

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 005**

51 Int. Cl.:

A61P 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2006 E 06789357 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1957517**

54 Título: **Uso de péptidos que se unen al receptor de TPO**

30 Prioridad:

09.08.2005 US 200416

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

19.08.2013

73 Titular/es:

**ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.
(100.0%)**

**US ROUTE 202 SOUTH,
RARITAN, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, BRIAN, R.;
WEIS, JEFFERY, KENNETH y
YURKOW, EDWARD, JOHN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 419 005 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de peptidos que se unen al receptor de TPO.

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención proporciona compuestos peptídicos que se unen y activan el receptor de trombopoyetina (c-mpl o TPO-R) o actúan de otro modo como agonistas de TPO. La invención tiene aplicación en los campos de la bioquímica y la química medicinal y de manera particular proporciona agonistas de TPO para uso en el tratamiento de enfermedades humanas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Los megacariocitos son células derivadas de la médula ósea, que son responsables de la producción de las plaquetas sanguíneas en circulación. A pesar de que incluye <0,25% de las células de médula ósea en la mayoría de las especies, tienen >10 veces el volumen de las células típicas de la médula ósea. Ver Kuter, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:11104-11108 (1994). Los megacariocitos sufren un proceso conocido como endomitosis por el que replican sus núcleos pero no experimentan división celular y con ello dan lugar a células poliploides. En respuesta a una disminución del recuento de plaquetas, aumenta la velocidad de endomitosis, se forman megacariocitos con mayor ploidía, y el número de megacariocitos puede aumentar hasta 3 veces. Ver Hanker, J. Clin. Invest., 47:458-465 (1968). En contraste, en respuesta a un recuento elevado de plaquetas, disminuye la velocidad de endomitosis, se forman megacariocitos con menor ploidía, y el número de megacariocitos puede disminuir en un 50%.

25 [0003] No se conoce el mecanismo de retroalimentación fisiológico exacto por el cual la masa de plaquetas circulantes regula la velocidad de endomitosis y el número de megacariocitos de médula ósea. Actualmente se cree que el factor trombopoyético circulante implicado en la mediación de este bucle de retroalimentación es la trombopoyetina (TPO). De manera más específica, la TPO ha demostrado ser el regulador humoral principal en situaciones que implican trombocitopenia. Véase, por ejemplo, Metcalf, Nature, 369:519-520 (1994). Se ha demostrado en varios estudios que la TPO aumenta el recuento de plaquetas, el tamaño de las plaquetas y la incorporación de isótopos en las plaquetas de los animales receptores. De forma específica, se cree que la TPO afecta a la megacariocitopoyesis de varias maneras: (1) produce aumentos en el tamaño y el número de los megacariocitos; (2) produce un aumento en el contenido del ADN, en forma de poliploidía, en los megacariocitos; (3) aumenta la endomitosis de los megacariocitos; (4) produce una maduración aumentada de los megacariocitos y (5) produce un aumento en el porcentaje de células precursoras, en forma de pequeñas células positivas de acetilcolinesterasa, en la médula ósea.

40 [0004] Las plaquetas (trombocitos) son necesarias para la coagulación de la sangre. Cuando su número es muy bajo, un paciente está en grave riesgo de muerte por hemorragia catastrófica. La TPO, por lo tanto, tiene una aplicación potencial útil tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diversos trastornos hematológicos, por ejemplo, enfermedades que se deben principalmente a los defectos plaquetarios. Los ensayos clínicos en curso con TPO han indicado que la TPO puede administrarse de forma segura a los pacientes. Además, estudios recientes han proporcionado una base para la proyección de la eficacia de la terapia de TPO en el tratamiento de trombocitopenia y particularmente la trombocitopenia resultante de la quimioterapia, terapia de radiación o trasplante de médula ósea como tratamiento del cáncer o linfoma. Véase, por ejemplo, McDonald, Am. J. Ped. Hematología/Oncología, 14:8-21 (1992).

50 [0005] El gen que codifica TPO ha sido clonado y caracterizado. Ver Kuter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91:11104-11108 (1994); Barley, et al., Cell, 77:1117-1124 (1994); Kaushansky et al., Nature 369:568-571 (1994); Wendling, et al., Nature, 369:571-574 (1994); y Sauvage et al., Nature, 369:533-538 (1994). La trombopoyetina es una glicoproteína con al menos dos formas, con masas moleculares aparentes de 25 kDa y 31 kDa, y con una secuencia común de aminoácidos N-terminal. Véase, Bartley, y col., Cell, 77:1117-1124 (1994). La trombopoyetina parece tener dos regiones distintas separadas por un sitio de escisión potencial Arg-Arg. La región amino-terminal se conserva en gran proporción en hombres y ratones, y tiene alguna homología con la eritropoyetina, el interferón-a y el interferón-b. La región carboxi-terminal muestra una gran divergencia de especies.

60 [0006] Se han descrito las secuencias de ADN y las secuencias peptídicas codificadas para TPO-R humano (también conocido como c-mpl). Ver Vigon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89:5640-5644 (1992). TPO-R es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de hematopoyetina, una familia que se caracteriza por un diseño estructural común del dominio extracelular, incluyendo cuatro residuos C conservados en la porción N-terminal y un motivo WSXWS (SEQ ID NO: 1) cerca de la región transmembrana. Ver Bazan, Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 87:6934-6938 (1990). La evidencia de que este receptor juega un papel funcional en la hematopoyesis incluye las observaciones de que su expresión está restringida al bazo, médula ósea, o hígado fetal en ratones (véase Souyri, et al., Cell 63:1137-1147 (1990)) y a los megacariocitos, plaquetas y células CD34+ en humanos (véase Methia, et al., Blood 82:1395-1401 (1993)). Por otra parte, la exposición de las células CD34+ a

oligonucleótidos sintéticos antisentido para ARN mpl inhibe significativamente la aparición de colonias de megacariocitos sin afectar a la formación de colonias eritroides o mieloides. Algunos trabajadores postulan que las funciones del receptor como homodímero son similares a la situación con los receptores para G-CSF y eritropoyetina.

[0007] La disponibilidad de los genes clonados para TPO-R facilita la búsqueda de agonistas de este receptor importante. La disponibilidad de la proteína del receptor recombinante permite el estudio de la interacción receptor-ligando en una variedad de sistemas de generación de diversidad de péptidos aleatorios y semi-aleatorios. Estos sistemas se describen en las Patentes EE.UU. Nos. 6.251.864, 6.083.913, 6.121.238, 5.932.546, 5.869.451, 5.506.362, y 6.465.430 y en Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87:6378-6382 (1990).

[0008] La lenta recuperación de los niveles de plaquetas en pacientes que sufren de trombocitopenia es un problema grave, y ha hecho urgente la búsqueda de un agonista del factor de crecimiento sanguíneo capaz de acelerar la regeneración de plaquetas. La presente invención proporciona dicho agonista. Case et al, Stem Cells, 2000; 18 (5) :360-5; de Serres et al, Células Madre, 1999: 17 (6) :316-26; de Serres et al, Células Madre, 1999: 17 (4): 203-9; Kaushansky K, Ann NY Acad Sci, 2001 Jun: 938:131-8; Singer et al, Blood, 1998: 92 (10), Supl. 1 parte 1-2, página 568A, y 40ª Reunión Anual de la Sociedad Americana de Hematología, Miami Beach, Florida, EE.UU.: 4 -8 dic. 1998 ISSN: 0.006-4971, Y USA-5 869 451, describen todas ellas un compuesto, denominado GW395058, similar a los compuestos definidos en las reivindicaciones. WO 2004/026332 da a conocer los compuestos definidos en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de trastornos hematológicos. WO 2005/023834 describe los compuestos definidos en las reivindicaciones para aumentar la producción de células madre hematopoyéticas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La presente invención está dirigida a compuestos definidos de bajo peso molecular de péptidos que tienen fuertes propiedades de unión al TPO-R, pueden activar el TPO-R y, potencialmente, permitir la reducción de los efectos secundarios en comparación con los agonistas de TPO conocidos. Por consiguiente, los compuestos peptídicos pueden ser útiles para fines terapéuticos en el tratamiento de condiciones mediadas por la TPO (por ejemplo, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de médula ósea), así como con fines de diagnóstico en el estudio del mecanismo de la hematopoyesis y para la expansión in vitro de megacariocitos y células progenitoras comprometidas. La invención proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1. La invención también proporciona el uso de una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 30.

[0010] Los compuestos peptídicos adecuados para fines terapéuticos y/o de diagnóstico tienen un IC_{50} de aproximadamente 2 mM o menos, determinada por, por ejemplo, el ensayo de afinidad de unión indicado en el Ejemplo 3 de la Patente de EE.UU. N° 5.869.451, En donde un menor IC_{50} se correlaciona con una afinidad de unión más fuerte al TPO-R. El ensayo en la Patente de EE.UU. N° 5.869.451 es el siguiente: Las afinidades de unión de los compuestos peptídicos se miden en un ensayo de unión competitiva. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con 1 mg de estreptavidina, se bloquean con PBS/BSA al 1%, seguido de 50 ng de anticuerpo anti-receptor de inmovilización con biotina (Ab179). Los pocillos se tratan entonces con una dilución 1:10 de cosecha de TPO-R soluble. Varias concentraciones de compuesto peptídico se mezclan con una cantidad constante de una forma truncada de TPO que consiste en los residuos 1-156 fusionadas al terminal-C de la proteína de unión a maltosa (MBP-TPO₁₅₆). Las mezclas del péptido MBP-TPO₁₅₆ se añaden a los pocillos recubiertos con TPO-R, se incuban durante 2 horas a 4 °C y luego se lavan con PBS. La cantidad de MBP-TPO que está enlazado en el equilibrio se mide mediante la adición de un anti-sueros de conejo dirigido contra MBP, seguido de fosfatasa alcalina IgG conjugada de cabra anti-conejo. La cantidad de fosfatasa alcalina en cada pocillo se determina a continuación, utilizando métodos estándar. El ensayo se lleva a cabo en un intervalo de concentraciones de compuestos peptídicos y los resultados se representan gráficamente de tal manera que el eje y representa la cantidad de MBP-TPO unida y el eje x representa la concentración de compuesto peptídico. Se puede entonces determinar la concentración a la que el compuesto péptido reducirá en un 50% (IC_{50}) la cantidad de MBP-TPO unido al TPO-R inmovilizado. La constante de disociación (K_d) para el péptido debe ser similar al IC_{50} medido usando estas condiciones de ensayo. Para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen preferiblemente un IC_{50} de no más de aproximadamente 100 m, más preferiblemente, no más de 500 nM. En una forma de realización preferida, el peso molecular del compuesto de péptido es de aproximadamente 250 a aproximadamente 8.000 daltons. Si el compuesto peptídico de esta invención se oligomeriza, dimeriza y/o derivatiza con un polímero hidrófilo como se describe en este documento, los pesos moleculares de dichos compuestos peptídicos serán sustancialmente mayores y pueden variar desde aproximadamente 500 a aproximadamente 120.000 daltons, más preferible desde aproximadamente 8000 a aproximadamente 80.000 daltons.

[0011] Cuando se utiliza para fines de diagnóstico, los compuestos de péptidos para uso de acuerdo con la presente invención preferiblemente se marcan con un marcador detectable y, en consecuencia, los compuestos peptídicos sin dicho marcador sirven como intermedios en la preparación de compuestos peptídicos marcados.

[0012] Un compuesto péptido que satisface los criterios definidos para el peso molecular y afinidad de unión de TPO-R incluye 9 o más aminoácidos, en el que los aminoácidos se producen de manera natural o sintética.

[0013] En consecuencia, los compuestos peptídicos preferidos incluyen un compuesto que tiene:

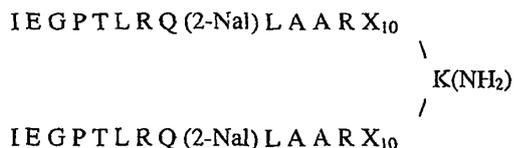
- 5 (1) un peso molecular de menos de aproximadamente 5000 daltons, y
 (2) una afinidad de unión a TPO-R expresada por un IC₅₀ de no más de aproximadamente 100 mM,

10 en el que de cero a todos los enlaces -C(O)NH- compuesto peptídico han sido sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste en un enlace -CH₂OC(O)NR-, un enlace fosfonato; un enlace -CH₂S(O)₂NR-, un enlace -CH₂NR-, y un enlace -C(O)NR⁶-, y un enlace -NHC(O)NH- donde R es hidrógeno o alquilo inferior y R⁶ es alquilo inferior, más cuando el N-terminal de dicho compuesto peptídico se selecciona del grupo que consiste de un grupo -NRR¹-grupo; un grupo -NRC(O)R; un grupo -NRC(O)O; un grupo -NRS(O)₂R; un grupo -NHC(O)NHR, un grupo succinimida; un grupo benciloxicarbonil-NH-, y un grupo benciloxicarbonil-NH - que tiene de 1 a 3 sustituyentes en el anillo de fenilo seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro, y bromo, en donde R y R¹ se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior, y aún más cuando el C-terminal de dicho compuesto péptido tiene la fórmula -C(O)R² donde R² se selecciona entre el grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi inferior, y -NR³R⁴ en el que R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior y donde el átomo de nitrógeno del grupo -NR³R⁴ puede ser opcionalmente el grupo amino del N-terminal del péptido para formar un péptido cíclico, y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

[0014] En este documento se describe también un compuesto péptido marcado que incluye un compuesto peptídico descrito como anteriormente que tiene unido de manera covalente al mismo un marcador capaz de efectuar la detección.

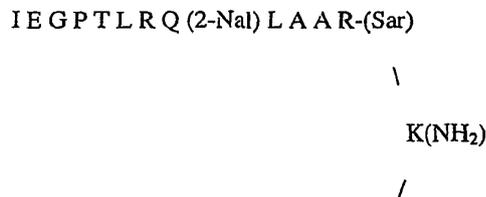
25 **[0015]** La invención se refiere a compuestos peptídicos, incluyendo la secuencia de aminoácidos IEG PTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar) (SEQ ID NO: 7), en las que (2-Nal) es β-(2-naftil)alanina y (Sar) es sarcosina, para su uso según la reivindicación 1.

30 **[0016]** En otra forma de realización, los compuestos peptídicos se dimerizan u oligomerizan para aumentar la afinidad y/o actividad de los compuestos de preferencia. Un ejemplo de un compuesto péptido dimerizado preferido incluye, pero no se limita a, lo siguiente:



35 en el que X₁₀ es una sarcosina (SEQ ID NO: 7). La estructura anterior también se puede representar por la siguiente estructura: (H-IEGPTLRQ (2-Nal)LAARX₁₀)₂K-NH₂.

[0017] Cuando X₁₀ es una sarcosina, el compuesto tiene la siguiente estructura;



40 IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR-(Sar),

en el que (2-Nal) es β-(2-naftil) alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ ID NO: 7). Este compuesto peptídico, que también puede ser representado por la siguiente estructura (H-IEOPTLRQ (2-Nal)LAAR (Sar))₂K-NH₂ al que se hace referencia aquí como "Compuesto TPO N° 1".

45 **[0018]** En otra realización adicional, los compuestos peptídicos preferidos para su uso en esta invención incluyen compuestos peptídicos que se unen de manera covalente a uno o más de varios polímeros hidrófilos. Los polímeros hidrófilos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polialquileteres como por ejemplo polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextrano y derivados de dextrano, etc, como se describe en Patente de EE.UU N°. 5.869.451.

[0019] Los compuestos peptídicos descritos en este documento son útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades mediadas por la TPO, y en particular para el tratamiento de trastornos hematológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de médula ósea. También se describe aquí un método para el tratamiento en el que un paciente que tiene un trastorno que es susceptible al tratamiento con un agonista de TPO recibe, o se le administra, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto peptídico descrito en este documento.

[0020] La especificación también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los compuestos peptídicos descritos en este documento y un vehículo fisiológicamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas, incluyendo formas de dosificación oral, así como polvos y soluciones inhalables, y soluciones inyectables e infusibles.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0021]

La figura 1 muestra y compara la actividad del Compuesto TPO No. 1 a un compuesto peptídico de la técnica anterior (que en todo el presente documento se denomina "compuesto peptídico de la técnica anterior"). La diferencia entre el Compuesto TPO No 1 y el compuesto peptídico de la técnica anterior es que el compuesto de la técnica anterior tiene un péptido β -(1-naftil)alanina (1-Nal) en el que (2-Nal) está en el Compuesto TPO N^o 1.

La figura 2 muestra y compara la actividad del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 con el compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior.

La figura 3 muestra y compara el cambio in vivo en el recuento de plaquetas en ratas que demuestra la potencia relativa del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 con el compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior.

Las figuras 4 y 5 muestran y comparan el número y el volumen de plaquetas circulantes de una manera dependiente de la dosis, respectivamente, en el uso del compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior y el uso del Compuesto TPO Pegilado N^o 1.

La figura 6 muestra que las dosis únicas intravenosas del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 (30, 100 o 300 mg/kg) se traducen en un aumento del recuento de plaquetas periféricas en ratas Wistar macho normales.

La figura 7 muestra el PK, concentración - perfiles de tiempo del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 en voluntarios sanos de sexo masculino: cuadrado lleno - Compuesto TPO Pegilado N^o 1, 0,75 mg/kg iv, rombo abierto - Compuesto TPO Pegilado N^o 1, 1,5 mg/kg iv, triángulo lleno hacia arriba - Compuesto TPO Pegilado N^o 1, 2,25 mg/kg iv, triángulo abierto hacia abajo - Compuesto TPO Pegilado N^o 1, 3 mg / kg iv.

La figura 8 muestra que los recuentos de plaquetas aumentaron la dependencia de la dosis en voluntarios varones sanos después de la administración del Compuesto TPO Pegilado N^o 1

La figura 9 muestra que los niveles endógenos de TPO aumentaron la dependencia de la dosis en voluntarios varones sanos después de la administración del Compuesto TPO Pegilado N^o 1

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

I. Definiciones y parámetros generales

[0022] Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la invención en este documento.

[0023] "Agonista" se refiere a un ligando biológicamente activo que se une a su receptor biológicamente activo complementario y activa este último para causar una respuesta biológica en el receptor o para aumentar la actividad biológica preexistente del receptor.

[0024] "Compuesto péptido" se refiere a una molécula que se hidroliza en aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o sustitutos de aminoácidos.

[0025] "Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a los metales no tóxicos alcalinos, metales alcalinotérreos, y sales de amonio de uso común en la industria farmacéutica incluyendo las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario, amonio, y sales de zinc protamina, que se preparan por métodos bien conocidos en la técnica. El término también incluye sales no tóxicas de adición de ácido, que se preparan generalmente haciendo reaccionar los compuestos de esta invención con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales representativas incluyen las sales de clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, napsilato, y similares.

[0026] "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y que no son biológicamente o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico,

ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Para una descripción de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., supra.

5 **[0027]** "Éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos ésteres que retienen, tras la hidrólisis del enlace éster, la eficacia biológica y las propiedades del ácido carboxílico o alcohol y no son biológicamente o de otra
 10 manera indeseables. Para una descripción de ésteres farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., ed., Design of Prodrugs, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Estos ésteres se forman típicamente a partir del ácido carboxílico correspondiente y un alcohol. Generalmente, la formación del éster se
 15 puede llevar a cabo mediante técnicas sintéticas convencionales. (Véase, por ejemplo, March, Advanced Organic Chemistry, 4^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1992), 393-396 y las referencias allí citadas, y Mark, et al., Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Nueva York (1980).) El componente de alcohol del éster incluirá generalmente (i) un alcohol alifático C₂-C₁₂ que puede o no contener uno o más dobles enlaces y puede o no
 20 contener carbonos ramificados o (ii) un alcohol aromáticos o heteroaromático C₇-C₁₂. Esta invención también contempla el uso de esas composiciones que son ésteres tal como se describe en la presente memoria y al mismo tiempo son las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de las mismas.

[0028] "Amida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas amidas que retienen, tras la hidrólisis del enlace amida, la eficacia biológica y las propiedades del ácido carboxílico o amina y no son biológicamente o de otra
 25 manera indeseables. Para una descripción de amidas farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., ed., Design of Prodrugs, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Estas amidas se forman habitualmente a partir del ácido carboxílico correspondiente y una amina. En general, la formación de amida puede llevarse a cabo a través de técnicas sintéticas convencionales. (Véase, por ejemplo, March, Advanced Organic
 30 Chemistry, 4^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1992), p. 393 y Mark, et al. Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Nueva York (1980).) Esta invención también contempla el uso de esas composiciones que son amidas tal como se describe en este documento y al mismo tiempo son las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de las mismas.

[0029] "Farmacéuticamente o terapéuticamente aceptable" se refiere a un medio vehículo que no interfiere con la
 35 eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no sea tóxico para el huésped o paciente.

[0030] "Estereoisómero" se refiere a un compuesto químico que tiene el mismo peso molecular, composición química, y constitución que otro, pero con los átomos agrupados de modo diferente. Es decir, determinados restos
 40 químicos idénticos están en orientaciones diferentes en el espacio y, por lo tanto, cuando son puros, tienen la capacidad de girar el plano de luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica tan leve que es indetectable con la instrumentación actual. Los compuestos de la invención pueden tener uno o más átomos de carbono asimétricos y por lo tanto incluyen varios estereoisómeros. Todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención.

[0031] "Cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz" como se aplica a las composiciones de la presente
 45 invención se refiere a la cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará habitualmente una disminución en las respuestas inmunológicas y/o inflamatorias a la infección o lesión tisular.

[0032] Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es
 50 Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D ; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R, y Glicina es Gly o G. Además, T-Buo es terc-butiloxi, Bzl es bencilo, CHA es ciclohexilamina , Ac es acetilo, Me es metilo, Pen es penicilamina, Aib es ácido aminoisobutírico, Nva es norvalina, Abu es ácido aminobutírico, Thi es tienilalanina, OBn es O-bencilo, y hyp es hidroxiprolina.

[0033] Los análogos peptídicos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos
 55 con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "peptidomiméticos" o "miméticos peptídicos"(Luthman, et al., Textbook of Drug Design and Development, 14:386-406, 2^a ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:1699-1720 (1994); Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS, pág. 392 (1985); y Evans, et al., J. Med. Chem. 30:1229 (1987)). Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos
 60 terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o mejorado. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como un polipéptido de origen natural de unión al receptor, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace alternativo tal como-CH₂NH-, -CH₂S-, etc. por métodos conocidos en la técnica y que se describen con más detalle en las siguientes referencias: Spatola, A.F. en de Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins B. Weinstein,
 65

eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, AF, Vega Data (marzo de 1983), vol. 1, número 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm. Sci. pp 463-468 (1980), (revisión general); Hudson, et al., Int. J. Pept. Prot. Res., 14:177-185 (1979); Spatola, et al., Life Sci., 38:1243-1249 (1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314 (1982); Almquist, et al., J. Med. Chem., 23:1392-1398, (1980); Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23:2533 (1982); Szelke, et al, European. Appln EP 45665 (1982); Holladay, et al., Tetrahedron Lett., 24:4401-4404 (1983); y Hruby, Life Sci., 31:189-199 (1982). Un enlace no peptídico particularmente preferido es $-CH_2NH-$. Tales miméticos de péptidos pueden tener ventajas significativas sobre realizaciones de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros. El marcado de los peptidomiméticos usualmente involucra la unión covalente de uno o más marcados, directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a la posición que no interfiere en el peptidomimético que se predijo por los datos cuantitativos de estructura-actividad y/o modelación molecular. Tales posiciones no interferentes en general son posiciones que no forman contactos directos con las macromoléculas (por ejemplo, moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas) a la que el mimético peptídico se une para producir el efecto terapéutico. La derivatización (por ejemplo, marcado) de peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético. Generalmente, los peptidomiméticos de péptidos de unión a receptor de se unen al receptor con alta afinidad y poseen una actividad biológica detectable (es decir, son agonistas o antagonistas de uno o más cambios fenotípicos mediados por el receptor).

[0034] La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que incluyen una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica puede generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo, et al., Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992)), Por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos capaces de formar puentes de disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

[0035] "Marcador detectable" se refiere a los materiales, que cuando se unen de manera covalente a los compuestos peptídicos de esta invención, permiten la detección de los compuestos peptídicos en vivo en el paciente al que el compuesto peptídico se ha administrado. Los marcadores detectables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, radioisótopos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína), y similares. El marcador detectable particular empleado no es crítico y se selecciona en relación con la cantidad de marcador que se emplea, así como la toxicidad del marcador en la cantidad de marcador empleada. La selección del marcador en relación a dichos factores está dentro de la experiencia de la técnica.

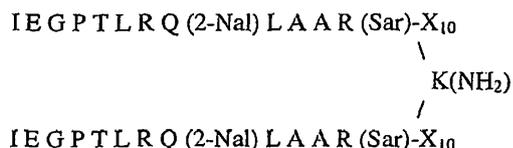
[0036] La unión covalente del marcador detectable en el compuesto del péptido se realiza por métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el radioisótopo I^{125} se emplea como el marcador detectable, la unión covalente de I^{125} al compuesto peptídico se puede lograr mediante la incorporación de la tirosina aminoácido en el compuesto peptídico y la yodación del compuesto peptídico (véase, por ejemplo, Weaner, et al., Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp 137-140 (1994)). La incorporación de tirosina al terminal N o C del compuesto del péptido se puede lograr mediante química bien conocida. Del mismo modo, P^{32} puede incorporarse al compuesto del péptido como un resto fosfato a través de, por ejemplo, un grupo hidroxilo en el compuesto peptídico usando la química convencional.

45 II. Visión de conjunto

[0037] La presente memoria descriptiva proporciona compuestos peptídicos que se unen y activan la TPO-R o de actúan de otro modo como agonistas de TPO. Estos compuestos peptídicos incluyen compuestos de péptidos "guía" y compuestos peptídicos "derivados" construidos de manera que tengan la misma o similar estructura molecular o forma que los compuestos peptídicos guía, pero que difieren de los compuestos peptídicos guía, ya sea con respecto a la susceptibilidad a la hidrólisis o proteólisis y/o con respecto a otras propiedades biológicas, tales como el aumento de la afinidad por parte del receptor. La presente especificación también proporciona composiciones que incluyen una cantidad eficaz de un compuesto peptídico, y más en particular un compuesto peptídico, que es útil para tratar trastornos hematológicos y, especialmente, la trombocitopenia asociada con la quimioterapia, radioterapia, o transfusiones de médula ósea.

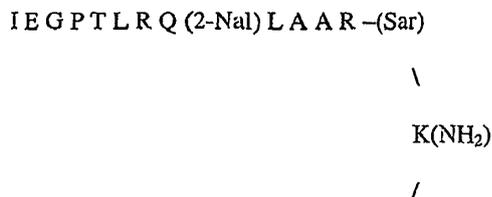
[0038] La invención se refiere a compuestos peptídicos, incluyendo la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7): IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar), para uso de acuerdo con la reivindicación 1.

[0039] En otra forma de realización, los compuestos peptídicos se dimerizan u oligomerizan para aumentar la afinidad y / o actividad de los compuestos de preferencia. Un ejemplo de un compuesto péptido dimerizado preferido incluye, pero no se limita a, lo siguiente:



5 donde X₁₀ es una sarcosina (SEQ ID NO: 7). La estructura anterior también se puede representar por el siguiente: (H-IEGPTLRQ (2-Nal) LAARX₁₀)₂K-NH₂.

Un compuesto peptídico preferido es el siguiente:



10 I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R -(Sar)

en el que (2-Nal) es β-(2-naftil) alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ ID NO: 7). Este compuesto péptido se denomina aquí como "Compuesto TPO N^o1".

15 **[0040]** Los compuestos peptídicos que tienen un IC₅₀ de más de aproximadamente 100 mM carecen de unión suficiente para permitir su uso en cualquiera de los aspectos de diagnóstico o aproximadamente 2 mM o menos y, para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen un IC₅₀ de aproximadamente 100 μM o menos.

20 **[0041]** La figura 1 compara la actividad de tres lotes diferentes del Compuesto TPO N^o 1 con un lote de compuesto péptido de la técnica anterior usando técnicas de ensayo estándar relativas de unidades luminiscentes. El ensayo emplea células murinas modificadas genéticamente para expresar de forma estable el receptor de TPO humano y un constructo informador de luciferasa dirigido por el promotor fos. La diferencia entre el Compuesto TPO N^o 1 y el compuesto peptídico de la técnica anterior es que el compuesto de la técnica anterior tiene un péptido β-(1-naftil) alanina(1-Nal) en el que (2-Nal) es el Compuesto TPO N^o 1. El Compuesto TPO N^o 1 se denomina 2-Nal y el compuesto péptido de la técnica anterior se denomina 1-Nal (técnica anterior) en la figura. 1. Como se muestra en la figura 1, la actividad es similar para cada compuesto.

30 **[0042]** La figura 2 compara la actividad de varios lotes diferentes de Compuesto TPO Pegilado N^o 1 (la pegilación de los compuestos de la presente invención se describe con más detalle a continuación). Ambos lotes del compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior muestran una alta actividad con esencialmente el mismo nivel de actividad que el compuesto peptídico no pegilado de la técnica anterior. Las líneas restantes ilustran la actividad de los diferentes lotes de Compuesto TPO Pegilado N^o1. Como se muestra en la figura 2, en este modelo, este último tiene menos actividad en relación a los compuestos peptídicos pegilados de la técnica anterior, el Compuesto TPO Pegilado N^o1 se denomina PEG-2-Nal y el compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en la figura. 2.

35 **[0043]** La figura 3 muestra la potencia relativa del compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior y del Compuesto TPO Pegilado N^o1. A través de un modelo de rata, la figura 3 muestra el cambio in vivo en los recuentos de plaquetas después de la administración del compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior y del Compuesto TPO Pegilado N^o1. Como se muestra en la figura. 3, la dosis más alta del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 tiene la misma actividad que la dosis más baja del compuesto peptídico Pegilado de la técnica anterior. Un compuesto menos potente puede proporcionar un estímulo menos drástico a la célula diana, lo que podría reducir el riesgo de efectos secundarios causados por la sobreestimulación de la célula diana, tales como trombocitopenia exacerbada tras el subsiguiente ciclo de quimioterapia. El Compuesto TPO Pegilado N^o 1 se conoce como PEG-2-Nal y el compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en la figura. 3.

40 **[0044]** Las Figs. 4 y 5 muestran los resultados de un estudio de ensayo comparativo directo de respuesta de dosis de un compuesto de péptido pegilado de la técnica anterior y del Compuesto TPO Pegilado N^o 1 en ratones normales. El Compuesto TPO Pegilado N^o 1 se conoce como PEG-2-Nal y el compuesto peptídico pegilado de la técnica anterior se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra los aumentos en los niveles de plaquetas y la figura 5 muestra el volumen plaquetario medio seis (6) días después del tratamiento. El intervalo de dosis fue de 10 a 3000ug/kg. Ambos compuestos peptídicos aumentaron el número de plaquetas circulantes en una manera dependiente de la dosis con incrementos relativos al grupo de control observado a dosis tan bajas como 30ug/kg para ambos compuestos. En la respuesta máxima, estos compuestos peptídicos elevaron el

recuento de plaquetas a niveles que eran hasta 4 veces mayores que los valores de control. Las curvas de respuesta a la dosis para estos compuestos peptídicos son muy similares, lo que indica que en este modelo no hubo ninguna diferencia esencial entre los dos artículos de prueba basado en estos criterios de valoración.

5 IV. Preparación de compuestos peptídicos

A. Síntesis en fase sólida

10 [0045] Los compuestos peptídicos se pueden preparar por métodos clásicos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. Los métodos estándar incluyen la síntesis exclusiva en fase sólida, métodos parciales de síntesis en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución, e incluso por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963). En fase sólida, la síntesis se inicia habitualmente desde el extremo C-terminal del péptido utilizando una resina protegida de alfa-amino. Un material de partida adecuado se puede preparar, por ejemplo, uniendo el ácido alfa-amino requerido a una resina clorometilada, una resina de hidroximetilo, o una resina de benzhidrilamina. Una resina clorometilada se vende con el nombre comercial Bio-Beads SX-1 por Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, y la preparación de la resina de hidroximetilo está descrita por Bodonszky, et al., Chem. Ind. (Londres), 38:1597 (1966). La benzhidrilamina (BHA) ha sido descrita por Pietta y Marshall, Chem. Ber. Commn., 650 (1970) y está disponible comercialmente por Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Calif., en forma de hidrocioruro.

20 [0046] Así, los compuestos peptídicos se pueden preparar por acoplamiento de un alfa-aminoácido amino protegido a la resina clorometilada con la ayuda de, por ejemplo, el catalizador de bicarbonato de cesio, según el método descrito por Gisin, Helv. Chim. Acta., 56:1467 (1973). Después del acoplamiento inicial, el grupo protector de alfa-amino se elimina por una elección de reactivos que incluyen ácido trifluoroacético (TFA) o soluciones de ácido clorhídrico (HCl) en disolventes orgánicos a temperatura ambiente.

30 [0047] Los grupos protectores de alfa-aminoácidos son los conocidos por ser útiles en la técnica de síntesis gradual de péptidos. Se incluyen grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos protectores de tipo uretano aromáticos (por ejemplo benziloxicarbonil (Cbz) y Cbz sustituido), grupos protectores de uretano alifáticos (por ejemplo, t-butiloxicarbonilo (Boc), isopropiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, bencilo, trifenilmetilo). Boc y Fmoc son grupos protectores preferidos. El grupo protector de cadena lateral permanece intacto durante el acoplamiento y no se separa durante la desprotección del grupo protector de amino-terminal o durante el acoplamiento. El grupo protector de cadena lateral debe ser extraíble a la finalización de la síntesis del péptido final y bajo condiciones de reacción que no alterarán el péptido diana.

40 [0048] La cadena lateral de los grupos protectores para Tyr incluye tetrahidropirano, terc-butilo, tritilo, bencilo, Cbz, Z-Br-Cbz y 2,5-diclorobencilo. La cadena lateral de los grupos protectores para Asp incluye bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y ciclohexilo. La cadena lateral de los grupos protectores para Thr y Ser incluyen acetilo benzilo, tritilo, tetrahidropirano, bencilo, 2,6-diclorobencilo, y Cbz. El grupo protector de cadena lateral para Thr y Ser es bencilo. El protector de cadena lateral para Arg incluye los grupos nitro, tosilo (Tos), Cbz, adamantiloxicarbonilo mesitoilsulfonil (Mts), o Boc. La cadena lateral de los grupos protectores para Lys incluyen Cbz, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-BrCbz), Tos o Boc.

45 [0049] Después de la eliminación del grupo protector de alfa-amino, los restantes aminoácidos protegidos se acoplan paso a paso en el orden deseado. Un exceso de cada aminoácido protegido se usa generalmente con un activador grupo carboxilo apropiado tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC) en solución, por ejemplo, en mezclas de cloruro de metileno (CH_2Cl_2), dimetil formamida (DMF).

50 [0050] Después de que la secuencia de aminoácidos deseada haya sido completada, el péptido deseado se desacopla del soporte de resina por tratamiento con un reactivo tal como ácido trifluoroacético o fluoruro de hidrógeno (HF), que no sólo escinde el péptido de la resina, sino que también escinde todos los grupos protectores restantes de cadena lateral. Cuando se usa la resina clorometilada, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno resulta en la formación de los ácidos peptídicos libres. Cuando se utiliza la resina de benzhidrilamina, el tratamiento con fluoruro de hidrógeno da como resultado directamente la amida de péptido libre. Alternativamente, cuando se emplea la resina clorometilada, la cadena lateral del péptido protegido se puede desacoplarse por tratamiento de la resina peptídica con amoníaco para dar la cadena lateral de amida protegida deseada o con una alquilamina para dar una alquilamida o dialquilamida de cadena lateral protegida. La protección de cadena lateral se elimina a entonces de manera habitual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para dar las amidas libres, alquilamidias o dialquilamidias.

60 [0051] Estos procedimientos en fase sólida de síntesis de péptidos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (2^a ed., Pierce Chemical Company, 1984).

65

B. Aminoácidos sintéticos

[0052] Estos procedimientos también se pueden utilizar para sintetizar péptidos en los que los aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados genéticamente de origen natural, son sustituidos en una, dos, o más posiciones de cualquiera de los compuestos de la invención.

[0053] Se pueden reemplazar las cadenas laterales naturales de los 20 aminoácidos codificados genéticamente (o D aminoácidos) con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos tales como alquilo, alquilo inferior, cicloalquilos de 4, 5, 6, a 7 miembros, amida, alquilo inferior amida, di(alquilo inferior) amida, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi y los derivados de éster inferior del mismo, y con 4, 5, 6, a 7 miembros heterocíclicos. En particular, se pueden emplear los análogos de prolina en los que el tamaño del anillo del resto de prolina se cambia de 5 miembros a 4, 6, o 7 miembros. Los grupos cíclicos pueden ser saturados o insaturados, y si son insaturados, puede ser aromáticos o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos contienen preferentemente uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de tales grupos incluyen furazanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (por ejemplo morfolino), oxazolilo, piperacínilo (por ejemplo, 1-piperazínilo), piperidilo (por ejemplo, 1-piperidilo, piperidino), piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (por ejemplo 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tiomorfolinilo (por ejemplo tiomorfolino) y triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden ser sustituidos o no sustituidos. Cuando un grupo es sustituido, el sustituyente puede ser alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno o fenilo sustituido o no sustituido.

[0054] También se puede modificar fácilmente los péptidos por la fosforilación (ver, por ejemplo, Bannwarth W., et al., *Biorganic y Medicinal Chemistry Letters*, 6 (17) :2141-2146 (1996)), y otros métodos para preparar derivados de péptidos de los compuestos de la presente invención se describen en Hruby, et al., *Biochem. J.*, 268 (2) :249-262 (1990). Por lo tanto, los compuestos peptídicos de la invención también sirven como base para preparar miméticos de péptidos con actividad biológica similar.

C. Modificaciones de terminales

[0055] Los expertos en la técnica reconocen que varias técnicas están disponibles para la construcción de compuestos de péptidos con la misma o similar actividad biológica deseada que el compuesto péptido correspondiente, pero con una actividad más favorable que el compuesto péptido con respecto a la solubilidad, estabilidad y susceptibilidad a hidrólisis y proteólisis. Véase, por ejemplo, Morgan, et al., *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252 (1989). A continuación se describen métodos para preparar los compuestos de péptidos modificados en el grupo amino N-terminal, el grupo carboxilo C-terminal, y/o cambiando uno o más de los enlaces amido en el péptido a un enlace no amido. Se entiende que dos o más de tales modificaciones pueden acoplarse en una estructura de compuesto peptídico (por ejemplo, la modificación en el grupo carboxilo C-terminal y la inclusión de un grupo-CH₂-Carbamato de vinculación entre dos aminoácidos en el compuesto peptídico).

1. Modificaciones N-terminales

[0056] Los compuestos peptídicos se sintetizan habitualmente como el ácido libre pero, como se señaló anteriormente, se podrían preparar fácilmente como la amida o el éster. También se puede modificar el terminal amino y/o carboxi de los compuestos peptídicos de la invención para producir otros compuestos de la invención. Las modificaciones del terminal amino incluyen metilación, acetilación, adición de un grupo benciloxicarbonilo, o bloqueo del terminal amino con cualquier grupo bloqueante que contiene una funcionalidad carboxilato definida por RCOO -, donde R se selecciona de entre el grupo que consiste en naftilo, acridinilo, esteroídil, y grupos similares. Las modificaciones del terminal carboxi incluyen reemplazar el ácido libre con un grupo carboxamida o formar una lactama cíclica en el terminal carboxi para introducir restricciones estructurales.

[0057] Las modificaciones del terminal amino son las indicadas anteriormente e incluyen alquilación, acetilación, adición de un grupo carbobenzoil, formación de un grupo succinimida, etc (Véase, por ejemplo, Murray, et al., *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5ª ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley y Sons, Inc. (1995).) Específicamente, el grupo amino N-terminal se puede llevar a reacción de la siguiente manera:

(a) para formar un grupo amida de la fórmula RC(O)NH-- en el que R es como se ha definido anteriormente por reacción con un haluro de ácido o anhídrido simétrico. Habitualmente, la reacción puede llevarse a cabo poniendo en contacto cantidades equimolares o en exceso (por ejemplo, aproximadamente 5 equivalentes) de un haluro de ácido con el péptido en un diluyente inerte (por ejemplo, diclorometano) que contiene preferiblemente un exceso (por ejemplo, aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina, para recoger el ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son, por lo demás, convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos). La alquilación del amino terminal para proporcionar una N-sustitución de alquilo inferior, seguida por reacción con un haluro de ácido como se ha descrito anteriormente para proporcionar un grupo amida N-alquilo de la fórmula RC(O)NR -;

(b) para formar un grupo succinimida por reacción con anhídrido succínico. Como antes, una cantidad aproximadamente equimolar o un exceso de anhídrido succínico (por ejemplo, aproximadamente 5 equivalentes) se pueden emplear y el grupo amino se convierte en la succinimida por métodos bien conocidos en la técnica incluyendo el uso de un exceso (por ejemplo, diez equivalentes) de una amina terciaria tal como diisopropiletilamina en un disolvente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano). Véase, por ejemplo, Wollenberg, et al., Patente EE.UU. N° 4.612.132 que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad. Se entiende que el grupo succínico se puede sustituir con, por ejemplo, alquilo o sustituyentes -SR que se preparan de una manera convencional para proporcionar la succinimida sustituida en el N-terminal del péptido. Dichos sustituyentes alquilo se preparan por reacción de una olefina inferior con anhídrido maleico en la forma descrita por Wollenberg, et al, supra y los sustituyentes -SR se preparan por reacción de RSH con anhídrido maleico, donde R es como se ha definido anteriormente;

(c) para formar un grupo benciloxicarbonil-NH-- o benciloxicarbonilo -NH-- sustituido por reacción con aproximadamente una cantidad equivalente o un exceso de CBZ-Cl (es decir, cloruro de benciloxicarbonilo) o un CBZ-Cl sustituido en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) que contiene preferiblemente una amina terciaria para recoger el ácido generado durante la reacción;

(d) para formar un grupo sulfonamida por reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de R-S(O)₂Cl en un diluyente inerte adecuado (diclorometano) para convertir la amina terminal en una sulfonamida en la que R es como se define anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un exceso de amina terciaria (por ejemplo, diez equivalentes) tal como diisopropiletilamina, para eliminar el ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son, por lo demás, convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos);

(e) para formar un grupo carbamato por reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de R-OC(O)Cl o R-OC(O)OC₆H₄-p-NO₂ en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) para convertir la amina terminal en un carbamato, donde R es como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un exceso (por ejemplo, aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina, para depurar cualquier ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son, por lo demás, convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos); y

(f) para formar un grupo urea por reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de RN=C=O en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) para convertir la amina terminal en un grupo urea (es decir, RNHC(O)NH-) donde R es como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un exceso (por ejemplo, aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina. Las condiciones de reacción son, por lo demás, convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos).

2. Modificaciones C-terminales

[0058] En la preparación de compuestos peptídicos en los que el grupo carboxilo C-terminal está sustituido por un éster (es decir, -C(O)OR, donde R es como se ha definido anteriormente), se emplean las resinas utilizadas para preparar los ácidos peptídicos, y la cadena lateral del péptido protegido se escinde con la base y el alcohol apropiado, por ejemplo, metanol. Los grupos protectores de cadena lateral se eliminan a continuación de la forma habitual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para obtener el éster deseado.

[0059] En la preparación de compuestos peptídicos en los que el grupo carboxilo C-terminal se sustituye por la amida -C(O)NR³R⁴, una resina de bencilidrilamina se utiliza como soporte sólido para la síntesis de péptidos. Una vez completada la síntesis, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno para liberar el péptido a partir de los resultados de apoyo directamente en la amida de péptido libre (es decir, el C-terminal es - C (O) NH₂). Alternativamente, el uso de la resina clorometilada durante la síntesis de péptido acoplado con reacción con amoniaco para escindir el péptido protegido de cadena lateral del soporte produce la amida de péptido libre y la reacción con una alquilamina o dialquilamina produce una alquilamida o dialquilamida protegida de cadena lateral (es decir, la C-terminal es - C(O)NRR¹ donde R y R¹ son como se ha definido anteriormente). La protección de la cadena lateral se elimina después en el modo usual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para dar las amidas libres, alquilamidadas, o dialquilamidadas.

[0060] También se puede ciclar los compuestos peptídicos, o incorporar un residuo desamino o descarboxi en el terminal del compuesto péptido, por lo que no existe un grupo amino o carboxilo terminal, para disminuir la susceptibilidad a proteasas o para restringir la conformación del compuesto peptídico. Los grupos funcionales C-terminales de los compuestos peptídicos de la presente invención incluyen amida, amida de alquilo inferior, di(alquilo inferior) amida, alcoxi inferior, hidroxilo, y carboxi, y los derivados de éster inferior de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 **[0061]** En adición a las anteriores modificaciones de N-terminal y C-terminal, los compuestos peptídicos, incluyendo peptidomiméticos, se puede modificar de manera ventajosa con o acoplado covalentemente a una o más de una variedad de polímeros hidrófilos. Se ha descubierto que cuando los compuestos peptídicos son derivatizados con un polímero hidrófilo, su solubilidad y vidas medias de circulación aumentan y su inmunogenicidad se enmascara. Lo anterior se puede lograr con poca, de haber alguna, disminución en su actividad de unión. Los polímeros no proteicos adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polialquileteres como los ejemplificados por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextrano y derivados de dextrano, etc. Generalmente, dichos polímeros hidrófilos tienen un peso molecular medio que varía de aproximadamente 500 a 100.000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000 daltons y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 daltons. En realizaciones preferidas, dichos polímeros hidrófilos tienen un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 daltons, 10.000 daltons y 20.000 daltons.

15 **[0062]** Los compuestos peptídicos de la invención pueden ser derivatizados con o acoplados a dichos polímeros usando cualquiera de los métodos establecidos en Zallipsky, S., *Bioconjugate Chem.*, 6:150-165 (1995); Monfardini, C, et al., *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69 (1995); Patente de EE.UU N° 4.640.835; Patente de EE.UU N° 4.496.689; Patente de EE.UU N° 4.301.144; Patente de EE.UU N°. 4.670.417; Patente de EE.UU N° 4,791,192; Patente de EE.UU N° 4.179.337 o WO 95/34326.

20 **[0063]** En una realización actualmente preferida, los compuestos peptídicos de la presente invención se derivatizan con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal, soluble en agua de las unidades de repetición de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares que típicamente varían de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 40.000 daltons. En una realización actualmente preferida, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5.000 daltons a aproximadamente 20.000 daltons. Los PEG acoplados con los compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser ramificados o no ramificados. (Véase, por ejemplo, Monfardini, C., et al., *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69 (1995)). Los PEG están disponibles comercialmente por Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Alabama) (ahora parte de Nektar Therapeutics (San Carlo, CA), Sigma Chemical Co. y otras compañías. Tales PEG incluyen, pero no se limitan a, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), succinato de monometoxipolietilenglicol (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

35 **[0064]** Brevemente, en una realización, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, está preferiblemente protegido en un extremo por un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. A partir de entonces, el polímero se activa en el otro extremo mediante reacción con un agente de activación adecuado, tales como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro cianúrico, bromuro o fluoruro), diimadazole, un reactivo (por ejemplo anhídrido, un anhídrido dihalosuccínico, tales como anhídrido dibromosuccínico), azida de acilo, p-diazoumbencil éter, 3-(p-diazoniumfenoxi)-2-hidroxipropiléter) y similares. El polímero activado se lleva a reacción entonces con un compuesto peptídico de la presente invención para producir un compuesto peptídico derivatizado con un polímero. Alternativamente, un grupo funcional en los compuestos peptídicos de la invención puede activarse para la reacción con el polímero, o los dos grupos pueden unirse en una reacción de acoplamiento concertado utilizando los métodos conocidos de acoplamiento. Se apreciará fácilmente que los compuestos peptídicos de la invención se pueden derivatizar con PEG utilizando un gran número de otros esquemas de reacción conocidos y utilizados por los expertos en la técnica.

50 **[0065]** Cuando los compuestos peptídicos son derivatizados con un polímero hidrófilo, su solubilidad y vidas medias de circulación se aumentan y su inmunogenicidad se reduce. Lo anterior se puede lograr con poca, de haber alguna, pérdida de la actividad biológica. En realizaciones preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es de 0,1 a 0,01 veces la de los péptidos no modificados. En realizaciones más preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es de 0,1 a 1 veces la de los péptidos no modificados. En realizaciones aún más preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es mayor que la de los péptidos no modificados.

55 **D. Modificaciones Estructurales**

60 **[0066]** Otros métodos para preparar derivados de péptidos de los compuestos descritos en la presente memoria se describen en Hruby, et al., *Biochem J.*, 268 (2) :249-262 (1990). Por lo tanto, los compuestos peptídicos también sirven como modelos estructurales para compuestos no peptídicos con actividad biológica similar. Los expertos en la técnica reconocen que una variedad de técnicas están disponibles para la construcción de compuestos con la misma o similar actividad biológica deseada que el compuesto péptido guía pero con actividad más favorable que el guía con respecto a la solubilidad, la estabilidad, y la susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis. VerMorgan, et al., *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252 (1989). Estas técnicas incluyen reemplazar la cadena principal del péptido con una cadena principal compuesta de fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminas secundarias y ácidos N-metilamino.

65

[0067] Los reactivos adecuados incluyen, por ejemplo, análogos de aminoácidos en el que el grupo carboxilo del aminoácido ha sido reemplazado con un resto adecuado para formar uno de los enlaces anteriores.

5 **[0068]** Del mismo modo, la sustitución de un enlace amido en el péptido con un enlace fosfonato se puede lograr en la forma establecida en la las Patentes de EE.UU nº 5.359.115 y 5.420.328.

E. Formación de Unión de Disulfuro

10 **[0069]** Los compuestos descritos en este documento pueden existir en una forma ciclada con un enlace disulfuro intramolecular entre los grupos tiol de las cisteínas incorporados, si están presentes. Como alternativa, un enlace disulfuro intermolecular entre los grupos tiol de las cisteínas se puede producir para producir un compuesto dimérico (u oligomérico superior). Uno o más de los residuos de cisteína también pueden ser sustituidos por una homocisteína.

15

V. Utilidad

20 **[0070]** Los compuestos peptídicos son útiles in vitro como herramientas únicas para entender la función biológica de la TPO, incluyendo la evaluación de los muchos factores pensados para influir en, y ser influenciados por la producción de TPO y el proceso de unión al receptor. Los compuestos peptídicos presentes también son útiles en el desarrollo de otros compuestos que se unen y activan la TPO-R, debido a que los compuestos peptídicos presentes proporcionan información importante sobre la relación entre estructura y actividad que debe facilitar tal desarrollo.

25 **[0071]** Los compuestos peptídicos son también útiles como ligantes competitivos en ensayos para detectar nuevos agonistas del receptor de TPO. En formas de realización de tales ensayos, los compuestos peptídicos de la invención se pueden utilizar sin modificación o se pueden modificar en una variedad de formas, por ejemplo, por medio del marcado, tal como un resto unido covalentemente o no covalentemente que proporciona directa o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, el mismo material puede marcarse directa o indirectamente. Las posibilidades de marcado directo incluyen grupos de marcado: radiomarcadores como ¹²⁵I, enzimas (Patente de EE.UU Nº 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcados fluorescentes (Patente de EE.UU Nº 3.940.475) capaces de monitorizar el cambio en la intensidad de fluorescencia, desplazamiento de longitud de onda, o polarización de fluorescencia. Las posibilidades para el marcado indirecto incluyen la biotilación de un constituyente seguido de unión a avidina acoplada a uno de los grupos marcadores anteriores. Los compuestos peptídicos pueden incluir también espaciadores o enlazadores en los casos en que los compuestos peptídicos deban unirse a un soporte sólido.

35 **[0072]** Además, basándose en su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser utilizados como reactivos para detectar receptores de TPO en células vivas, células fijas, en fluidos biológicos, en homogenatos de tejido, en forma purificada, materiales biológicos naturales, etc. Por ejemplo, mediante el marcado de dichos compuestos peptídicos, se pueden identificar las células que tienen TPO-R en sus superficies. Además, en base a su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención puede utilizarse en la tinción in situ, FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia), transferencia Western, ELISA, etc. Además, en base a su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención utilizarse en la purificación del receptor, o en la purificación de células que expresan receptores de TPO en la superficie celular (o dentro de células permeabilizadas).

40 **[0073]** Los compuestos peptídicos también se pueden utilizar como reactivos comerciales para la investigación médica y diversos usos de diagnóstico. Tales usos incluyen, pero no están limitados a: (1) uso como un patrón de calibración para cuantificar las actividades de los candidatos agonistas de TPO en una diversidad de ensayos funcionales; (2) el uso para mantener la proliferación y el crecimiento de líneas celulares dependientes de TPO; (3) el uso en el análisis estructural del receptor de TPO a través de la co-cristalización, (4) el uso para investigar el mecanismo de transducción de señal de TPO/activación de receptor, y (5) otras investigaciones y aplicaciones de diagnóstico en las que el receptor de TPO se activa preferiblemente o dicha activación es convenientemente calibrada frente a una cantidad conocida de un agonista de TPO, y similares.

55 **[0074]** Los compuestos peptídicos se pueden utilizar para la expansión in vitro de megacariocitos y sus progenitores comprometidos, tanto en conjunción con citocinas adicionales como por su cuenta. Véase, por ejemplo, DiGiusto, et al., PCT Publication No. 95/05843. Tratamientos de quimioterapia y radiación causan trombocitopenia matando la población más madura de los megacariocitos que se divide rápidamente. Sin embargo, estos tratamientos terapéuticos pueden también reducir el número y la viabilidad de las células precursoras inmaduras de megacariocitos que son menos activas mitóticamente. Por lo tanto, la mejora de la trombocitopenia por TPO o los compuestos de la presente invención puede acelerarse mediante la infusión de quimioterapia o terapia de pacientes después de la radiación con una población de sus propias células enriquecidas en megacariocitos y precursores inmaduros por cultivo in vitro.

65

- 5 **[0075]** Los compuestos peptídicos también se pueden administrar a animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, para activar la TPO-R in vivo. Por lo tanto, en este documento se describen métodos para el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados con la TPO que incluyen la administración de un compuesto peptídico de la invención en cantidades suficientes para imitar el efecto de la TPO sobre la TPO-R in vivo. Por ejemplo, los compuestos peptídicos se pueden administrar para tratar una variedad de trastornos hematológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos de las plaquetas y la trombocitopenia, en particular cuando se asocia con transfusiones de médula ósea, terapia de radiación, y quimioterapia.
- 10 **[0076]** En algunas formas de realización, los antagonistas de TPO se administran preferiblemente primero a los pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia, seguida por la administración de los agonistas de TPO de la invención.
- [0077]** La actividad de los compuestos peptídicos se puede evaluar ya sea in vitro o in vivo en uno de los numerosos modelos descritos en McDonald, Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14:8-21 (1992).
- 15 **[0078]** De acuerdo con una forma de realización, las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención son útiles para tratar la trombocitopenia asociada con transfusiones de médula ósea, terapia de radiación, o quimioterapia. Los compuestos peptídicos habitualmente serán administrados profilácticamente antes de la quimioterapia, radioterapia o trasplante de médula ósea o después de tal exposición.
- 20 **[0079]** Por consiguiente, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen, como ingrediente activo, al menos uno de los compuestos peptídicos de la invención en asociación con un vehículo o diluyente farmacéutico. Los compuestos peptídicos se pueden administrar por vía oral, pulmonar, parental (inyección intramuscular, intravenosa intraperitoneal, (IV) o subcutánea), inhalación (a través de una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal, o sublingual y se pueden formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. Véase, por ejemplo, Bernstein, et al., PCT Patent Publication No. WO 93/25221; Pitt, et al., PCT Patent Publication No. WO 94/17784; y Pitt, et al, Solicitud de Patente Europea. 613.683.
- 25 **[0080]** Las formas sólidas de dosificación para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto péptido activo se mezcla con al menos un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación pueden incluir también, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden incluir agentes tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos entéricos.
- 30 **[0081]** Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones, jarabes, con los elixires que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, y edulcorantes, aromatizantes, así como agentes perfumantes.
- 35 **[0082]** Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Tales formas de dosificación también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes, y agentes dispersantes. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mediante la incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. También se pueden fabricar utilizando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso.
- 40 **[0083]** Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes tales como manteca de cacao o una cera de supositorio. Las composiciones para administración nasal o sublingual también se preparan con excipientes estándar bien conocidos en la técnica.
- 45 **[0084]** Las composiciones que contienen los compuestos peptídicos se pueden administrar para tratamientos profilácticos y / o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad, como se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el peso general y estado del paciente.
- 50 **[0085]** Las composiciones también pueden ser microencapsuladas mediante, por ejemplo, el método de Tice y Bibi (en Treatise on Controlled Drug Delivery, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, Nueva York (1992), pp 315-339).
- 55 **[0086]**
- 60 **[0087]**
- 65 **[0088]**

[0086] En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los compuestos peptídicos de la invención se administran a un paciente susceptible o de otra manera en riesgo de una enfermedad particular. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud y peso del paciente.

[0087] Las cantidades del compuesto de péptido necesaria para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitios diana, el estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, las dosis de tratamiento se deben valorar para optimizar la seguridad y la eficacia. Habitualmente, las dosificaciones usadas in vitro pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para administración in situ de estos reactivos. Las pruebas en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán indicios predictivos de la dosificación humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman, et al. (Eds), Goodman y Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press (1990.); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 7ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985).

[0088] Los compuestos peptídicos son eficaces en el tratamiento de condiciones mediadas por la TPO cuando se administran en un intervalo de dosificación de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día. La dosis específica empleada está regulada por la afección particular a tratar, la vía de administración, así como por el juicio del médico a cargo dependiendo de factores tales como la gravedad de la afección, la edad y el estado general del paciente, y similares.

Ejemplo 1

Síntesis de Compuestos Peptídicos de Fase Sólida

[0089] Los compuestos peptídicos pueden sintetizarse, por ejemplo, utilizando las técnicas de síntesis en fase sólida de Merrifield (véase Steward y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. ed., Pierce Chemical, Rockford, IL (1984) y Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)) o un Applied Biosystems Inc. sintetizador de péptidos Modelo 431A o 433A. Los compuestos peptídicos se pueden ensamblar utilizando protocolos estándar de Applied Biosystems Inc. Synth Assist™ 1.0.0 o Synth Assist™ 2.0.2. Cada acoplamiento se puede realizar durante 2x30 min. con HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol).

[0090] La resina utilizada puede ser resina HMP (p-hidroximetil fenoximetil) resina de poliestireno o PAL (Milligen/Biosearch), que es una resina de poliestireno reticulado con 5-(4'-Fmoc-aminometil-3,5'-dimetioxi)fenoxi)ácido valérico como enlazador. La utilización de la resina PAL resulta en una funcionalidad amida terminal de carboxilo tras la escisión del péptido de la resina. Tras la escisión, la resina HMP produce un resto de ácido carboxílico en el extremo C-terminal del producto final. La mayoría de los reactivos, resinas y aminoácidos protegidos (libres o en la resina) se pueden comprar a través de Millipore o Applied Biosystems Inc.

[0091] El grupo Fmoc se puede utilizar para la protección del amino durante el procedimiento de acoplamiento. La protección de la amina primaria en los aminoácidos se puede lograr con Fmoc y los grupos de protección de cadena lateral tales como t-butilo para la serina, tirosina, ácido glutámico, y treonina; tritilo para la glutamina; Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo) para la arginina; Nt-butiloxicarbonilo para el triptófano, N-tritilo para histidina y S-tritilo para la cisteína pueden ser empleados.

[0092] La eliminación de los compuestos peptídicos de la resina y la simultánea desprotección de las funciones de cadena lateral se puede lograr por tratamiento con reactivo K o leves modificaciones del mismo. Alternativamente, en la síntesis de los péptidos, con un terminal carboxilo amidado, el péptido totalmente ensamblado se puede escindir con una mezcla de 90% de ácido trifluoroacético, 5% de etanoditil y 5% de agua, inicialmente a 4 °C, y aumentando gradualmente a temperatura ambiente. Los compuestos péptidos desprotegidos se puede precipitar con éter dietílico. La purificación puede ser por cromatografía líquida preparativa, de fase inversa, de alto rendimiento en una columna C₁₈ de gel de sílice unida con un gradiente de acetonitrilo/agua en ácido trifluoroacético al 0,1%. Los compuestos peptídicos homogéneos pueden caracterizarse por espectrometría de masas o espectrometría de masas por electrospray por bombardeo de átomos rápidos y análisis de aminoácidos cuando sea aplicable.

[0093] En una realización preferida, los compuestos peptídicos se dimerizan utilizando procedimientos sintéticos estándar conocidos y utilizados por los expertos en la técnica. Siguiendo estos esquemas de síntesis, los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente compuestos de péptidos diméricos de acuerdo con la presente invención. Además, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que las subunidades diméricas se pueden enlazar fácilmente utilizando metodologías conocidas y enlazadores.

Ejemplo 2**La pegilación de los compuestos peptídicos**

5 **[0094]** La pegilación de un compuesto peptídico puede llevarse a cabo por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un compuesto peptídico de la invención se pueden disolver en 100 mM pH de bicina 8,0 a una concentración de 10 mg/ml, añadido a un exceso 1,25 veces molar de PEG2 pulverizado (comercialmente disponible por Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Alabama, ahora Nektar Therapeutics (San Carlos, CA)) y se agita a temperatura ambiente hasta que la reacción se completa, habitualmente de 1 a 2 horas. La reacción se controla por HPLC de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo 40-65% con una columna YMC ODS AQ. Cuando la reacción se completa, la solución se añade a un segundo exceso molar 1,25 de PEG2 pulverizado y el proceso se repite 4 veces utilizando un total de 5 moles de PEG2 para cada mol de polipéptido. La solución se diluye 2 veces con PBS para reducir la viscosidad y se carga en una columna Superdex 200 (Pharmacia), equilibrada previamente y se eluye con PBS. Las fracciones de la columna de exclusión por tamaño se pueden analizar por HPLC de fase inversa. Las fracciones que contienen di-PEG-polipéptido que eluye antes de cualquier compuesto peptídico mono-PEG pueden ser combinadas y almacenadas a 5 °C o liofilizadas.

Ejemplo 3**Estudios preclínicos en animales sobre la actividad trombopoyética del Compuesto TPO Pegilado N° 1**

20 **[0095]** El Compuesto TPO N° 1 no comparte ninguna homología de secuencia con la TPO endógena, mitigando el riesgo de la formación de anticuerpos de reacción cruzada con la TPO endógena. El compuesto TPO n° 1 fue pegilado para reducir la depuración y para reducir aún más la antigenicidad. Este ejemplo describe estudios preclínicos sobre la actividad trombopoyética del compuesto TPO pegilado N°1 en un animal.

25 **[0096]** Las ratas Wistar macho normales (fuente) se utilizaron para los estudios. Otros animales, tales como perros, ratones, monos, etc también se puede utilizar para los estudios pre-clínicos. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en una instalación para animales plenamente acreditada por la Asociación Americana de Evaluación y Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC) y de conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH).

30 **[0097]** Las ratas Wistar macho normales (10 semanas de edad, 230-367 gramos de intervalo de peso corporal en la dosificación) fueron tratadas con dosis únicas intravenosas de Compuesto TPO N°1 a 30, 100 o 300 ug/kg (40 ratas / grupo). Antes de la dosis, 96, 144, 192, 240, 288 y 312 horas después de la dosis, de aproximadamente 0,5 ml de sangre se recogieron por punción de la vena yugular de ratas sin anestesiarse (5 ratas por punto de tiempo, con EDTA como anticoagulante) y los recuentos de plaquetas fueron evaluados usando un sistema de análisis de hematología automatizado. Los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche, con agua disponible, antes de cada toma de muestras.

35 **[0098]** Las dosis intravenosas de Compuesto TPO Pegilado N°1 (30, 100 o 300 mg/kg) produjo un aumento en el conteo de plaquetas periféricas normales en ratas Wistar macho por día de la evaluación después de la dosis en el día 4 (Fig. 6). El recuento de plaquetas se evaluó cada 2 días durante 2 semanas de seguimiento y comparación con el recuento antes de la dosis. La dosis de 300 µg/kg indujo un mayor aumento en el recuento de plaquetas, que volvió a los valores basales en el día 14.

Ejemplo 4**Fase I de estudios clínicos sobre la actividad trombopoyético del compuesto TPO pegilado No. 1**

50 **[0099]** La fase I de los estudios se realizó para investigar la tolerabilidad, la farmacodinámica y la farmacocinética del Compuesto TPO Pegilado N° 1. Este ejemplo describe estudios de Fase I sobre el Compuesto TPO Pegilado N° 1 después de una única inyección intravenosa en voluntarios masculinos sanos. Estudios de fase I en el Compuesto TPO Pegilado N° 1 y otros compuestos de acuerdo con la invención después de la inyección intravenosa múltiple u otros medios de administración y/o a un paciente en necesidad de un tratamiento se pueden realizar utilizando protocolos conocidos por un experto en la técnica.

55 **[0100]** Cuarenta voluntarios fueron aleatorizados para recibir Compuesto TPO Pegilado N° 1 o placebo como una sola inyección en bolo iv en una proporción de 6:2. Ocho sujetos fueron aleatorizados en proporción 06:02 para recibir una inyección única de Compuesto TPO Pegilado N° 1o placebo, con un intervalo de dosis de 0,375, 0,75, 1,5, 2,25 o 3 mg/kg. La respuesta farmacodinámica de Compuesto TPO Pegilado N° 1 se midió por el aumento en el número de plaquetas. Los niveles de Compuesto TPO Pegilado N° 1 se determinaron en plasma pobre en plaquetas usando un ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada y validada. Los niveles de TPO, EPO, IL-6 y IL-11 endógenos se midieron a los puntos de tiempo indicados usando inmunoensayos convencionales. Un inmunoensayo biosensor (BiaCore technology) se utilizó para medir la formación de anticuerpos contra el resto peptídico de

Compuesto TPO Pegilado N° 1. El efecto sobre la función plaquetaria se midió mediante el control de colágeno inducido por la agregación de plaquetas en 4 horas y 12 días después de la administración del Compuesto TPO Pegilado N° 1.

5 **[0101]** El análisis PK indicó dosis una cinética relacionada con la dosis de Compuesto TPO Pegilado N° 1, aunque a dosis de 0,75 µg/kg o inferiores, las concentraciones plasmáticas de Compuesto TPO Pegilado N° 1 estaban por debajo del límite de cuantificación de 6,25 ng/ml (Fig. 7). Cuatro sujetos en el grupo de dosis de 0,375 µg/kg y un sujeto en el grupo de dosis 3,0 µg/kg de Compuesto TPO Pegilado N° 1 no tenían niveles plasmáticos cuantificables. La media de valores C_{max} osciló entre 10,9 ng/ml a 0,75 mg/kg de Compuesto TPO Pegilado N° 1 a 61,7 ng/ml a 3,0 µg/kg de Compuesto TPO Pegilado N° 1 (Tabla 1). No se pudieron medir datos PK a 0.375 µg/kg iv de compuesto TPO n° 1. El terminal de vida media de Compuesto TPO Pegilado N° 1 varió de aproximadamente 18 a 36 horas. La media de T_{max} osciló entre 0,09 y 2 horas. El aumento en C_{max} con aumento de la dosis fue aproximadamente proporcional a la dosis, pero no hubo un aumento aparente del valor normalizado de AUC₀₋₂₄ con el aumento de la dosis, lo que sugiere un aumento proporcional más alto que la dosis.

15

Tabla 1. Resumen del análisis PK

	Cmax (ng/ml)	t _{1/2} (H)	AUC _∞ (ng.h / mL)	AUC ₀₋₂₄ (ng.h / mL)
Dosis 0,75 µg/kg				
N	6	1	0	0
Media	10.9	NQ	NQ	NQ
Min-Max	BLQ-18.8	18.6	NQ	NQ
Dosis 1,5 µg/kg				
N	6	2	1	4
Media	20.9	NQ	NQ	311
Min-Max	7,53-28,5	13,1-22,5	475	268-359
Dosis 2.25 µg / kg				
N	6	2	3	4
Media	39.7	NQ	1561	678
Min-Max	13.1-59.1	29.8-48.5	1551-1569	655-694
3,0 µg/kg dosis, excluyendo sujeto 1027 que no tenía concentraciones de cuantificación				
N	6	4	3	5
Media	61.7	36,1	2257	965
Min-Max	53.9-76.0	27,7-51,3	1773-2764	823-1124

20 **[0102]** La respuesta de las plaquetas a la administración de Compuesto TPO Pegilado N° 1, fue similar a los resultados publicados para rhTPO y AMG531. Los recuentos de plaquetas aumentaron la dependencia de la dosis alcanzando niveles máximos en el día 10-12, y los recuentos volvieron a los valores basales a las 3-4 semanas (Fig. 8). La media de plaquetas máximas osciló entre 315 x10⁹/L a 0,375 µg/kg iv a 685 x 10⁹/L a 3 µg/kg iv, y la media máxima de los recuentos de plaquetas aumentó desde el valor inicial que fue de 1,4-veces a 0,375 µg/kg a 3,2 veces a 3,0 µg/kg (Tabla 2). Al menos un 50% de aumento en las plaquetas se observó en 4 de 6 pacientes que recibieron el Compuesto TPO Pegilado N° 1 a una dosis de 0,75 µg/kg, mientras que se observó al menos un aumento de 2 veces el recuento de plaquetas en aproximadamente 3 de 6 sujetos en una dosis de 1,5 µg/kg, etc. La dosis de 0,75 µg/kg iv ha sido elegida como la dosis inicial para la fase II del estudio clínico.

25

30 **[0103]** Aparte de los cambios en los recuentos de plaquetas, otras células sanguíneas circulantes maduras no se vieron afectadas (datos no mostrados). Además, la administración de Compuesto TPO Pegilado N° 1 no afectó a la función plaquetaria, ni en el momento de la administración, ni a los 12 días después de la dosis, en el momento de la aparición de plaquetas recientemente producidas.

Tabla 2. Resumen de los análisis de recuento de plaquetas

Compuesto TPO Pegilado N° 1	0 (µg / kg)	0,375 (µg / kg)	0,75 (µg / kg)	1,5 (µg / kg)	2,25 (µg / kg)	3,0 (µg / kg)
N	10	6	6	6	6	6
n (> 1,5 x)	0	3	3	4	4	5
n (> 2x)	0	0	1	3	4	5
n (> 3 x)	0	0	0	0	0	4
n (> 4x)	0	0	0	0	0	1
Plt ₀ (10 ⁹ / L) ¹⁾	192/203 (163-233)	223/205 (159-304)	212/212 (155-264)	228/230 (200-258)	215/203 (193-261)	208/200 (150-284)
Plt _{max} (10 ⁹ / L) ¹⁾	230/225 (189-271)	31.5/309 (214-482)	347/335 (232-495)	430/458 (238-597)	454/500 (254-576)	685/750 (188-979)
Plt _{max} / Plt ₀ ¹⁾	1.14/1.13 (1.04-1.38)	1.42/1.42 (1.08-1.81)	1.63/1.63 (1.15-2.12)	1.91/2.13 (1.01-2.59)	2.15/2.33 (1.28-2.98)	3.21/3.50 (1.25-4.52)

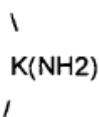
5 **[0104]** Se evaluó el efecto del Compuesto TPO Pegilado N° 1 en la administración de factores de crecimiento que se sabe que poseen actividad trombopoyética. Los Niveles de TPO endógena dependiente de la dosis se incrementaron, alcanzando niveles máximos a los 3 días después de la dosis (Fig. 9). No se observaron cambios significativos en los niveles en sangre de IL-6, IL-11 y niveles de EPO.

10 **[0105]** La función plaquetaria, evaluada como la agregación plaquetaria inducida por colágeno en sangre entera, no cambió entre los tratamientos. Ninguno de los sujetos experimentó un acontecimiento adverso grave o toxicidades limitantes de la dosis. Las reacciones adversas observadas con mayor frecuencia incluyen dolor de cabeza y fatiga leve y ocurrieron tanto después del tratamiento activo como del placebo. No se detectaron anticuerpos contra el Compuesto TPO Pegilado N° 1. Estos resultados indican que el Compuesto TPO Pegilado N° 1 se toleró bien en el rango de dosis probado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto péptido que incluye la secuencia siguiente: (H-IEGPTLRQ (2-Nal) LAARX10)-K (NH₂) - (X10RAAL (2-Nal) QRLTPGEI)-H, (SEQ ID NO: 7) en el que X₁₀ es sarcosina para su uso en el tratamiento de trastornos hematológicos en seres humanos, en el que dicho compuesto peptídico ha de ser administrado en un rango de dosis de entre 0,1 y 0,75 µg/kg.
2. El compuesto que ha de usarse de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el trastorno hematológico es un trastorno de plaquetas o trombocitopenia.
- 10 3. El compuesto que ha de usarse según la reivindicación 1 en la que el trastorno hematológico está asociado con transfusiones de médula ósea, terapia de radiación, y quimioterapia.
- 15 4. El compuesto que ha de usarse según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto peptídico ha de ser administrado en un intervalo de dosis de 0,375-0,75 µg/kg.
- 20 5. El compuesto que ha de usarse según la reivindicación 1, en la que la administración de dichos compuestos peptídicos resulta en un valor medio de C_{máx} de alrededor de 10 ng/mL hasta aproximadamente 0,75 µg/kg de compuesto peptídico.
- 25 6. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que la administración de dichos compuestos peptídicos resulta en un terminal de vida media de dicho compuesto péptido de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 36 horas.
- 30 7. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que la administración de dichos compuestos peptídicos resulta en una media de t_{max} de aproximadamente 0,09 horas a aproximadamente 2 horas.
- 35 8. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que la administración de dichos compuestos peptídicos resulta en un incremento de alrededor de un 50% en el recuento de plaquetas para una dosis de aproximadamente 0,75 µg/kg.
- 40 9. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que la administración de dichos compuestos peptídicos resulta en un aumento en los niveles de TPO endógena.
- 45 10. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto peptídico se une de manera covalente a un polímero hidrófilo.
- 50 11. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 10, en la que dicho polímero hidrófilo tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 500 a cerca de 40.000 daltons.
- 55 12. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 11, en la que dicho polímero hidrófilo tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 5.000 a cerca de 20.000 daltons.
- 60 13. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 10, en la que dicho polímero hidrófilo se selecciona de entre el grupo compuesto por polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.
14. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 13, en la que dicho polímero hidrófilo es polietilenglicol.
15. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto peptídico se dimeriza.
16. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 15, en la que cada una de las subunidades diméricas de dicho compuesto peptídico se une de manera covalente a un polímero hidrófilo.
17. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 16 en la que dicho polímero hidrófilo es polietilenglicol.
18. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 17, en la que el polietilenglicol se selecciona del grupo formado por monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS) , monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), glicol-tresilato monometoxipolietilenglicol (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).
19. El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto peptídico tiene la siguiente fórmula:

I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R-(Sar)



I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R-(Sar)

en la que (2-Nal) es [beta] - (2-naftil) alanina y (Sar) es sarcosina.

- 5 **20.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 19, en la que dicho compuesto peptídico se une de manera covalente a un polímero hidrofílico.
- 21.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 20, en la que dicho polímero hidrofílico se selecciona de entre el grupo formado por polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.
- 10 **22.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 21, en la que dicho polímero hidrofílico es polietilenglicol.
- 23.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 22, en la que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 5.000 a cerca de 20.000 daltons.
- 15 **24.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 22, en la que el polietilenglicol se selecciona del grupo formado por monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS) , monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol – tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).
- 20 **25.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 20, en la que cada una de las subunidades diméricas de dicho compuesto peptídico se une de manera covalente a un polímero hidrofílico.
- 25 **26.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 25, en la que dicho polímero hidrofílico se selecciona de entre el grupo compuesto por polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.
- 27.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 26, en la que dicho polímero hidrofílico es polietilenglicol.
- 30 **28.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 27, en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 5.000 a cerca de 20.000 daltons.
- 35 **29.** El compuesto que ha de ser usado según la reivindicación 27, en el que el polietilenglicol se selecciona del grupo formado por monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS) , monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).
- 40 **30.** El uso de una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto peptídico que comprende la secuencia siguiente: (H-IEGPTLRQ (2-Nal) LAARX₁₀)-K (NH₂) - (X₁₀RAAL (2-NAL) QRLTPGEI)-H, (SEC ID NO: 7), en el que X₁₀ es sarcosina en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que sufre de un trastorno hematológico en el que dicho compuesto peptídico ha de administrarse en un rango de dosis de entre 0,1 y 0,75 µg/kg.

FIG. 1

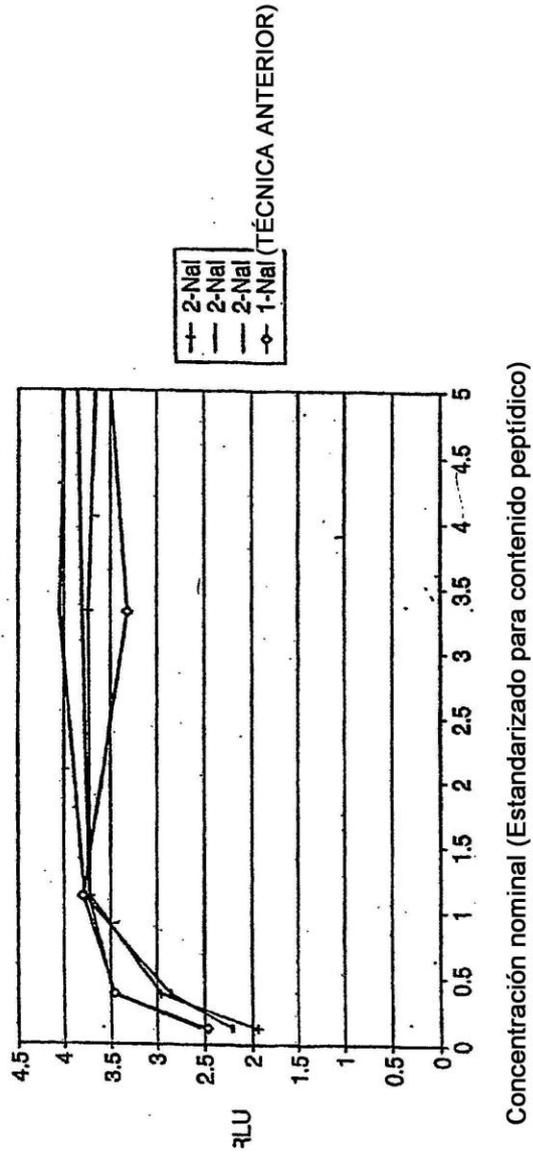


FIG. 2

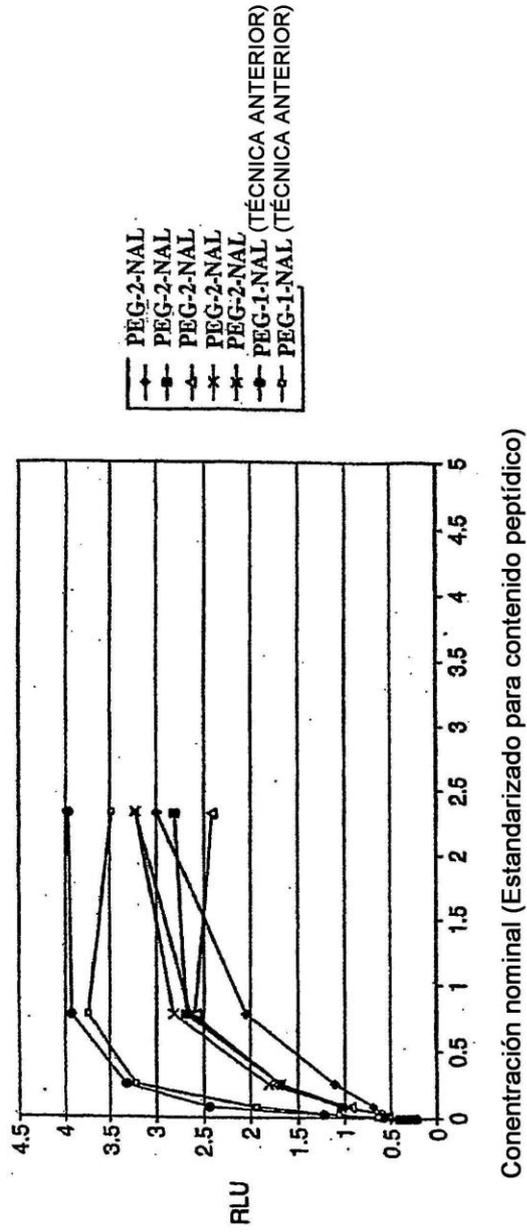


FIG. 3

Resumen de plaquetas

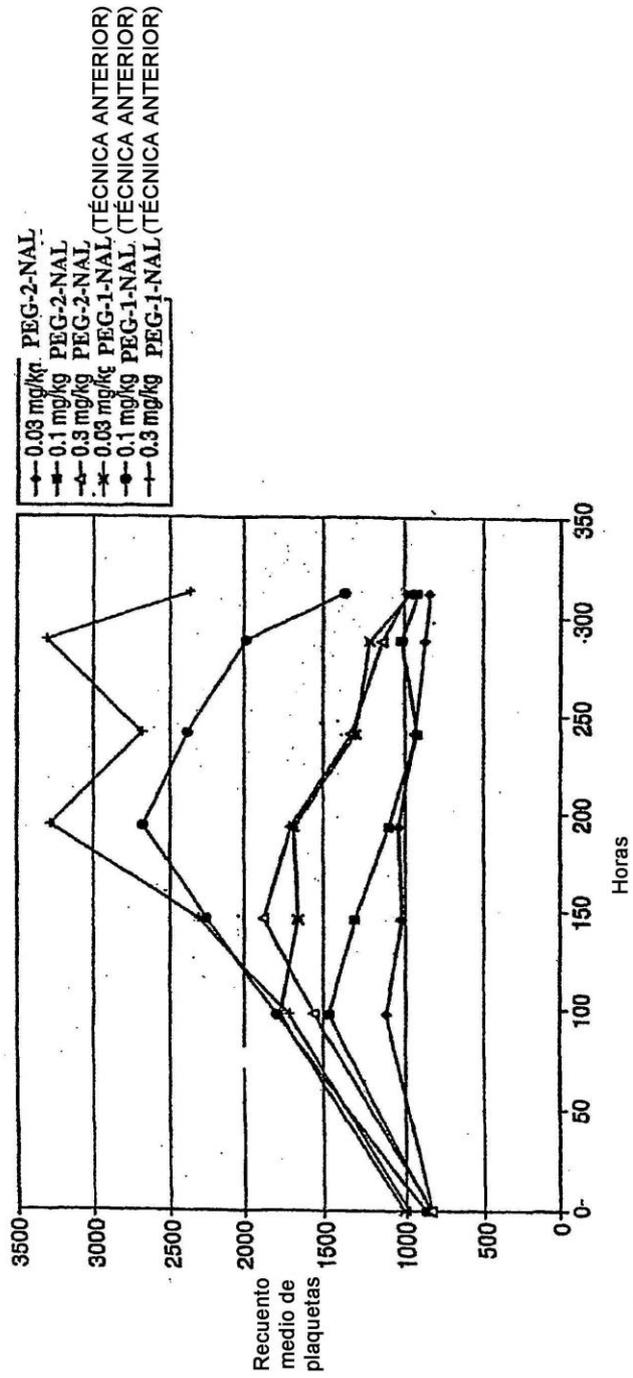


FIG. 4

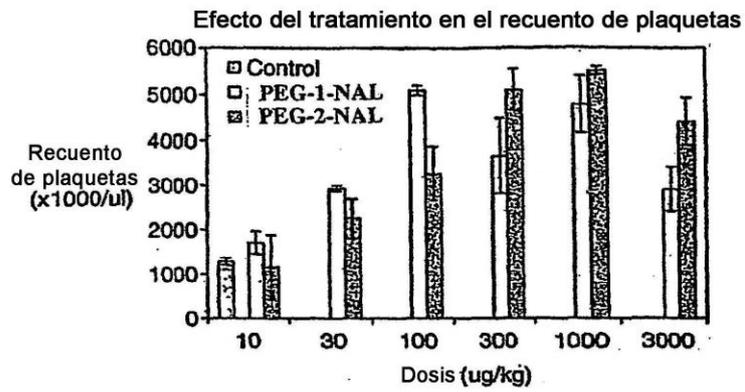


FIG. 5

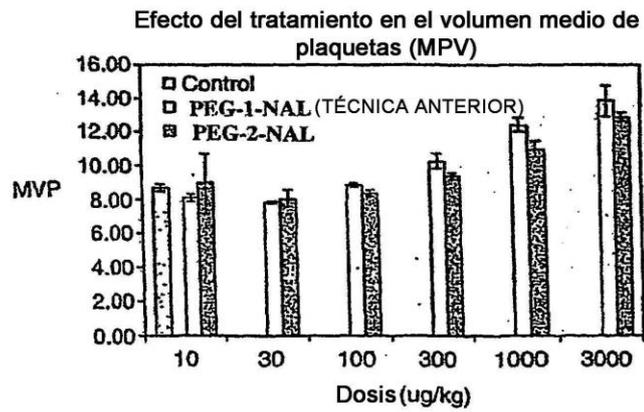


FIG. 6

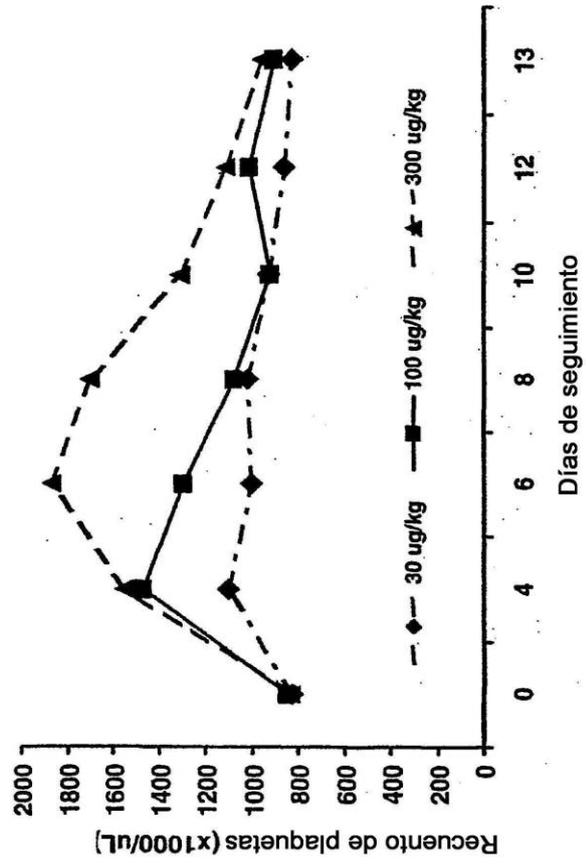


FIG. 7

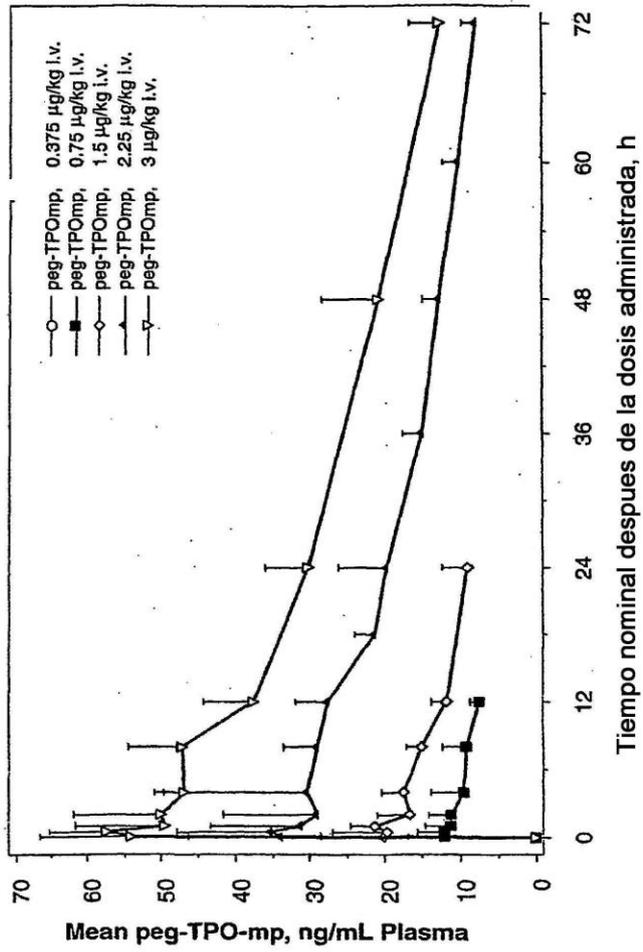


FIG. 8

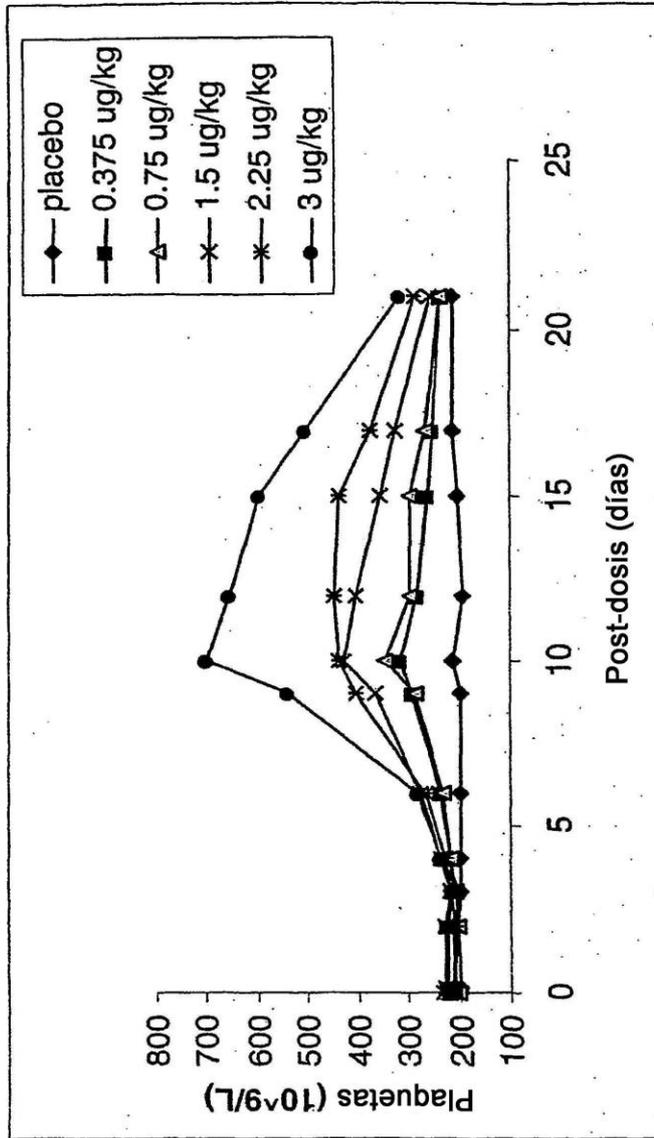


FIG. 9

