночи при 37°C. Затем проводят спектрофотометрическое измерение поглощения в каждой лунке при длине волны 595 нм. При помощи ПО Graph Pad строят график зависимости поглощения от концентрации тестируемого пептида и рассчитывают EC50. Концентрация тестируемого пептида, которая дает 50% максимального поглощения, заносится в протокол как EC50 (см. табл. 4, Пролиферация EC50).

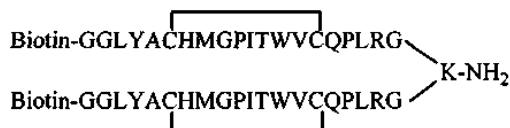
3. Исследование конкурентного связывания.

Расчеты конкурентного связывания проводят, используя анализ, в котором световой сигнал генерируется как функция близости двух гранул: стрептавидиновой гранулы-донора, покрытой биотинилированной пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, и гранулы-акцептора, к которой присоединен ЭПО-рецептор. Свет порождает неизлучающий перенос энергии, в ходе которого первая гранула вследствие освещения высвобождает синглетный кислород, контакт с которым вызывает испускание света второй гранулой. Эти наборы гранул коммерчески доступны (Packard). Близость гранул порождается связыванием пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, с ЭПО-рецептором. Тестируемый пептид, конкурирующий с пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, за связывание с ЭПО-рецептором, препятствует этому связыванию, что вызывает снижение свечения.

Более подробно данный метод представляет собой следующее.

Добавляют 4 мкл серийных разведений пептида-агониста ЭПО-рецептора, либо положительного или отрицательного контроля, в лунки 384-луночного планшета. После этого добавляют в каждую лунку смеси рецептора с гранулами. Смесь рецептора с гранулами состоит из 15 мкл стрептавидиновых (5 мг/мл) гранул-доноров (Packard), 15 мкл моноклонального антитела ab179 (5 мг/мл, это антитело распознает часть плацентарной щелочной фосфатазы, содержащуюся в рекомбинантном ЭПО-рецепторе), гранулы-акцепторы, покрытые белком А (белок А будет связывать антитело ab179, Packard), 112,5 мкл разведения 1:6,6 рекомбинантного ЭПО-рецептора (продуцируемого клетками яичника китайского хомячка в виде белка слияния с частью плацентарной щелочной фосфатазы, которая содержит целевой эпитоп для антитела ab179) и 607,5 мкл буфера Alphaquest (40 мм HEPES, pH 7,4, 1 мм MgCl₂, 0,1% БСА, 0,05% Tween 20). Перемешивают постукиванием. Добавляют в каждую лунку по 2 мкл биотинилированной пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, AF33068 (конечная концентрация 30 нМ). AF33068, связывающий ЭПО-рецептор пептид (см. табл. 3 «Репортер EC50 (пМ)»), готовят согласно способам, описанным в примере 1.

AF33068



Перемешивают центрифугированием в течение 1 мин. Закрывают планшет пленкой Packard Top Seal и оборачивают фольгой. Инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. После 18 ч измеряют свечение на считывающем устройстве Alpha Quest (Packard). Строят график зависимости свечения от концентрации пептида и анализируют при помощи Graph Pad или Excel.

Концентрацию тестируемого пептида, которая дает 50% снижение свечения по сравнению с наблюдаемым без тестируемого пептида, заносит в протокол как IC50.

4. Исследование К/ВОЕ-Э.

Передача сигнала с ЭПО-рецептора стимулирует дифференцировку стволовых клеток костного мозга в пролиферирующие клетки - предшественники эритроцитов. В этом анализе измеряют способность тестируемых пептидов стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток - предшественников эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток костного мозга человека.

Для этого анализа делают серийные разведения тестируемого пептида в среде IMDM (Gibco), дополненной 10% FBS (Nucclone). Затем эти серийные разведения либо положительный контроль (пептид ЭПО) добавляют к метилцеллюлозе до получения конечного объема, равного 1,5 мл. Смесь метилцеллюлозы и пептида тщательно перемешивают в специальном приборе (vortex). Размораживают аликвоты

(100000 клеток/мл) CD34+клеток, полученных из костного мозга человека (Poietics/Cambrex). Размороженные клетки осторожно добавляют к 0,1 мл 1 мг/мл ДНКазы (Stem Cells) в пробирке объемом 50 мл. Затем к клеткам осторожно добавляют 40-50 мл среды IMDM: среду добавляют отдельными каплями по стенке пробирки объемом 50 мл до объема 10 мл, а затем доливают оставшийся объем по стенке пробирки. Затем клетки центрифугируют при 900 об/мин в течение 20 мин и осторожно удаляют среду путем аспирации. Клетки ресуспендируют в 1 мл среды IMDM и подсчитывают плотность клеток на 1 мл среды на предметном стекле гемоцитометра (аликвоту объемом 10 мкл помещают на предметное стекло, а плотность клеток считают как среднее число $\times 10000$ клеток/мл). Затем клетки разбавляют в среде IMDM до плотности 15000 клеток/мл. Добавляют по 100 мкл разбавленных клеток на каждые 1,5 мл метилцеллюлозы вместе с пробой пептида (конечная концентрация клеток в анализируемой среде равна 1000 клеток/мл) и смесь перемешивают в специальном приборе (vortex). Ждут, пока исчезнут пузыри в смеси, а затем отбирают путем аспирации 1 мл, используя иглу с тупым концом. Добавляют по 0,25 мл отобранной смеси из каждой пробы в каждую из 4 лунок 24-луночного планшета (марки Falcon). Инкубируют помещенные в планшет смеси при 37°C во влажном инкубаторе с 5% содержанием CO₂ в атмосфере в течение 14 дней. Проводят подсчет эритроидных колоний, используя фазово-контрастный микроскоп (объектив 5X-10X, конечное увеличение 100X). Концентрацию тестируемого пептида, при которой число образованных колоний составляет 90% максимального относительно наблюдаемого в положительном контроле с ЭПО, вносят в протокол как EC90 [см. табл. 4, К/ВОЕ-Э EC90].

Таблица 4

Исследование активности *in vitro* пептидных димеров

Обозначение соединения	Пептидный димер	Репортер EC50 (пМ)	Пролиферация EC50 (пМ)	AQ IC50 (нМ)	К/ВОЕ-Э EC90 (нМ)
AF36205	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-PEG_{30K}</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR-NH-CO-CH₂-CH₂-NH-CO-PEG_{30K}</p>	---	---	---	6.2

Пример 8. Методики анализа активности *in vivo*.

В этом примере описаны различные способы анализа *in vivo*, которые подходят для оценки активности и эффективности пептидов-агонистов ЭПО-рецептора согласно данному изобретению. Пептидные димеры - агонисты ЭПО-рецептора готовят согласно способам, приведенным в примере 1. Эффективность этих пептидных димеров оценивают в последовательных анализах активности *in vivo*, включая биологический анализ с использованием послегипоксических полицетемических мышей и анализ ретикулоцитов. Ниже эти два анализа описаны более подробно.

1. Биоанализ (биотест) с использованием постгипоксических полицетемических мышей.

Активность тестируемых пептидов *in vivo* анализируют в биологическом анализе, разработанном на основе метода постгипоксических полицетемических мышей, описанного в Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067. В этом анализе исследуют способность тестируемого пептида функционировать в качестве миметика ЭПО, т.е. активировать ЭПО-рецептор и индуцировать образование новых эритроцитов. Образование новых эритроцитов количественно оценивают по включению радиомеченного железа в гемоглобин образуемых эритроцитов.

Мышам линии BDF1 позволяют акклиматизироваться к условиям окружающей среды в течение 7-10 дней. Определяют массу тела всех животных и животных с низкой массой (< 15 г) не используют. Мышей подвергают последовательным тренировочным циклам в камере с низким давлением общей продолжительностью 14 дней. Каждый 24-часовой цикл состоит из 18 ч при давлении, равном 0,40±0,02% атмосферного, и 6 ч при давлении окружающей среды. После тренировки мышей держат при давлении окружающей среды в течение дополнительных 72 ч перед началом дозирования.

Тестируемые пептиды или стандарты рекомбинантного ЭПО человека разводят в разбавителе ФБР + 0,1% БСА (ФБР/БСА). Группы отрицательного контроля включают одну группу мышей, которым путем инъекции вводят только ФБР/БСА, и одну группу мышей, которым путем инъекции вводят 1% ДМСО. В каждую группу дозирования входят 10 мышей. Инъекции мышам делают подкожно (в заднюю

часть шеи), вводя по 0,5 мл соответствующей пробы.

Через 48 ч после инъекции пробы мышам вводят, путем внутривенных инъекций, 0,2 мл Fe^{59} (Dupont, NEN) для получения дозы, приблизительно равной 0,75 мкКюри/мышь. Массу тела мыши определяют через 24 ч после введения Fe^{59} , а через 48 ч после введения Fe^{59} мышей забивают. У каждого животного путем пункции сердца отбирают кровь и определяют гематокрит (в качестве антикоагулянта применяли гепарин). Каждую пробу крови (0,2 мл) исследуют на включение Fe^{59} при помощи счетчика гамма-квантов Packard. Нерактивных мышей (т.е. мышей с включением радиоактивного вещества, меньшим, чем в группе отрицательного контроля) исключают из соответствующего набора данных. Мышей со значениями гематокрита ниже, чем 53% гематокрита группы отрицательного контроля, также исключают.

Результаты получают из наборов по 10 животных для каждой экспериментальной дозы. Рассчитывают среднее количество включенной радиоактивности (импульсов в минуту) в пробах крови от каждой группы.

2. Анализ ретикулоцитов.

Нормальным мышам линии BDF1 в течение трех дней (последовательно) вводят (0,5 мл, путем подкожной инъекции) либо контрольный ЭПО, либо тестируемый пептид. На третий день мышам также вводят дозу (0,1 мл, путем внутривенной инъекции) комплекса Декстран Железо (препарат iron dextran). На пятый день мышей анестезируют углекислым газом (CO_2) и отбирают кровь путем пункции сердца. Определяют процент (%) ретикулоцитов в каждой пробе крови путем окраски тиазоловым оранжевым и поточного цитометрического анализа (программа retic-count). Гематокрит определяли вручную. Уточненный процент ретикулоцитов определяют по следующей формуле:

$$\%РЕТИКУ_{УТОЧНЕННЫЙ} = \%РЕТИКУ_{НАБЛЮДАЕМЫЙ} \times (\text{Гематокрит}_{ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ} / \text{Гематокрит}_{НОРМАЛЬНЫЙ})$$

3. Гематологический анализ.

Нормальным мышам линии CD1 четыре раза в неделю вводят, путем болюсной инъекции, либо положительный контроль ЭПО, либо тестируемый пептид, либо разбавитель. Диапазон доз, выраженных в мг/кг, положительного контроля и тестируемого пептида исследуют путем варьирования концентрации соединения в лекарственной форме. Вводимые путем инъекции объемы равны 5 мг/кг. Контрольная группа, получающая разбавитель, состоит из 12 животных, в то время как в каждую из других групп дозирования входит по 8 животных. Регистрируют жизнеспособность (ежедневно) и массу тела (еженедельно).

Получающих дозы пептидов мышей лишают питания, а затем анестезируют вдыхаемым изофлюраном и отбирают пробы крови (перед смертью мышей) путем пункции сердца или брюшной аорты в день 1 (для мышей контрольной группы, получающих разбавитель) и в дни 15 и 29 (4 мыши/группа/день). Кровь переносят в пробирки марки Vacutainer®. Предпочтительным антикоагулянтом является этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, EDTA).

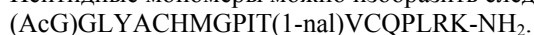
Образцы крови исследуют с целью измерения образования эритроцитов в конечных точках и определения таких физиологических показателей, как гематокрит, гемоглобин и общее число эритроцитов, с применением автоматизированных клинических анализаторов, хорошо известных в данной области (например, производства Coulter, Inc.).

Пример 9. Синтез гомодимеров пептидов - агонистов ЭПО-рецептора из мономеров пептидные, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1)

Этап 1. Синтез пептидных мономеров.

Пептидные мономеры синтезируют, используя группу Fmoc стандартного химического состава, на синтезаторе пептидов ABI 431 A, используя смолу TG-RAM (0,18 ммоль/г, Rapp Polymere, Германия). Для синтеза пептидных мономеров с амидированным карбоксильным концом полностью собранный пептид отщепляют от смолы составом, содержащим 82,5% TFA, 5% воды, 6,25% анизол, 6,25% этандиола. Лишенный защиты продукт отфильтровывают от смолы и осаждают диэтиловым эфиром. После тщательного высушивания продукт очищают обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18 с градиентом водного раствора ацетонитрила в 0,1% трифторацетата. Структуру пептида подтверждают путем масс-спектрометрии (электроспрей).

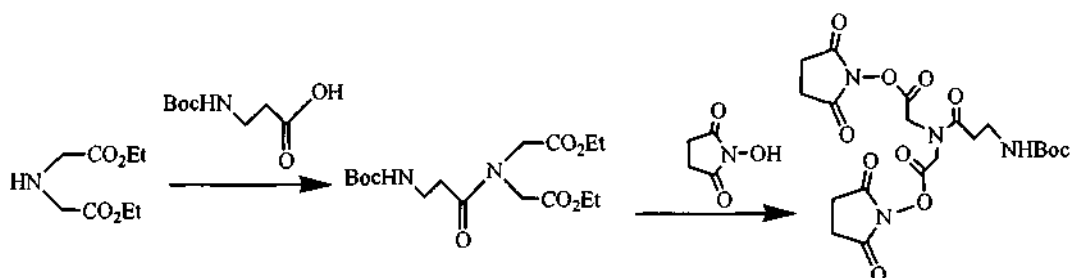
Пептидные мономеры можно изобразить следующим образом:



Этап 2. Синтез трифункционального линкера.

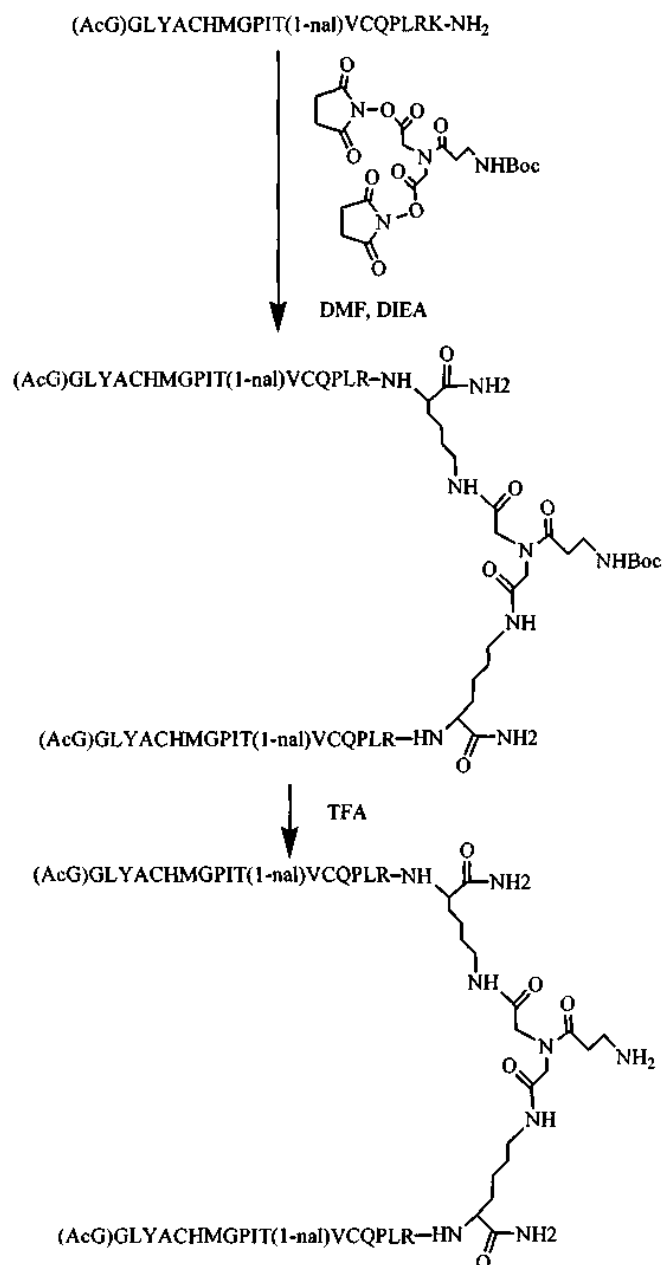
К раствору диэтилминоацетата (10,0 г, 52,8 ммоль) и Вос-бета-аланина (10,0 г, 52,8 ммоль) в 100 мл DCM добавляли диизопропилкарбодиимид (8,0 мл, 51,1 ммоль) в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакционная смесь нагревалась на $\sim 10^\circ$, а затем в течение 20 мин вновь остывала до комнатной температуры. Реакционную смесь оставляли для перемешивания в течение ночи и отфильтровывали осажденную диизопропилмочевину. Растворитель удаляли при пониженном давлении, в результате чего получали камедь, а остаток растворяли в этилацетате и снова фильтровали для того, чтобы удалить дополнительную осажденную мочевины. Органическую фазу помещали в делительную воронку, промывали (насыщ. $NaHCO_3$, концентрированный раствор хлорида натрия, 0,5-нормальная HCl), высушивали

(MgSO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением в результате сложнэфирного продукта в виде бесцветного масла. Сложный эфир экстрагировали в смеси (1:1) MeOH и THF (100 мл), и добавляли к этой смеси воду (25 мл), а затем - NaOH (5 г, 125 ммоль). Измеренное значение pH составляло >10. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, а затем подкисляли 6-нормальной соляной кислотой до значения pH, равного 1. Затем водную фазу насыщали NaCl и 4 раза экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали (концентрированным раствором NaCl), высушивали (MgSO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая в результате белый полутвердый продукт. Твердый продукт растворяли в 50 мл DCM, и добавляли к этому 300 мл гексана, в результате чего получали белую суспензию. Растворитель удаляли при пониженном давлении, в результате чего получали двукислоту в виде белого твердого продукта (14,7 г, выход для двух этапов 91,5%). К раствору двукислоты (1 г, 3,29 ммоль) в 20 мл DMF добавляли N-гидроксисукцинимид (770 мг, 6,69 ммоль) и диизопропилкарбодиимид (1,00 мл, 6,38 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (3 мг, 0,02 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и удаляли растворитель при пониженном давлении. Органическую фазу экстрагировали в этилацетате и фильтровали для того, чтобы удалить осажденную мочевины. Органическую фазу помещали в делительную воронку, промывали (насыщ. NaHCO₃, концентрированный раствор хлорида натрия, 0,5-нормальная HCl), высушивали (MgSO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая в результате сложнэфирный продукт ди-N-гидроксисукцинимида в виде белого твердого вещества (1,12 г, выход 68%).



Этап 3. Присоединение трифункционального линкера к пептидным мономерам.

Для присоединения линкера, 2 экв. пептида смешивают с 1 экв. трифункционального линкера в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор, к которому через 2 мин добавляют 5 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 14 ч. Растворитель удаляют при пониженном давлении, а неочищенный продукт растворяют в 80% TFA в DCM в течение 30 мин для того, чтобы удалить группу Boc, затем следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру димера подтверждали масс-спектрометрией (электроспрей). В ходе этой реакции к атому азота ε-аминогруппы остатка лизина каждого мономера присоединяется линкер.



Этап 4. Синтез фрагмента ПЭГ, состоящего из двух линейных цепей ПЭГ, связанных Лизин-mPEG2-Lysinol-NPC.

Лизинол, который доступен для приобретения, обрабатывают избытком mPEG-NPC для образования mPEG2-Лизинол. Затем проводят реакцию mPEG2-Lysinol с NPC для образования mPEG2-Лизинол-NPC.

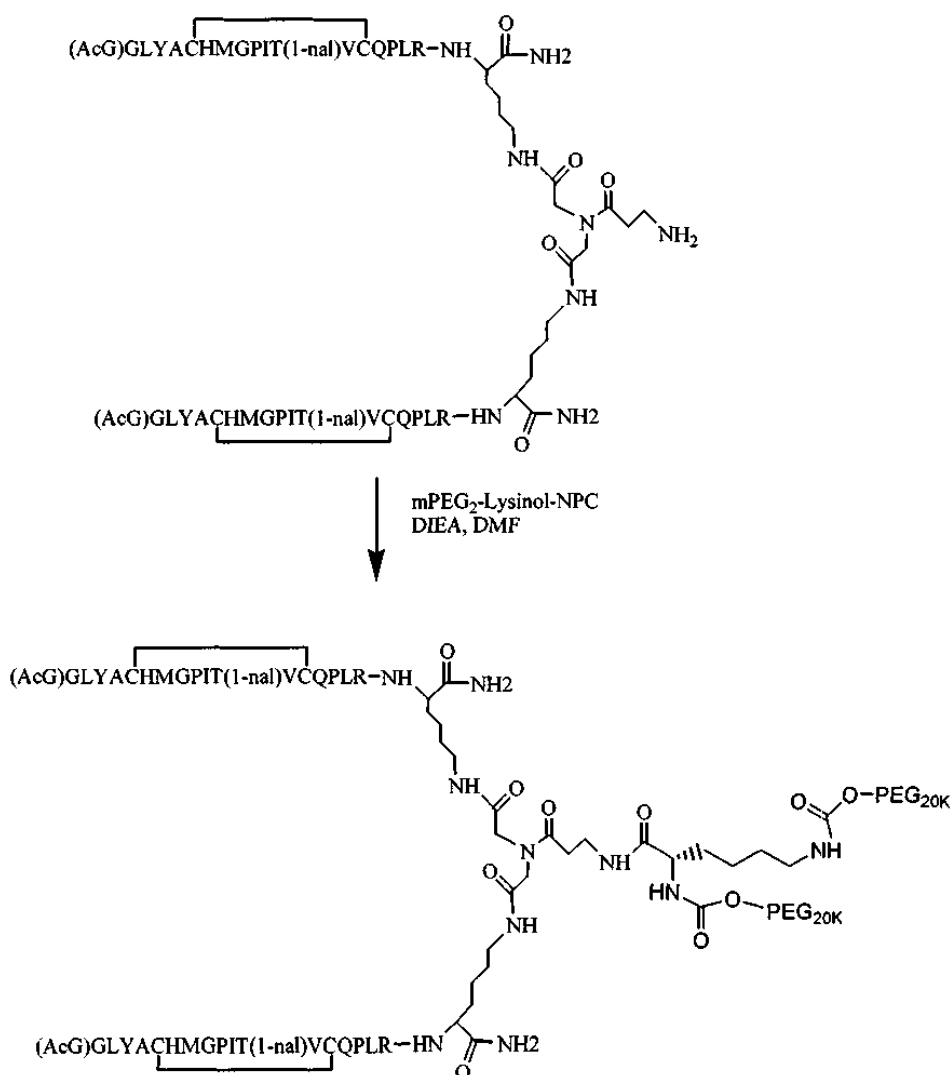
mPEG2-Lys-NHS.

Этот продукт можно приобрести, например, по каталогу Molecular Engineering компании Nectar Therapeutics (490 Discovesy Drive, Huntsville, Alabama 35806), предмет № 2Z3X0T01.

Этап 5. Присоединение ПЭГ к пептидному димеру.

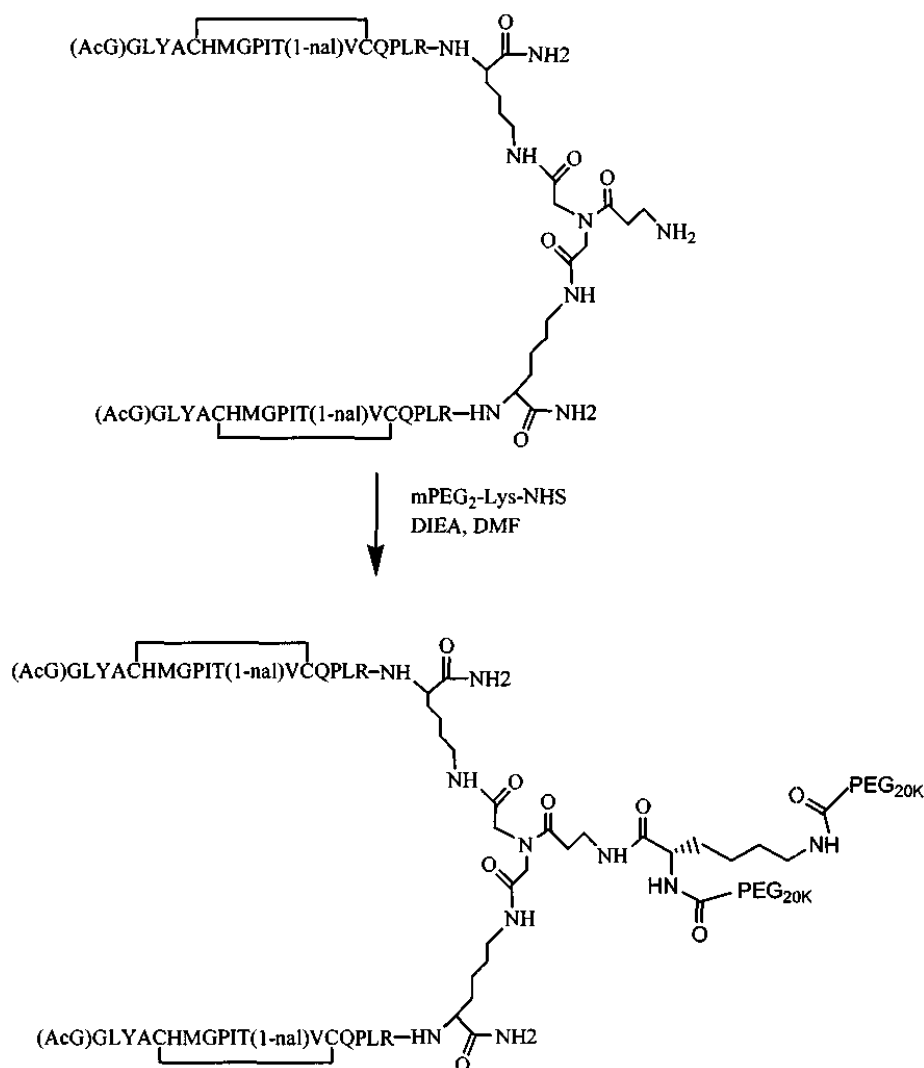
Присоединение ПЭГ карбаматной связью.

Пептидные димеры смешивают в молярном соотношении 1:2 с молекулами ПЭГ (mPEG2-Lysinol-NPC) в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор. После 5 мин к полученному, как описано выше, раствору добавляют 4 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 14 ч, после чего следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждают масс-спектрометрией (MALDI). Очищенный пептид также подвергают очистке катионообменной хроматографией, схема которой приведена ниже.



Присоединение ПЭГ амидной связью.

Пептидные димеры смешивают в молярном соотношении 1:2 с молекулами ПЭГ (mPEG2-Lys-NHS, Shearwater Corp., США) в сухом DMF, в результате чего получают прозрачный раствор. После 5 мин к раствору (см. выше) добавляют 10 экв. DIEA. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 2 ч, после чего следует очистка обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке C18. Структуру пептида с присоединенным ПЭГ подтверждают масс-спектрометрией (MALDI). Очищенный пептид также подвергают очистке катионообменной хроматографией, схема которой приведена ниже.



Этап 6. Ионообменная очистка пептидов.

Ионообменная очистка.

Была исследована способность нескольких обменных носителей отделять полученный, как описано выше, конъюгат пептид-ПЭГ от непрореагировавшего (или гидролизованного) ПЭГ, в дополнение к их способности удерживать исходные димерные пептиды. Ионообменную смолу (2-3 г) загружали в 1 см колонку, после чего смолу переводили в натриевую форму (0,2-нормальную NaOH загружали в колонку до достижения значения pH элюанта 14, приблизительно 5 объемов колонки), а затем - в водородную форму (элюировали либо 0,1-нормальной HCl, либо 0,1M HOAc, до тех пор, пока pH элюанта не совпал с pH загрузки, приблизительно 5 объемов колонки), за этим следовали три промывки в 25% водном растворе ACN, до достижения значения pH 6. Либо пептид до конъюгирования с ПЭГ, либо конъюгат пептид - ПЭГ растворяли в 25% водном растворе ACN и доводили значение pH до <3 при помощи TFA, после чего загружали в колонку. После промывки 2-3 объемами 25% водного раствора ACN и сбора 5 мл фракций, пептид выделяли из колонки путем элюции 0,1 M раствором NH₄OAc в 25% водном растворе ACN, снова собирали 5 мл фракции. Исследование путем ВЭЖХ показывало, в каких фракциях содержится желаемый пептид.

Анализ на испарительном детекторе светорассеяния (ELSD) показал, что когда пептид удерживался на колонке и его элюировали раствором NH₄OAc (обычно между фракциям 4 и 10), загрязнения неконъюгированным ПЭГ выявлено не было. Когда пептид элюировали исходным промывочным буфером (обычно первые две фракции), не было выявлено разделения желательного конъюгата ПЭГ и избыточного ПЭГ.

Следующие колонки успешно удерживали как пептид, так и конъюгат пептид-ПЭГ, а также успешно очищали конъюгат пептид-ПЭГ от неконъюгированного пептида.

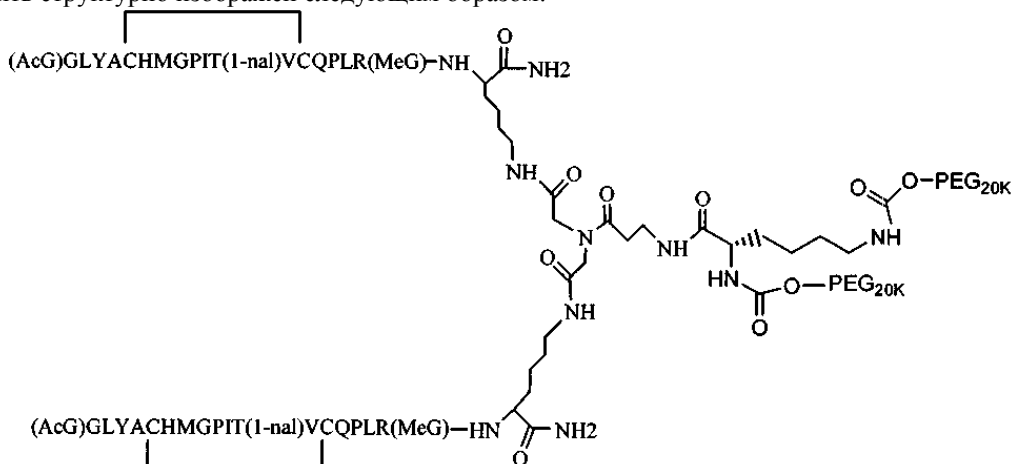
Ионообменные смолы

Носитель	Производитель
Моно S HR 5/5, сильный катионообменный носитель в колонке	Amersham Biosciences
Микрогранулированная SE57 Cealulose, сильный катионообменный носитель	Whatman
SP Sepharose Fast Flow сильный катионообменный носитель	Amersham Biosciences

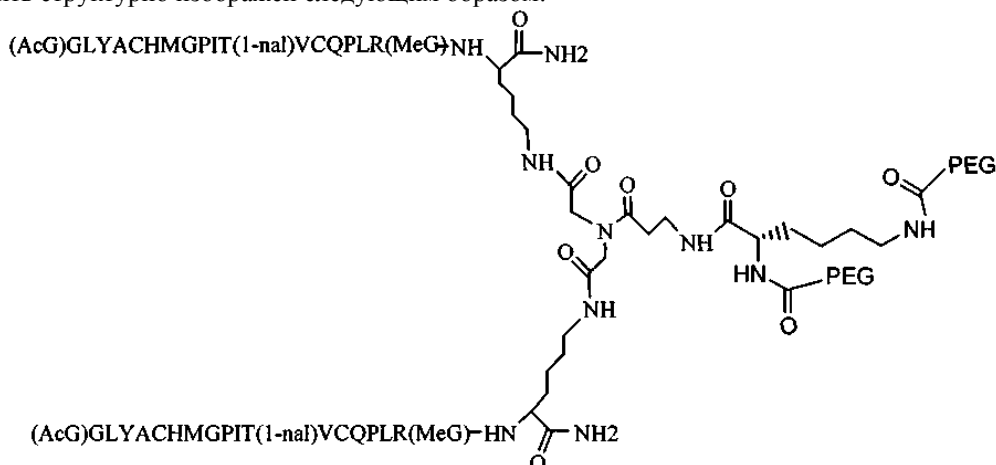
Синтез гомодимеров пептидов - агонистов ЭПО-рецептора из мономеров, имеющих последовательность аминокислот (SEQ ID NO: 1).

Гомодимеры пептидов - агонисты ЭПО-рецептора синтезируют из мономеров, имеющих последовательность аминокислот (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2), синтезируют как описано в примере 1, за исключением того, что синтезируемые на этапе 1 мономеры представляют собой (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K.

В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкеру карбаматной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:



В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкеру карбаматной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:



В случае, когда ПЭГ присоединяется к линкеру амидной связью, конечный продукт синтеза может быть структурно изображен следующим образом:

T1B-68). Культивируемые клетки выдерживают в течение ночи в центрифужных пробирках при плотности 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS и 0,1% супернатанта WENI-3 (среда с недостатком факторов роста). Затем инкубированные в бедной среде клетки дважды промывают фосфатным буферным раствором Дульбекко (Gibco) и ресуспендируют до плотности 1×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Затем аликвоты суспензии клеток объемом 50 мкл (~50000 клеток) вносят в трипликатах в 96-луночные планшеты для анализа. В эти 96-луночные планшеты добавляют аликвоты объемом 50 мкл (конечный объем в ячейке 100 мкл) серий разведений тестируемых пептидов - миметиков ЭПО, либо 50 мкл ЭПО, либо Aranesp™ (дарбепоегин альфа, коммерчески доступный агонист ЭПО-рецептора, Amgen) в среде DMEM/F12, дополненной 10% FBS (без супернатанта WENI-3). Например, можно тестировать 12 разных разведений, конечная концентрация тестируемого пептида (или контрольного пептида ЭПО) в которых варьируется от 821 до 0,0045 пМ. Затем клетки в планшете инкубируют в течение 48 ч при 37°C. Затем, в каждую лунку культурального планшета добавляют по 10 мкл МТТ (Roche Diagnostics) и оставляют для инкубации на 4 ч. Затем реакцию останавливают добавлением 10% SDS (додецилсульфат натрия) + 0,01-нормальная HCl. Затем планшеты инкубируют в течение ночи при 37°C. Затем проводят спектрофотометрическое измерение поглощения в каждой лунке при длине волны 595 нм.

При помощи ПО Graph Pad строят график зависимости поглощения от концентрации тестируемого пептида и рассчитывают EC50. Концентрацию тестируемого пептида, которая дает 50% максимального поглощения, заносят в протокол как EC50.

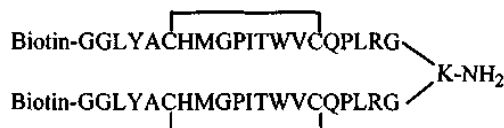
3. Исследование конкурентного связывания.

Оценку конкурентного связывания проводят, используя способ анализа, при котором световой сигнал генерируется как функция близости двух гранул: стрептавидиновой гранулы-донора, покрытой биотинилированной пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, и гранулы-акцептора, к которой присоединен ЭПО-рецептор. Свет порождает неизлучающий перенос энергии, в ходе которого первая гранула вследствие освещения высвобождает синглетный кислород, контакт с которым вызывает испускание света второй гранулой. Эти наборы гранул коммерчески доступны (Packard). Близость гранул порождается связыванием пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, с ЭПО-рецептором. Тестируемый пептид, конкурирующий с пептидной меткой, связывающей ЭПО-рецептор, за связывание с ЭПО-рецептором, препятствует этому связыванию, что вызывает снижение свечения.

Более подробно данный метод представляет собой следующее.

В лунки 384-луночного планшета добавляют 4 мкл серийных разведений пептида-агониста ЭПО-рецептора, либо положительного или отрицательного контроля. После этого добавляют в каждую лунку смеси рецептора с гранулами. Смесь рецептора с гранулами состоит из 15 мкл стрептавидиновых (5 мг/мл) гранул-доноров (Packard), 15 мкл моноклонального антитела ab179 (5 мг/мл, это антитело распознает часть плацентарной щелочной фосфатазы, содержащуюся в рекомбинантном ЭПО-рецепторе), гранулы-акцепторы, покрытые белком А (белок А будет связывать антитело ab179, Packard), 112,5 мкл разведения 1:6,6 рекомбинантного ЭПО-рецептора (продуцируемого клетками яичника китайского хомячка в виде белка слияния с частью плацентарной щелочной фосфатазы, которая содержит целевой эпитоп для антитела ab179) и 607,5 мкл буфера Alphaquest (40 мм HEPES, pH 7,4, 1 мм MgCl₂, 0,1%BCA, 0,05% Tween 20). Перемешивают постукиванием. Добавляют в каждую лунку по 2 мкл биотинилированной пептидной метки, связывающей ЭПО-рецептор, AF33068 (конечная концентрация 30 нМ). AF33068, связывающий ЭПО-рецептор пептид (см. табл. 6 «Репортер EC50 (пМ)»), готовят согласно способам, описанным в примере 1.

AF33068



Перемешивают центрифугированием в течение 1 мин. Закрывают планшет пленкой Packard Top Seal и обертывают его фольгой. Инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. После 18 ч измеряют свечение на считывающем устройстве Alpha Quest (Packard). Строят график зависимости свечения от концентрации пептида и анализируют его при помощи Graph Pad или Excel.

Концентрацию тестируемого пептида, которая дает 50% снижение свечения по сравнению с наблюдаемым без тестируемого пептида, заносят в протокол как IC50.

4. Исследование К/ВОЕ-Э.

Передача сигнала с ЭПО-рецептора стимулирует дифференцировку стволовых клеток костного мозга в пролиферирующие клетки - предшественники эритроцитов. При этом способе анализа измеряют способность тестируемых пептидов стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток - предшественников эритроцитов из плюрипотентных стволовых клеток костного мозга человека.

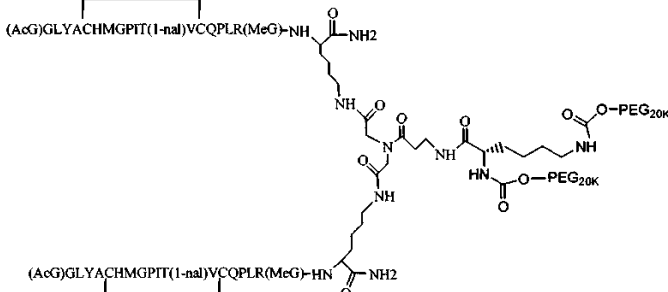
Для этого способа анализа делают серийные разведения тестируемого пептида в среде IMDM (Gibco), дополненной 10% FBS (Hyclone). Затем эти серийные разведения либо положительный контроль

(пептид ЭПО) добавляют к метилцеллюлозе до получения конечного объема, равного 1,5 мл. Смесь метилцеллюлозы и пептида тщательно перемешивают в специальном приборе (vortex). Размораживают аликвоты (100000 клеток/мл) CD34+клеток, полученных из костного мозга человека (Poietics/Cambrex). Размороженные клетки осторожно добавляют к 0,1 мл 1 мг/мл ДНКазы (Stem Cells) в пробирке объемом 50 мл. Затем к клеткам осторожно добавляют 40-50 мл среды IMDM: среду добавляют отдельными каплями по стенке пробирки объемом 50 мл до объема 10 мл, а затем доливают оставшийся объем по стенке пробирки. Затем клетки центрифугируют при 900 об/мин в течение 20 мин и осторожно удаляют среду путем аспирации. Клетки ресуспендируют в 1 мл среды IMDM и подсчитывают плотность клеток на 1 мл среды на предметном стекле гемоцитометра (аликвоту объемом 10 мкл помещают на предметное стекло, а плотность клеток считают как среднее число X 10000 клеток/мл).

Затем клетки разбавляют в среде IMDM до плотности 15000 клеток/мл. Добавляют по 100 мкл разбавленных клеток на каждые 1,5 мл метилцеллюлозы вместе с пробой пептида (конечная концентрация клеток в анализируемой среде равна 1000 клеток/мл) и смесь перемешивают в вихревом смесителе (vortex). Ждут, пока исчезнут пузыри в смеси, а затем отбирают путем аспирации 1 мл, используя иглу с тупым концом. Добавляют по 0,25 мл отобранной смеси из каждой пробы в каждую из 4 лунок 24-луночного планшета (марки Falcon). Инкубируют помещенные в планшет смеси при 37°C во влажном инкубаторе с 5% содержанием CO₂ в атмосфере в течение 14 дней. Проводят подсчет эритроидных колоний, используя фазово-контрастный микроскоп (объектив 5X-10X, конечное увеличение 100X). Концентрацию тестируемого пептида, при которой число образованных колоний составляет 90% максимального относительно наблюдаемого в положительном контроле с ЭПО, вносят в протокол как EC90

Таблица 6

Исследование активности *in vitro* для пептидных димеров

обозначение соединения	Пептидный димер	Репортер EC50 (pM)	Пролиферация EC50 (pM)	Радиолиганд IC50 (pM)	К/ВОЕ-Э EC90 (nm)
AF37702	 <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH₂</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)-NH₂</p>	195	165	111	3

Пример 12. Способы анализа активности *in vivo*.

В этом примере описаны различные способы анализа *in vivo*, которые подходят для оценки активности и эффективности пептидов-агонистов ЭПО-рецептора согласно данному изобретению. Пептидные димеры - агонисты ЭПО-рецептора готовят согласно способам, приведенным в примере 1. Активность этих пептидных димеров *in vivo* оценивают в последовательных анализах, включая метод послегипоксических полицетемических мышей и анализ ретикулоцитов. Ниже эти два анализа описаны более подробно.

1. Биоанализ (биотест) с использованием постгипоксических полицетемических мышей.

Активность тестируемых пептидов *in vivo* анализируют в биологическом анализе, разработанном на основе метода постгипоксических полицетемических мышей, описанного в Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067. В этом анализе исследуют способность тестируемого пептида функционировать в качестве миметика ЭПО, т.е. активировать ЭПО-рецептор и индуцировать образование новых эритроцитов. Образование новых эритроцитов количественно оценивают по включению радиомеченного железа в гемоглобин образуемых эритроцитов.

Мышам линии BDF1 позволяют акклиматизироваться к условиям окружающей среды в течение 7-10 дней. Определяют массу тела всех животных и животных с низкой массой (< 15 г) не используют. Мышей подвергают последовательным тренировочным циклам в камере с низким давлением общей продолжительностью 14 дней. Каждый 24-часовой цикл состоит из 18 ч при давлении, равном 0,40±0,02% атмосферного, и 6 ч при давлении окружающей среды. После тренировки мышей держат при давлении окружающей среды в течение дополнительных 72 ч перед началом дозирования.

Тестируемые пептиды или стандарты рекомбинантного ЭПО человека разводят в разбавителе ФБР + 0,1% БСА (ФБР/БСА). Группы отрицательного контроля включают одну группу мышей, которым путем инъекции вводят только ФБР/БСА, и одну группу мышей, которым путем инъекции вводят 1% ДМСО. В каждую группу дозирования входят 10 мышей. Инъекции мышам делают подкожно (в заднюю часть шеи), вводя по 0,5 мл соответствующей пробы.

Через 48 ч после инъекции пробы мышам вводят, путем внутривенных инъекций, 0,2 мл Fe^{59} (Dupont, NEN) для получения дозы, приблизительно равной 0,75 мкКюри/мышь. Массу тела мыши определяют через 24 ч после введения Fe^{59} , а через 48 ч после введения Fe^{59} мышей забивают. У каждого животного путем пункции сердца отбирают кровь и определяют гематокрит (в качестве антикоагулянта применяли гепарин). Каждую пробу крови (0,2 мл) исследуют на включение Fe^{59} при помощи счетчика гамма-квантов Packard. Нерактивных мышей (т.е. мышей с включением радиоактивного вещества, меньшим, чем в группе отрицательного контроля) исключают из соответствующего набора данных. Мышей со значениями гематокрита ниже, чем 53% гематокрита группы отрицательного контроля, также исключают.

Результаты получены из наборов по 10 животных для каждой экспериментальной дозы. Рассчитывают среднее количество включенной радиоактивности (импульсов в минуту) в пробах крови от каждой группы.

2. Анализ ретикулоцитов.

Нормальным мышам линии BDF1 в течение трех дней (последовательно) вводят (0,5 мл, путем подкожной инъекции) либо контрольный ЭПО, либо тестируемый пептид. На третий день мышам также вводят дозу (0,1 мл, путем внутривенной инъекции) комплекса Декстран Железо (препарат iron dextran). На пятый день мышей анестезируют углекислым газом (CO_2) и отбирают кровь путем пункции сердца. Определяют процент (%) ретикулоцитов в каждой пробе крови путем окраски тиазоловым оранжевым и поточного цитометрического анализа (программа retic-count). Гематокрит определяли вручную. Уточненный процент ретикулоцитов определяют по следующей формуле:

$$\%РЕТИКУ_{\text{УТОЧНЕННЫЙ}} = \%РЕТИКУ_{\text{НАБЛЮДАЕМЫЙ}} \times (\text{Гематокрит}_{\text{ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ}} / \text{Гематокрит}_{\text{НОРМАЛЬНЫЙ}})$$

3. Гематологический анализ.

Нормальным мышам линии CD1 четыре раза в неделю вводят, путем болюсной инъекции, либо положительный контроль ЭПО, либо тестируемый пептид, либо разбавитель. Диапазон доз, выраженных в мг/кг, положительного контроля и тестируемого пептида исследуют путем варьирования концентрации соединения в лекарственной форме. Вводимые путем инъекции объемы равны 5 мг/кг. Контрольная группа, получающая разбавитель, состоит из двенадцати животных, в то время как в каждую из других групп дозирования входит по 8 животных. Регистрируют жизнеспособность (ежедневно) и массу тела (еженедельно).

Получающих дозы пептидов мышей лишают питания, а затем анестезируют вдыхаемым изофлюраном и отбирают пробы крови (перед смертью мышей) путем пункции сердца или брюшной аорты в день 1 (для мышей контрольной группы, получающих разбавитель) и в дни 15 и 29 (4 мыши/группа/день). Кровь переносят в пробирки марки Vacutainer©. Предпочтительным антикоагулянтом является этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, EDTA).

Образцы крови исследуют с целью измерения образования эритроцитов в конечных точках и определения таких физиологических показателей, как гематокрит, гемоглобин и общее число эритроцитов, с применением автоматизированных клинических анализаторов, хорошо известных в данной области (например, производства Coulter, Inc.).

Настоящее изобретение не ограничивается объемом описанных здесь конкретных способов реализации. Действительно, из предшествующего описания и сопутствующих рисунков специалистам в данной области станут очевидны разнообразные модификации данного изобретения, дополняющие описанные здесь. Подразумевается, что такие модификации входят в объем защиты прилагаемой формулы.

Также следует понимать, что все значения являются приблизительными и приведены в описательных целях.

Описание изобретения содержит цитаты и обсуждение многочисленных источников, включая патенты, патентные заявки и различные публикации. Цитирование и/или обсуждение таких источников приведено просто для того, чтобы сделать более ясным описание настоящего изобретения, но не является признанием того, что какая-либо из этих ссылок является «прототипом» по отношению к настоящему изобретению. Все источники, цитируемые и обсуждаемые в этой спецификации, включены в неё в полном объеме путем ссылки, и в такой же степени включен путем ссылки каждый источник отдельно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, которое связывается с рецептором к эритропоэтину (ЕРО-R, ЭПО-рецептор) и активирует его и которое содержит гомодимер пептидного мономера, который выбран из группы, включающей:

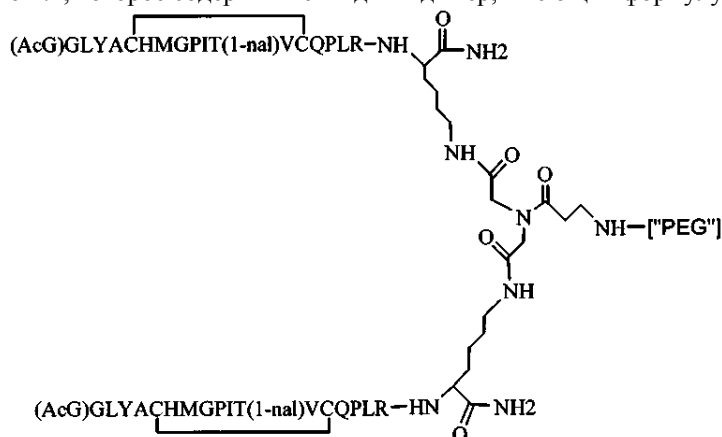
- (a) (AcG)CLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (SEQ ID NO: 1);
- (b) (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (SEQ ID NO: 2) и
- (c) (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (SEQ ID NO: 3),

где

(i) в каждом пептидном мономере пептидного димера каждая аминокислота обозначена стандартной однобуквенной аббревиатурой, AcG обозначает N-ацетилглицин, а 1-nal обозначает 1-нафтил-аланин;

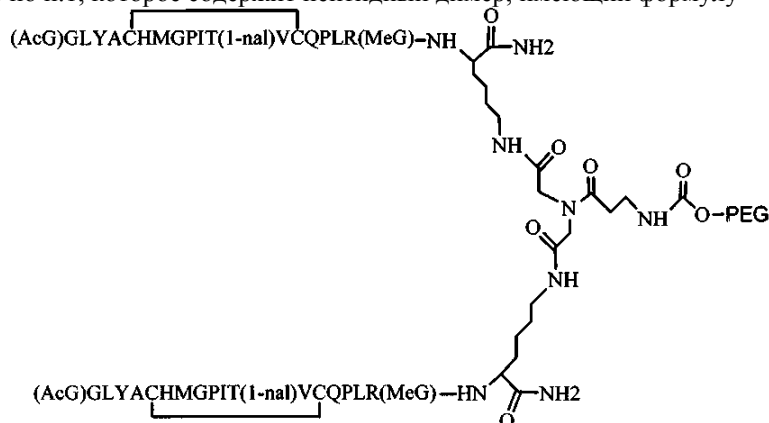
(ii) каждый пептидный мономер пептидного димера содержит внутримолекулярную дисульфидную связь между двумя остатками цистеина (C) каждого мономера; и где дополнительно указанные пептидные мономеры димеризованы путем ковалентной связи С-концевого остатка каждого мономера с линкером, и указанный линкер ковалентно соединен по меньшей мере с одним лизином и неразветвленным ПЭГ.

2. Соединение по п.1, которое содержит пептидный димер, имеющий формулу



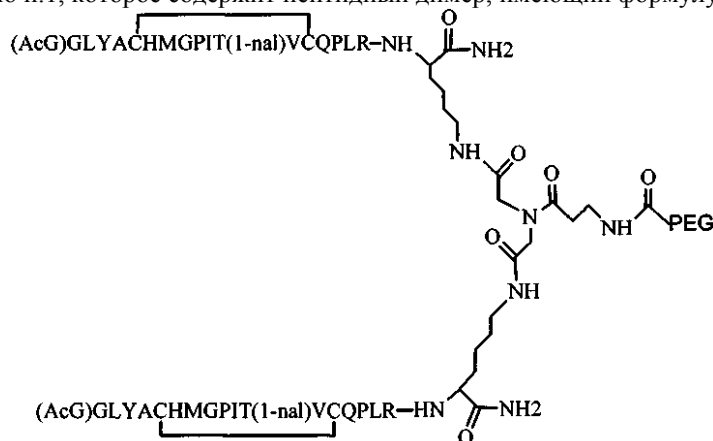
где ["PEG"] содержит по меньшей мере один линейный фрагмент полиэтиленгликоля (PEG, ПЭГ), причем каждый фрагмент ПЭГ имеет молекулярную массу примерно от 20000 до 40000 Да.

3. Соединение по п.1, которое содержит пептидный димер, имеющий формулу



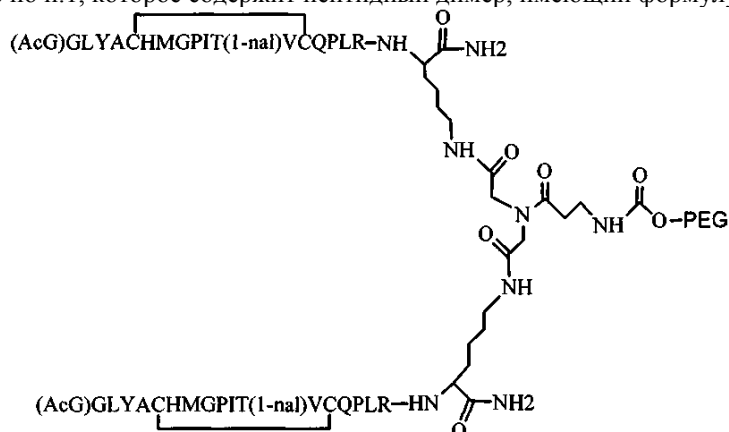
где PEG содержит одну линейную неразветвленную молекулу полиэтиленгликоля (ПЭГ), которая имеет молекулярную массу примерно от 20000 до 40000 Да.

4. Соединение по п.1, которое содержит пептидный димер, имеющий формулу



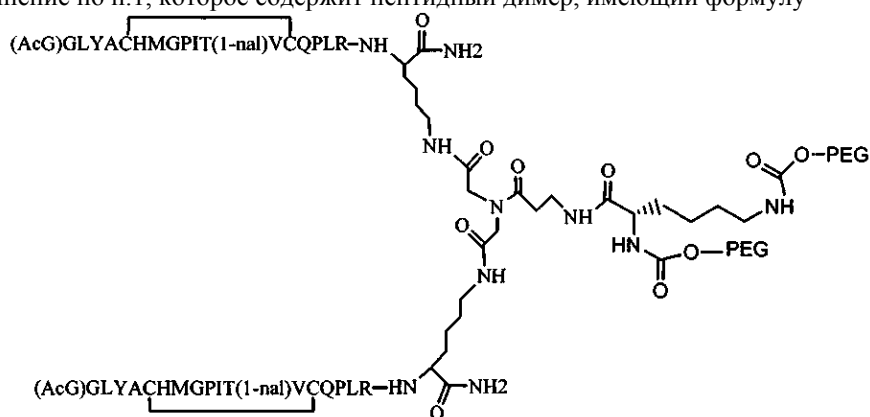
где PEG содержит линейную неразветвленную молекулу полиэтиленгликоля, причем каждая молекула ПЭГ имеет молекулярную массу примерно от 20000 до 40000 Да.

14. Соединение по п.1, которое содержит пептидный димер, имеющий формулу



где PEG содержит линейный неразветвленный фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), имеющий молекулярную массу примерно от 20000 до 40000 Да.

15. Соединение по п.1, которое содержит пептидный димер, имеющий формулу



где PEG содержит два линейных фрагмента полиэтиленгликоля (ПЭГ), имеющие в сумме молекулярную массу примерно от 10000 до 60000 Да.

16. Способ лечения пациента с нарушением, характеризующимся дефицитом эритропоэтина либо пониженной или недостаточной популяцией эритроцитов, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-15.

17. Способ согласно п.16, в котором нарушение выбирают из группы, состоящей из терминальной стадии почечной недостаточности или диализа, анемии на фоне СПИД, аутоиммунного заболевания или злокачественного заболевания, бета-талассемии, кистозного фиброза (муковисцедоза), анемии недоношенных детей, анемии, ассоциированной с хроническим воспалительным заболеванием, повреждения спинного мозга, острой потери крови, старения и состояний опухолевых заболеваний, сопровождаемых нарушенным эритропоэзом.

18. Фармацевтический состав, содержащий соединение по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

