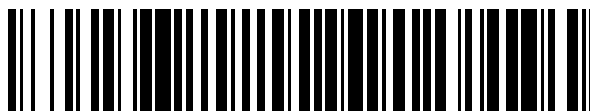


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 231**

51 Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.1999 E 10011689 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2319928**

54 Título: **Péptidos miméticos de trombopoyetina diméricos que se unen al receptor MP1 y que tienen actividad trombopoyética**

30 Prioridad:

23.10.1998 US 105348 P

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

09.09.2013

73 Titular/es:

**KIRIN-AMGEN, INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks CA 91320, US**

72 Inventor/es:

**LIU, CHUAN-FA;
FEIGE, ULRICH y
CHEETHAM, JANET**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 422 231 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos miméticos de trombopoyetina diméricos que se unen al receptor MP1 y que tienen actividad trombopoyética.

Campo del invento

- 5 En general, el invento se refiere al campo de compuestos, especialmente péptidos y polipéptidos, que tienen actividad trombopoyética. Los compuestos del invento pueden ser utilizados para aumentar la producción de plaquetas o precursores de plaquetas (por ejemplo, megacariocitos) en un mamífero.

Antecedentes del invento

- 10 Este invento se refiere a compuestos, especialmente péptidos, que tienen la capacidad de estimular *in vitro* e *in vivo* la producción de plaquetas y sus células precursoras, tales como megacariocitos. Antes de discutir la naturaleza de los compuestos del invento, se proporciona lo siguiente como un antecedente relativo a dos proteínas que tienen actividad trombopoyética: la trombopoyetina (TPO) y el factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF; del inglés, megakaryocyte growth and development factor).

- 15 La clonación de trombopoyetina (TPO) endógena [Lok et al., *Nature* 369: 568-571 (1.994); Bartley et al., *Cell* 77: 1.117-1.124 (1.994); Kuter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11.104-11.108 (1.994); de Sauvage et al., *Nature* 369: 533-538 (1.994); Kato et al., *Journal of Biochemistry* 119: 229-236 (1.995); Chang et al., *Journal of Biological Chemistry* 270: 511-514 (1.995)] ha aumentado rápidamente nuestros conocimientos sobre la megacariopoyesis (producción de megacariocitos) y la trombopoyesis (producción de plaquetas).

- 20 La TPO humana endógena, una proteína glicosilada de 60 a 70 kDa y producida esencialmente en el hígado y el riñón, consiste en 332 aminoácidos [Bartley et al., *Cell* 77: 1.117-1.124 (1.994); Chang et al., *Journal of Biological Chemistry* 270: 511-514 (1.995)]. La proteína está muy conservada entre diferentes especies y presenta un 23 % de homología con la eritropoyetina humana [Gurney et al., *Blood* 85: 981-988 (1.995)] en el extremo amínico (aminoácidos 1 a 172) [Bartley et al., *Cell* 77: 1.117-1.124 (1.994)]. Se ha mostrado que la TPO endógena posee todas las características del regulador biológico esencial de la trombopoyesis. Sus acciones *in vitro* incluyen la inducción específica de colonias de megacariocitos a partir tanto de células madre hematopoyéticas murinas purificadas [Zeigler et al., *Blood* 84: 4.045-4.052 (1.994)] como de células CD34⁺ humanas [Lok et al., *Nature* 369: 568-571 (1.994); Rasko et al., *Stem Cells* 15: 33-42 (1.997)], la generación de megacariocitos con ploidia aumentada [Broudy et al., *Blood* 85: 402-413 (1.995)], y la inducción de la maduración terminal de megacariocitos y de la producción de plaquetas [Zeigler et al., *Blood* 84: 4.045-4.052 (1.994); Choi et al., *Blood* 85: 402-413 (1.995)]. Por el contrario, oligodesoxinucleótidos antisentido sintéticos hacia el receptor de TPO (c-Mpl) inhiben significativamente la capacidad formadora de colonias de los progenitores megacariocíticos [Methia et al., *Blood* 82: 1.395-1.401 (1.993)]. Además, ratones inoperantes (knock-out) para c-Mpl son intensamente trombocitopénicos y presentan deficiencia de megacariocitos [Alexander et al., *Blood* 87: 2.162-2.170 (1.996)].

- 35 El MGDF humano recombinante (rHuMGDF; Amgen Inc., Thousand Oaks, California, EE.UU.) es otro polipéptido trombopoyético relacionado con la TPO. Se produce usando *E. coli* transformada con un plásmido que contiene cDNA que codifica una proteína truncada que abarca el dominio amino-terminal ligante del receptor, de la TPO humana [Ulich et al., *Blood* 86: 971-976 (1.995)]. El polipéptido es extraído, vuelto a plegar y purificado, y un grupo polietilenglicol (PEG) es fijado covalentemente al extremo amínico. A la molécula resultante se hace aquí referencia como PEG-rHuMGDF, o MGDF para abreviar.

- 40 Mediante diversos estudios en que se usaban modelos animales [T. R. Ulich et al., *Blood* 86: 971-976 (1.995); M. M. Hokom et al., *Blood* 86: 4.486-4.492 (1.995)] se han demostrado claramente las eficacias terapéuticas de TPO y MGDF en el trasplante de médula ósea y en el tratamiento de la trombocitopenia, un estado que resulta a menudo de una quimioterapia o una terapia por radiación. Datos preliminares sobre seres humanos han confirmado la utilidad del MGDF para elevar las cuentas de plaquetas en diversos ámbitos [Basser et al., *Lancet* 348: 1.279-81 (1.996); Kato et al., *Journal of Biochemistry* 119: 229-236 (1.995); Ulich et al., *Blood* 86: 971-976 (1.995)]. El MGDF podría ser utilizado para potenciar el proceso de donación de plaquetas, ya que la administración de MGDF aumenta aproximadamente por tres las cuentas de plaquetas circulantes con respecto al valor original en los donantes de plaquetas sanos.

- 50 La TPO y el MGDF ejercen su acción por medio de la unión al receptor c-Mpl, que se expresa principalmente en la superficie de ciertas células hematopoyéticas, tales como megacariocitos, plaquetas, células CD34⁺ y células progenitoras primitivas [N. Debili et al., *Blood* 85: 391-401 (1.995); F. J. de Sauvage et al., *Nature* 369: 533-538 (1.994); T. D. Bartley et al., *Cell* 77: 1.117-1.124 (1.994); S. Lok et al., *Nature* 369: 565-8 (1.994)]. Como la mayoría de los receptores para interleucinas y hormonas proteicas, c-Mpl pertenece a la superfamilia de receptores citocínicos de clase I [I. Vigon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5.640-5.644 (1.992)]. La activación de esta clase de receptores implica la homodimerización de receptores inducida por la unión del ligando, la cual, a su vez, desencadena la cascada de procesos de transducción de señales.

- 55 En general, la interacción de un ligando proteico con su receptor tiene a menudo lugar en una interfase

relativamente grande. Sin embargo, como se demostró en el caso de la hormona de crecimiento humana unida a su receptor, sólo unos pocos restos clave de la interfase contribuyen realmente a la mayor parte de la energía de unión [T. Clackson et al., Science 267: 383-386 (1.995)]. Esto y el hecho de que la mayor parte del ligando proteico restante sólo sirve para presentar los epítomos ligantes en la topología correcta hacen posible encontrar ligandos activos de tamaño mucho más pequeño.

En un esfuerzo hacia este fin, ha surgido el sistema de presentación de bancos peptídicos en fagos como una potente técnica para identificar pequeños compuestos peptídicos miméticos de ligandos proteicos grandes [J. K. Scott et al., Science 249: 386 (1.990); J. J. Devlin et al., Science 249: 404 (1.990)]. Usando esta técnica, se descubrieron pequeñas moléculas peptídicas que actúan como agonistas del receptor c-Mpl [S. E. Cwirla et al., Science 276: 1.696-1.699 (1.997)].

En dicho estudio, pequeñas secuencias peptídicas aleatorias presentadas como fusiones con las proteínas de la cubierta de un fago filamentosos eran eluidas por afinidad del dominio extracelular de c-Mpl inmovilizado con anticuerpo, y los fagos retenidos resultaban enriquecidos durante un segundo ciclo de purificación por afinidad. Este proceso de selección de unión y repropagación fue repetido muchas veces para enriquecer la colección de compuestos ligantes más fuertes. Como resultado, se identificaron primero dos familias de péptidos ligantes de c-Mpl, no relacionadas entre sí en cuanto a sus secuencias. Luego se crearon bancos por mutagénesis para optimizar más los mejores compuestos ligantes, lo que finalmente condujo al aislamiento de un péptido muy activo con una $IC_{50} = 2$ nM y una $EC_{50} = 400$ nM [S. E. Cwirla et al., Science 276: 1.696-1.699 (1.997)]. Este péptido de 14 restos, designado como un péptido mimético de TPO (TMP; del inglés, TPO mimetic pepptide), no tiene una evidente homología de secuencia con respecto a TPO ni a MGDF. La estructura de este compuesto TMP es la siguiente:

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala ID. SEC. nº 1

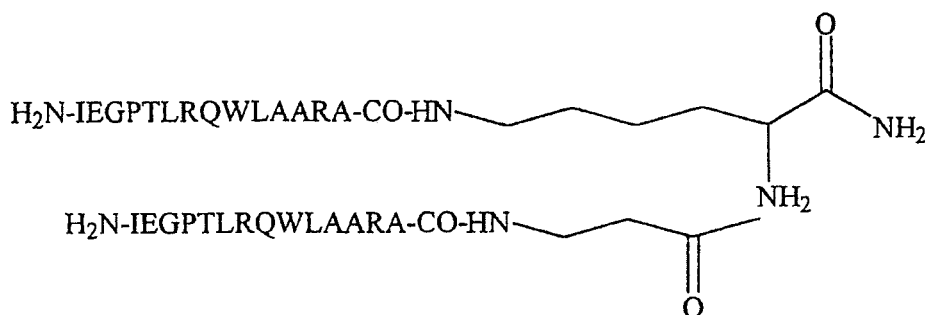
o

IEGPTLRQWLAARA

usando abreviaturas de aminoácidos de una sola letra.

Previamente, en un estudio similar sobre péptidos miméticos de EPO, se descubrió un péptido mimético de EPO (EMP; del inglés, EPO mimetic pepptide) usando la misma técnica [N. C. Wrighton et al., Science 273: 458-463 (1.996)] y se halló que actuaba como un dímero al unirse al receptor de EPO (EPOR). El complejo (ligando)₂/(receptor)₂ así formado tenía una simetría C2 de acuerdo con los datos cristalográficos por rayos X [O. Livnah et al., Science 273: 464-471 (1.996)]. Basándose en esta información estructural, se diseñó un dímero covalentemente unido de EMP en el que los extremos C de dos monómeros de EMP estaban entrecruzados con un espaciador flexible y se halló que tenía una capacidad ligante muy potenciada así como bioactividad *in vitro/in vivo* [N. C. Wrighton et al., Nature Biotechnology 15: 1.261-1.265 (1.997)].

Una similar estrategia de dimerización C-terminal fue aplicada al péptido mimético de TPO (TMP) [S. E. Cwirla et al., Science 276: 1.696-1.699 (1.997)]. Se halló que un dímero C-terminalmente enlazado (enlace C-C) de TMP tenía una afinidad ligante mejorada de 0,5 nM y una actividad *in vitro* notablemente aumentada ($EC_{50} = 0,1$ nM) en ensayos de proliferación celular [S. E. Cwirla et al., Science 276: 1.696-1.699 (1.997)]. A continuación se muestra la estructura de este dímero C-C de TMP:



(ID. SEC. nº 2)

En otro aspecto del presente invento, los dímeros en tándem pueden ser además fijados a uno o más grupos que proceden de proteínas inmunoglobulínicas, a los que se hace generalmente referencia como región Fc de dichas inmunoglobulinas. A los compuestos resultantes se hace referencia como fusiones de Fc y dímeros de TMP en tándem.

Lo siguiente es una breve sección básica relativa a las regiones Fc de anticuerpos, que son útiles con respecto a algunos de los compuestos presentes.

Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une al antígeno, y un dominio constante, conocido como "Fc", que proporciona el enlace a funciones efectoras tales como la fijación del complemento y la fagocitosis. La porción Fc de una inmunoglobulina tiene una semivida plasmática duradera, mientras que la Fab es de corta duración [Capon et al., Nature 337: 525-531 (1.989)].

- 5 Se han construido productos proteicos terapéuticos usando el dominio Fc para intentar proporcionar una mayor semivida o para incorporar funciones tales como la unión al receptor de Fc, la unión a proteína A, la fijación del complemento y la transferencia placentaria, todas las cuales residen en la región Fc de las inmunoglobulinas [Capon et al., Nature 337: 525-531 (1.989)]. Por ejemplo, se ha fusionado la región Fc de un anticuerpo IgG1 con CD30-L, una molécula que se une a receptores de CD30 expresados en células tumorales de la enfermedad de Hodgkin, células de linfoma anaplásico, células de leucemia de células T y otros tipos de células malignas; véase la Patente de EE.UU. nº 5.480.981. Se ha fusionado IL-10, un agente antiinflamatorio y antirrechazos, con Fc γ 2a murino con objeto de aumentar la corta semivida circulante de las citocinas [X. Zheng et al., The Journal of Immunology 154: 5.590-5.600 (1.995)]. Ciertos estudios han permitido también evaluar el uso del receptor del factor de necrosis tumoral, unido con la proteína Fc de IgG1 humana, para tratar pacientes con shock séptico [C. Fisher et al., N. Engl. J. Med. 334: 1.697-1.702 (1.996); K. Van Zee et al., The Journal of Immunology 156: 2.221-2.230 (1.996)]. Se ha fusionado también Fc con el receptor CD4 para producir una proteína terapéutica para el tratamiento del sida; véase Capon et al., Nature 337: 525-531 (1.989). Además, se ha fusionado la interleucina 2 con la porción Fc de IgG1 o IgG3 para superar la corta semivida de la interleucina 2 y su toxicidad sistémica; véase Harvill et al., Immunotechnology 1: 95-105 (1.995).
- 10
- 15
- 20 A pesar de la disponibilidad de TPO y MGDF, queda la necesidad de obtener compuestos adicionales que tengan la actividad biológica de estimular la producción de plaquetas (actividad trombopoyética) y/o de células precursoras de plaquetas, especialmente megacariocitos (actividad megacariopoyética). El presente invento proporciona nuevos compuestos que tienen dicha(s) actividad(es), y aspectos relacionados.

Sumario del invento

- 25 El presente invento proporciona un grupo de compuestos que son capaces de unirse a, y desencadenar, una señal transmembranal a través de, es decir, activando, el receptor c-Mpl, que es el mismo receptor que media en la actividad de la trombopoyetina (TPO) endógena. De esta forma, los compuestos del invento tienen actividad trombopoyética, es decir, la capacidad para estimular *in vivo* e *in vitro* la producción de plaquetas, y/o actividad megacariocitopoyética, es decir, la capacidad para estimular *in vivo* e *in vitro* la producción de precursores de plaquetas.
- 30

En una primera realización preferida, los compuestos de la invención comprenden la siguiente estructura general:

$$\text{TMP}_1-(\text{L}_1)_n-\text{TMP}_2$$

donde TMP_1 y TMP_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo de compuestos que comprende la estructura nuclear:

- 35 $\text{X}_2-\text{X}_3-\text{X}_4-\text{X}_5-\text{X}_6-\text{X}_7-\text{X}_8-\text{X}_9-\text{X}_{10}$,

donde,

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly and Ala;

X_4 es Pro;

- 40 X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr and Ser;

X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;

X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg and Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr y Phe;

- 45 X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

L_1 es un conector como se describe en la presente memoria; y

n es 0 ó 1;

y sales fisiológicamente aceptable de los mismos

En una realización, L_1 comprende $(\text{Gly})_n$, donde n es 1 a 20, y cuando n es mayor que 1, hasta la mitad de los residuos de Gly se pueden sustituir por otro aminoácido seleccionado de los restantes 19 aminoácidos naturales o un esteroisómero de los mismos.

5 Además de la estructura nuclear X_2 - X_{10} indicada anteriormente para TMP_1 y TMP_2 , también son posibles otras estructuras relacionadas donde uno o más de los siguientes se añade a la estructura nuclear de TMP_1 y/o TMP_2 : X_1 se une al extremo N y/o X_{11} , X_{12} , X_{13} , y/o X_{14} están unidos al extremo C, donde X_1 , X_{12} , X_{13} , y X_{14} son como sigue:

X_1 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser, y Arg;

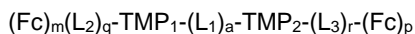
X_{11} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, y Glu;

X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser, y Gln;

10 X_{13} se selecciona del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, y Gly; y

X_{14} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu, y Gly.

En una segunda realización preferida, los compuestos de la invención tienen la fórmula general:



15 donde TMP_1 , TMP_2 y n son cada uno como se ha descrito anteriormente; L_1 , L_2 y L_3 son grupos conectores que se selecciona cada uno independientemente de los grupos conectores descritos en esta memoria; Fc es una región Fc de una inmunoglobulina (como se define en esta memoria más adelante); m , p , q y r se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en 0 y 1, donde al menos uno de m o p es 1, y además donde si m es 0 entonces q es 0, y si p es 0, entonces r es 0; y sales fisiológicamente aceptables de los mismos. En una realización, L_1 , L_2 , y L_3 comprenden independientemente $(\text{Gly})_n$ donde n es 1 a 20, y cuando n es mayor que 1, hasta la mitad de los residuos de Gly se pueden sustituir por otro aminoácido seleccionado de los restantes 19 aminoácidos naturales o un esteroisómero de los mismos.

20

Este invento abarca también derivados de los compuestos anteriores (descritos más adelante) son también abarcados por.

25 Los compuestos de este invento son preferiblemente péptidos, y pueden ser preparados mediante métodos sintéticos estándares o cualesquier otros métodos para preparar péptidos. Los compuestos de este invento que abarcan porciones no peptídicas pueden ser sintetizados mediante reacciones de química orgánica estándares además de mediante reacciones de química peptídica estándares, cuando son aplicables.

30 Los compuestos de este invento pueden ser usados con fines terapéuticos o profilácticos al incorporarles materiales vehiculares farmacéuticos apropiados y administrarles a un sujeto, tal como un ser humano (u otro mamífero), en una cantidad eficaz. También se incluyen otros aspectos relacionados en el presente invento.

Breve descripción de las figuras

Otros numerosos aspectos y ventajas del presente invento serán, por lo tanto, evidentes tras la consideración de la siguiente descripción detallada del mismo, haciéndose referencia a los dibujos siguientes:

35 La Figura 1 muestra secuencias polinucleotídicas y proteicas ejemplares de Fc (la ID. SEC. nº 3 es la cadena de codificación que se lee $5' \rightarrow 3'$; la ID. SEC. nº 4 es la cadena complementaria que se lee $3' \rightarrow 5'$; y la ID. SEC. nº 5 es la secuencia de aminoácidos codificada) de IgG1 humana, que pueden ser usadas en los compuestos de fusión de Fc de este invento.

La Figura 2 muestra un esquema sintético para la preparación del péptido pegilado 19 (unido a PEG) (ID. SEC. nº 17).

40 La Figura 3 muestra un esquema sintético para la preparación del péptido pegilado 20 (ID. SEC. nº 18).

La Figura 4 muestra el número de plaquetas generadas *in vivo* en hembras normales de ratón BDF1 tratadas con una inyección de diversos compuestos en un bolo de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, del modo siguiente; PEG-MGDF significa PEG, con un peso molecular medio de 20 kDa, unido al grupo amínico N-terminal por aminación reductora de los aminoácidos 1-163 de TPO humana nativa, que se expresa en *E. coli* (por lo que no está glicosilada) (véase el Documento WO 95/26746, titulado "Compositions and Methods for Stimulating Megakaryocyte Growth and Differentiation"); TMP significa el compuesto de la ID. SEC. nº 1; TMP-TMP significa el compuesto de la ID. SEC. nº 21; PEG-TMP-TMP significa el compuesto de la ID. SEC. nº 18, en el que el grupo PEG es un PEG de 5 kDa de peso molecular medio, unido como se muestra en la Figura 3; TMP-TMP-Fc se define más adelante, y Fc-TMP-TMP es lo mismo que TMP-TMP-Fc salvo porque el grupo Fc está unido al extremo N-terminal en vez de al extremo C-terminal del péptido TMP-TMP.

50

La Figura 5 muestra el número de plaquetas generadas *in vivo* en ratones BDF1 normales tratados con diversos compuestos administrados durante un periodo de 7 días por medio de bombas osmóticas implantadas. Los compuestos se definen de una manera igual a la anteriormente expuesta para la Figura 4.

- 5 Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran diagramas esquemáticos de compuestos preferidos del presente invento. La Figura 6A muestra un compuesto de fusión de Fc en que el grupo Fc está fusionado con el extremo N del dímero de TMP y en que la porción Fc es una forma monómera (cadena sencilla). La Figura 6B muestra un compuesto de fusión de Fc en que la región Fc está fusionada con el extremo N del dímero de TMP y en que la porción Fc es dímera y un monómero de Fc está unido a un dímero de TMP. La Figura 6C muestra un compuesto de fusión de Fc en que el grupo Fc está fusionado con el extremo N del dímero de TMP y en que la porción Fc es dímera y cada monómero de Fc está unido a un dímero de TMP.

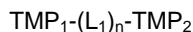
Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 15 En un esfuerzo para buscar estructuras pequeñas como compuestos conductores en el desarrollo de agentes terapéuticos con propiedades más deseables, se diseñaron un tipo diferente de dímero de TMP y estructuras relacionadas en que el extremo C de un péptido TMP estaba unido al extremo N de un segundo péptido TMP, directamente o por medio de un conector, y luego se investigaron los efectos de esta estrategia de dimerización sobre la bioactividad de las moléculas dímeras resultantes. En algunos casos, estos llamados dímeros en tándem (enlace C-N) fueron diseñados para que tuvieran conectores entre los dos monómeros, conectores que estaban preferiblemente compuestos de aminoácidos naturales por lo que su síntesis resultaba accesible a las tecnologías recombinantes.

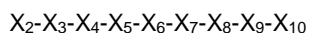
- 20 El presente invento se basa en el descubrimiento de un grupo de compuestos que tienen actividad trombopoyética y de los que se piensa que ejercen su actividad al unirse al receptor de TPO endógeno, c-Mpl.

Compuestos y derivados

En una primera realización preferida, los compuestos del invento comprenden la estructura general siguiente:



- 25 en la que cada uno de TMP_1 y TMP_2 es independientemente seleccionado del grupo de compuestos que comprenden la estructura nuclear:



en la que

X_2 es seleccionado del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys y Val;

- 30 X_3 es seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

X_5 es seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ser;

X_6 es seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala y Phe;

X_7 es seleccionado del grupo que consiste en Arg y Lys;

- 35 X_8 es seleccionado del grupo que consiste en Gln, Asn y Glu;

X_9 es seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala y Phe; y

X_{10} es seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met y Lys;

L_1 es un conector como el aquí descrito; y

n es 0 ó 1;

- 40 y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

En una realización, L_1 comprende $(\text{Gly})_n$ en que n es de 1 a 20, y, cuando n es superior a 1, hasta la mitad de los restos de Gly pueden ser sustituidos por otro aminoácido seleccionado entre los 19 aminoácidos naturales restantes o por un estereoisómero del mismo.

- 45 Además de la estructura nuclear X_2-X_{10} anteriormente expuesta para TMP_1 y TMP_2 , son también posibles otras estructuras relacionadas en que se añade a la estructura nuclear de TMP_1 y/o TMP_2 uno o más de los puntos siguientes: X_1 está unido al extremo N y/o X_{11} , X_{12} , X_{13} y/o X_{14} están unidos al extremo C, en que X_1 , X_{11} , X_{12} , X_{13} y

X_{14} son del modo siguiente:

X_1 es seleccionado del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser y Arg;

X_{11} es seleccionado del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His y Glu;

X_{12} es seleccionado del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser y Gln;

5 X_{13} es seleccionado del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln y Gly; y

X_{14} es seleccionado del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu y Gly.

El término "TMP" se utiliza para significar un grupo compuesto de, es decir, que comprende, al menos 9 subunidades (X_2 - X_{10}), en que X_2 - X_{10} comprenden la estructura nuclear. Las subunidades X_2 - X_{14} son preferiblemente aminoácidos independientemente seleccionados de entre los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza; sin embargo, el invento abarca compuestos en que X_2 - X_{14} son independientemente seleccionados del grupo de aminoácidos atípicos no presentes en la naturaleza, bien conocidos en la técnica. Se identifican aminoácidos específicos preferidos para cada posición. Por ejemplo, X_2 puede ser Glu, Asp, Lys o Val. Para los aminoácidos se usan aquí tanto las abreviaturas de tres letras como las de una sola letra; en cada caso, las abreviaturas son las estándares usadas para los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza o para variaciones bien conocidas de los mismos. Estos aminoácidos pueden tener estereoquímica L o D (salvo Gly, que no es L ni D), y los TMPs pueden comprender una combinación de estereoquímicas. Sin embargo, se prefiere la estereoquímica L para todos los aminoácidos de la cadena del TMP. El invento también proporciona moléculas de TMP inversas en que está invertida la secuencia amino-terminal a carboxilo-terminal de los aminoácidos. Por ejemplo, la molécula inversa de una molécula que tiene la secuencia normal X_1 - X_2 - X_3 sería X_3 - X_2 - X_1 . El invento también proporciona moléculas de TMP retroinversas en que, como en un TMP inverso, está invertida la secuencia amino-terminal a carboxilo-terminal de los aminoácidos y los restos que son normalmente enantiómeros "L" en el TMP están alterados a la forma estereoisómera "D".

Además, también se abarcan sales fisiológicamente aceptables de los TMPs. "Sales fisiológicamente aceptables" significa sales de las que se sabe o se descubre más tarde que son farmacéuticamente aceptables. Son algunos ejemplos específicos preferidos: acetato, trifluoroacetato, hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, citrato, tartrato, glicolato y oxalato.

También se contempla que los TMPs anteriormente descritos puedan ser sustituidos por "derivados" de los TMPs. Dichos TMPs derivados incluyen grupos en que se han hecho una o más de las modificaciones siguientes:

30 una o más de las uniones (enlaces) peptídicas [-C(O)NR-] han sido sustituidas por una unión no peptídica tal como una unión -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-]; una unión fosfonato; una unión -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-]; una unión urea [-NHC(O)NH-]; una unión -CH₂-amina secundaria; o una unión peptídica alquilada [-C(O)NR⁶- en que R⁶ es alquilo inferior];

35 péptidos en que el extremo N está derivatizado hasta un grupo -NRR¹; un grupo -NRC(O)R; un grupo -NRC(O)OR; un grupo -NRS(O)₂R; un grupo -NHC(O)NHR, en los que R y R¹ son hidrógeno o alquilo inferior con la condición de que ambos, R y R¹, no sean hidrógeno; un grupo succinimida; un grupo benciloxicarbonil-NH- (CBZ-NH-); o un grupo benciloxicarbonil-NH- que tiene en el anillo fenílico de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxilo inferior, cloro y bromo; y

40 péptidos en que el extremo C libre está derivatizado hasta -C(O)R², en el que R² es seleccionado del grupo que consiste en alcoxilo inferior y -NR³R⁴ en que R³ y R⁴ son independientemente seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior. Por "inferior" se quiere significar un grupo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

45 Además, se pueden introducir modificaciones de aminoácidos individuales en la molécula de TMP al hacer reaccionar restos de aminoácido específicos del péptido con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o restos terminales seleccionados. Lo siguiente es ejemplar: se pueden hacer reaccionar restos de lisinilo y amino-terminales con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tal como picolinimidato de metilo; piridoxal-fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

50 Los restos de arginilo pueden ser modificados por reacción con uno o varios reactivos convencionales; entre estos: fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina requiere que la reacción sea llevada a cabo en condiciones alcalinas a causa del elevado pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo guanidino de la arginina.

Se ha estudiado ampliamente la modificación específica de restos de tirosilo *per se*, poniéndose un interés particular

en la introducción de marcadores espectrales en restos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o con tetranitrometano. Muy comúnmente, se pueden usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar, respectivamente, especies de O-acetil-tirosilo y derivados 3-nitrados.

5 Los grupos carboxilo laterales (aspartilo y glutamilo) pueden ser selectivamente modificados por reacción con carbodiimidias ($R'-N=C=N-R'$) tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil)carbodiimida y 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos de aspartilo y glutamilo pueden ser convertidos en restos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

10 Los restos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados hasta los correspondientes restos de glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos restos pueden ser desamidados bajo condiciones ligeramente ácidas. Toda forma de estos restos cae dentro del alcance de este invento.

15 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para entrecruzar los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros soportes macromoleculares. Los agentes entrecruzantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como el 3-[(p-azidofenil)ditio]propionimidato de metilo producen compuestos intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, para la inmovilización de proteínas se pueden emplear matrices reactivas e insolubles en agua, tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno, y los sustratos reactivos descritos en las Patentes de EE.UU. números 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440.

20 Otras posibles modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, la oxidación del átomo de azufre de Cys, la metilación de los grupos alfa-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, EE.UU., páginas 79-86 (1.983)], la acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, la amidación de los grupos carboxilo C-terminales.

25 Dichos grupos derivatizados mejoran preferiblemente una o más características, incluyendo la actividad trombotopoyética, la solubilidad, la absorción, la semivida biológica y similares, de los compuestos del invento. Alternativamente, los grupos derivatizados dan lugar a compuestos que tienen las mismas, o esencialmente las mismas, características y/o propiedades del compuesto que no está derivatizado. Los grupos pueden eliminar o atenuar alternativamente cualquier efecto secundario indeseable de los compuestos y similares.

30 Además de la estructura nuclear anteriormente expuesta, X_2 - X_{10} , otras estructuras que son específicamente consideradas son aquéllas en que uno o más grupos X adicionales están unidos a la estructura nuclear. De esta manera, pueden unirse X_1 y/o X_{11} , X_{12} , X_{13} y X_{14} a la estructura nuclear. Las estructuras siguientes son algunas estructuras adicionales ejemplares:

35 X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} ;
 X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} ;
 X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} ;
 X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} ;
 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} ;
40 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} ;
 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} ;
 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} ;
 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} ;

45 en las que X_1 a X_{14} son como se describieron anteriormente. Cada uno de TMP_1 y TMP_2 puede ser igual o diferente en cuanto a secuencia y/o longitud. En algunas realizaciones preferidas, TMP_1 y TMP_2 son iguales.

Un TMP particularmente preferido es el siguiente:

Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala (ID. SEC. nº 1)

50 Como se usa aquí, "que comprende" significa, *inter alia*, que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales en cualquiera de los extremos N y C de la secuencia dada o en ambos. Sin embargo, con tal que esté presente una estructura tal como X_2 a X_{10} , X_1 a X_{14} , o una de las otras estructuras ejemplares, la estructura química restante es

relativamente menos importante. Por supuesto, cualquier estructura fuera de la estructura nuclear X_2 a X_{10} o la estructura X_1 a X_{14} no debería interferir significativamente en la actividad trombopoyética del compuesto. Por ejemplo, un resto Met N-terminal es considerado como parte de este invento. Además, aunque muchos de los compuestos preferidos del invento son dímeros en tándem ya que poseen dos grupos TMP, otros compuestos de este invento son multímeros en tándem de los TMPs, es decir, compuestos con las estructuras ejemplares siguientes:

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃;

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄;

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄-L-TMP₅;

10 en que TMP₁, TMP₂, TMP₃, TMP₄ y TMP₅ pueden tener estructuras iguales o diferentes y en que cada TMP y cada L se definen como aquí se expusieron y cada conector es opcional. Preferiblemente, los compuestos de este invento tendrán 2-5 grupos TMP, particularmente preferiblemente 2-3, y muy preferiblemente 2. Los compuestos de la primera realización de este invento tendrán preferiblemente menos de aproximadamente 60, más preferiblemente menos de aproximadamente 40, aminoácidos en total (es decir, serán péptidos).

15 Como se indicó anteriormente, los compuestos de la primera realización de este invento son preferiblemente dímeros de TMP que están directamente enlazados o están unidos por un grupo conector. Los grupos TMP monómeros se muestran en la orientación convencional de extremo N a extremo C, leyéndose de izquierda a derecha. En consecuencia, puede verse que todos los compuestos del invento están orientados de modo que el extremo C de TMP₁ está unido, directamente o por medio de un conector, al extremo N de TMP₂. A esta orientación se hace referencia como "orientación en tándem", y a los compuestos del invento se puede hacer generalmente referencia como "dímeros en tándem". A estos compuestos se hace referencia como dímeros aun cuando TMP₁ y TMP₂ sean estructuralmente distintos. Es decir, se consideran tanto homodímeros como heterodímeros.

25 El grupo "conector" ("L₁") es opcional. Cuando está presente, no es crítico cuál sea su estructura química ya que sirve esencialmente como espaciador. El conector debería ser elegido de modo que no interfiriera en la actividad biológica del compuesto final y, además, para que la inmunogenicidad del compuesto final no resultase significativamente aumentada. El conector está preferiblemente compuesto de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. De este modo, en realizaciones preferidas, el conector comprende Y_n en que Y es un aminoácido presente en la naturaleza o un estereoisómero del mismo y "n" es cualquiera de 1 a 20. Por lo tanto, el conector está compuesto de 1 a 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, aminoácidos que son seleccionados entre los 20 aminoácidos presentes en la naturaleza. En una realización más preferida, los 1 a 20 aminoácidos son seleccionados entre Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys y Lys. Aún más preferiblemente, el conector está compuesto de una mayoría de aminoácidos que no están estéricamente impedidos, tales como Gly, Gly-Gly [(Gly)₂], Gly-Gly-Gly [(Gly)₃]... (Gly)₂₀, Ala, Gly-Ala, Ala-Gly, Ala-Ala, etc. Otros ejemplos específicos de conectores son:

(Gly)₃Lys(Gly)₄ (ID. SEC. nº 6)

35 (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (ID. SEC. nº 7)

(esta estructura proporciona un sitio para glicosilación cuando se produce recombinantemente en un sistema celular de mamífero que es capaz de glicosilar dichos sitios);

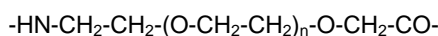
(Gly)₃Cys(Gly)₄ (ID. SEC. nº 8); y

GlyProAsnGly (ID. SEC. nº 9).

40 Para explicar la nomenclatura anterior, por ejemplo, (Gly)₃Lys(Gly)₄ significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly. Se prefieren también combinaciones de Gly y Ala,

También son posibles conectores no peptídicos. Por ejemplo, podrían utilizarse conectores alquílicos, tal como -HN-(CH₂)_s-CO- en que s = 2-20. Estos conectores alquílicos pueden estar además sustituidos con cualquier grupo que no produzca impedimento estérico, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₆), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl o Br), CN, NH₂, fenilo, etc.

Otro tipo de conector no peptídico es un grupo polietilenglicol, tal como:



en el que el valor de "n" es tal que el peso molecular global del conector varía de aproximadamente 101 a 5.000, preferiblemente de 101 a 500.

50 En general, se ha descubierto que se prefiere un conector con una longitud de aproximadamente 0-14 subunidades (por ejemplo, aminoácidos) para los compuestos trombopoyéticos de la primera realización de este invento.

Los conectores peptídicos pueden ser alterados para formar derivados de una manera igual a la anteriormente descrita para los TMPs.

5 Los compuestos de este primer grupo pueden ser además lineales o cíclicos. Por "cíclico" se quiere significar que al menos dos porciones separadas, es decir, no contiguas, de la molécula están unidas entre sí. Por ejemplo, los amino y carboxilo terminales de los extremos de la molécula podrían unirse covalentemente para formar una molécula cíclica. Alternativamente, la molécula podría contener dos o más restos de Cys (por ejemplo, en el conector), los cuales podrían producir una ciclación mediante la formación de un enlace disulfuro. Se contempla además que puedan unirse más de un dímero peptídico en tándem para formar un dímero de dímeros. De esta manera, por ejemplo, un dímero en tándem que contenga un resto de Cys puede formar un enlace disulfuro intermolecular con una Cys de otro de dichos dímeros. Véase más adelante, por ejemplo, el compuesto de la ID. SEC. nº 20.

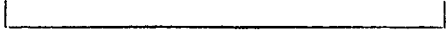

15 Los compuestos del invento pueden estar también covalente o no covalentemente asociados con una molécula vehicular, tal como un polímero lineal (por ejemplo, polietilenglicol, polilisina, dextrano, etc.), un polímero de cadena ramificada (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.289.872, concedida el 15 de Septiembre de 1.981 a Denkenwalter et al.; y 5.229.490, concedida el 20 de Julio de 1.993 a Tam; y el Documento WO 93/21259 de Frechet et al., publicado el 28 de Octubre de 1.993); un lípido; un grupo colesterol (tal como un esteroide); o un hidrato de carbono u oligosacárido. Otros posibles vehículos incluyen una o más fijaciones de polímero soluble en agua, tal como polioxietilenglicol o polipropilenglicol, como se describe en las Patentes de EE.UU. números 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. Aún otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles (por ejemplo, glicerol) polioxietilados y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de estos polímeros.

25 Un vehículo preferido de tales vehículos es el polietilenglicol (PEG). El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y puede ser de cadena lineal o ramificada. El peso molecular medio del PEG variará preferiblemente entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, muy preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa.

30 Los grupos PEG serán generalmente fijados a los compuestos del invento por medio de acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación de tioles u otros métodos quimioselectivos de conjugación/ligación a través de un grupo reactivo del grupo PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino) con un grupo reactivo del compuesto diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino).

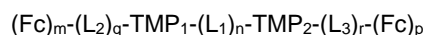
35 Pueden fijarse convenientemente grupos hidrato de carbono (oligosacáridos) a sitios que son conocidos por ser sitios de glicosilación en las proteínas. Generalmente, los oligosacáridos O-enlazados se fijan a restos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que los oligosacáridos N-enlazados se fijan a restos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido salvo prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos presentes en la naturaleza sin contar la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos N-enlazados y O-enlazados y de los restos de azúcar hallados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que es comúnmente hallado en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (al que se hace referencia como ácido siálico). El ácido siálico es normalmente el resto terminal de los oligosacáridos tanto N-enlazados como O-enlazados y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dicho(s) sitio(s) puede(n) ser incorporado(s) al conector de los compuestos de este invento y es(son) preferiblemente glicosilado(s) por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, BHK y COS). Sin embargo, dichos sitios pueden ser además glicosilados mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

45 A continuación se muestran algunos péptidos ejemplares de este invento. Se utilizan abreviaturas de aminoácido de una sola letra, y el conector se muestra separado por guiones para claridad. Abreviaturas adicionales: BrAc significa bromoacetilo [BrCH₂C(O)] y PEG es polietilenglicol.

IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 10
IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cíclico)	ID. SEC. n° 11
	
IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineal)	ID. SEC. n° 12
IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA	ID. SEC. n° 13
IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 14
IEGPTLRQWLAARA-GGGK(BrAc)GGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 15
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 16
IEGPTLRQWLAARA-GGGK(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 17
IEGPTLRQWLAARA-GGGC(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 18
IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 19
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	
	
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 20
IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA	ID. SEC. n° 21

5 En cada uno de los compuestos anteriores, se contempla también una Met (o un resto M, usando el código de una letra) N-terminal. También se contemplan multímeros (por ejemplo, en tándem y no en tándem, covalentemente enlazados y no covalentemente enlazados) de los compuestos anteriores.

En una segunda realización de este invento, los compuestos anteriormente descritos pueden además estar fusionados con uno o más grupos Fc, directamente o por medio de grupos conectores. En general, la fórmula de este segundo grupo de compuestos es:



10 en la que cada uno de TMP₁, TMP₂ y n es como se describió anteriormente; L₁, L₂ y L₃ son grupos conectores, cada uno de los cuales es independientemente seleccionado entre los grupos conectores anteriormente descritos; Fc es una región Fc de una inmunoglobulina; cada uno de m, p, q y r es independientemente seleccionado del grupo que consiste en 0 y 1, en que al menos uno de m y p es 1, y en que, además, si m es 0, q es entonces 0, y, si p es 0, r es entonces 0; y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

15 En consecuencia, los compuestos de este segundo grupo tienen estructuras como las definidas para el primer grupo de compuestos como los anteriormente descritos, pero estos compuestos están además fusionados con al menos un grupo Fc, directamente o por medio de uno o más grupos conectores.

20 La secuencia Fc de los compuestos anteriores puede ser seleccionada de la cadena pesada de inmunoglobulina IgG-1 humana [véase J. W. Ellison et al., Nucleic Acids Res. 10: 4.071-4.079 (1.982)] o de cualquier otra secuencia de Fc conocida en la técnica (por ejemplo, de otras clases de IgG, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG-2, IgG-3 e IgG-4, o de otras inmunoglobulinas).

Es bien sabido que las regiones Fc de los anticuerpos están compuestas de segmentos polipeptídicos monómeros que pueden estar unidos en formas dímeras o multímeras por enlaces disulfuro o por asociación no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monómeras de moléculas de Fc nativas varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA o IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 o IgA2) del anticuerpo implicado. Como se usa aquí, el término "Fc" es común a las formas monómeras, dímeras y multímeras de las moléculas de Fc. Ha de advertirse que los monómeros de Fc se dimerizarán espontáneamente cuando estén presentes los restos de Cys apropiados a menos que estén presentes unas condiciones particulares que eviten la dimerización a través de la formación de enlaces disulfuro. Aun cuando los restos de Cys que forman normalmente enlaces disulfuro en el dímero de Fc sean eliminados o sustituidos por otros restos, las cadenas monómeras se dimerizarán generalmente por medio de interacciones no covalentes. El término "Fc" se usa aquí para significar cualquiera de estas formas: el monómero nativo, el dímero nativo (unido por enlaces disulfuro), dímeros modificados (unidos por disulfuros y/o no covalentemente) y monómeros modificados (es decir, derivados).

Pueden construirse variantes, compuestos análogos o derivados de la porción Fc, por ejemplo, llevando a cabo diversas sustituciones de restos o secuencias.

Los polipéptidos variantes (o análogos) incluyen variantes por inserción, en las que uno o más restos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de Fc. Las inserciones puede localizarse en cualquier extremo de la proteína o en ambos, o pueden disponerse en regiones internas de la secuencia de aminoácidos de Fc. Las variantes por inserción con restos adicionales en cualquier extremo o en ambos pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas o marcadores de aminoácidos. Por ejemplo, la molécula de Fc puede contener opcionalmente una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa recombinantemente en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

En las variantes de Fc por supresión, se eliminan uno o más restos de aminoácido de un polipéptido Fc. Las supresiones pueden efectuarse en un extremo del polipéptido Fc o en ambos extremos, o con eliminación de uno o más restos dentro de la secuencia de aminoácidos de Fc. Por lo tanto, las variantes por supresión incluyen todos los fragmentos de una secuencia del polipéptido Fc.

En las variantes de Fc por sustitución, uno o más restos de aminoácido de un polipéptido Fc son eliminados y son sustituidos por restos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa; sin embargo, el invento también abarca sustituciones que son no conservativas.

Por ejemplo, se pueden suprimir restos de cisteína, o sustituirlos por otros aminoácidos, para evitar la formación de algunos o todos los entrecruzamientos disulfuro de las secuencias de Fc. En particular, los aminoácidos de las posiciones 7 y 10 de la ID. SEC. nº 5 son restos de cisteína. Se puede eliminar cada uno de estos restos de cisteína o sustituir uno o más de tales restos de cisteína por otros aminoácidos, tal como Ala o Ser. Como otro ejemplo, también se pueden hacer modificaciones para introducir sustituciones de aminoácidos para (1) suprimir el sitio de unión al receptor de Fc; (2) suprimir el sitio de unión al complemento (C1q); y/o (3) suprimir el sitio de la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC; del inglés; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Dichos sitios son conocidos en la técnica, y cualesquier sustituciones conocidas caen dentro del alcance de Fc como aquí se usa. Véase, por ejemplo, *Molecular Immunology*, volumen 29, nº 5, 633-639 (1.992), con respecto a sitios ADCC en IgG1.

Asimismo, también se pueden sustituir uno o más restos de tirosina por restos de fenilalanina. Además, otras inserciones, supresiones (por ejemplo, de 1-25 aminoácidos) y/o sustituciones de aminoácidos variantes son también contempladas y caen dentro del alcance del presente invento. Se preferirán generalmente las sustituciones de aminoácidos conservativas. Además, las alteraciones pueden estar en forma de aminoácidos alterados, tales como compuestos peptidomiméticos o D-aminoácidos.

Las secuencias de Fc del compuesto TMP pueden ser también derivatizadas, es decir, pueden llevar modificaciones distintas de la inserción, supresión o sustitución de restos de aminoácido. Preferiblemente, las modificaciones son de naturaleza covalente e incluyen, por ejemplo, la formación de enlaces químicos con polímeros, lípidos, otros compuestos orgánicos y grupos inorgánicos. Los derivados del invento pueden ser preparados para aumentar la semivida en circulación o pueden ser diseñados para mejorar la capacidad del polipéptido para dirigirse a células, tejidos u órganos deseados.

También es posible usar, como parte Fc de los compuestos del invento, el dominio de la molécula de Fc intacta que se une al receptor de rescate, tal como se describe en el Documento WO 96/32478, titulado "Altered Polypeptides with Increased Half-Life". Son miembros adicionales de la clase de moléculas aquí denominadas Fc aquellos que se describen en el Documento WO 97/34631, titulado "Immunoglobulin-Like Domains with Increased Half-Lives". Ambas solicitudes PCT publicadas citadas en este párrafo se incorporan a esta memoria como referencia.

Las fusiones de Fc pueden ser en el extremo N o C de TMP₁ o TMP₂ o en ambos extremos, N y C, de los TMPs. Se ha descubierto sorprendentemente que los péptidos en que un grupo Fc está ligado al extremo N del grupo TMP son más bioactivos que los resultantes de las otras posibilidades, por lo que se prefiere la fusión que tiene un dominio Fc en el extremo N de TMP₁ (es decir, tanto **r** como **p** son 0 y tanto **m** como **q** son 1 en la fórmula general). Cuando la

cadena Fc está fusionada en el extremo N del TMP o el conector, dicha fusión tendrá generalmente lugar en el extremo C de la cadena Fc, y viceversa.

5 También se prefieren los compuestos que son dímeros (por ejemplo, en tándem y no en tándem) de los compuestos descritos en la fórmula general anteriormente expuesta. En tales casos, cada cadena de Fc estará unida a un dímero de péptidos TMP en tándem. En la Figura 6C se muestra un ejemplo esquemático de dicho compuesto. Un ejemplo preferido de este tipo de compuesto se basa en la Figura 6C, en la que Fc es un dímero del compuesto de ID. SEC. n° 5, cada L₂ es (Gly)₅, cada uno de TMP₁ y TMP₂ es el compuesto de ID. SEC. n° 1, y cada L₁ es (Gly)₈. A este compuesto también se hace aquí referencia como "Fc-TMP₁-L-TMP₂". Es también representado como un dímero (a través de la porción Fc) de la ID. SEC. n° 34. También se contempla el compuesto análogo de la Figura 6C en que el grupo Fc está unido al extremo C de los grupos TMP₂ por medio de un conector, compuesto al que se hace aquí referencia como "TMP₁-L-TMP₂-Fc".

A continuación se proporcionan algunos ejemplos específicos de compuestos del segundo grupo:

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 22)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (ID. SEC. n° 23)

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (ID. SEC. n° 24)

Fc-GG-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 25)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 26)

Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (ID. SEC. n° 27)
 (cíclico)


Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (ID. SEC. n° 28)
 (lineal)

Fc-IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (ID. SEC. n° 29)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 30)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 31)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. n° 32)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA
 (ID. SEC. n° 33)

Fc-GGGGG-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA
 (ID. SEC. n° 34)

15 En cada uno de los compuestos anteriores, también se contempla una Met (o resto M al usar el código de una letra) N-terminal adicional. El resto de Met puede fijarse al extremo N del grupo Fc, en cuyo caso hay un grupo Fc fijado al extremo N del TMP. En los casos en que el grupo Fc está fijado al extremo C del TMP, los restos de Met podrían fijarse al extremo N del grupo TMP.

20 En cada uno de los casos anteriores, Fc es preferiblemente la región Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG1 humana o un fragmento, derivado o dímero biológicamente activo de la misma; véase J. W. Ellison et al., Nucleic Acids Res. 10: 4.071-4.079 (1.982). La secuencia de Fc mostrada en la ID. SEC. n° 5 es la Fc más preferida para los compuestos anteriores. También se prefieren los compuestos anteriores en que la Fc es una forma dímera de la secuencia de ID. SEC. n° 5 y cada cadena de Fc está fijada a un dímero de TMPs en tándem.

Además, aunque muchos de los compuestos preferidos de la segunda realización incluyen uno o más dímeros en

tándem ya que poseen dos grupos TMP unidos, otros compuestos de este invento incluyen multímeros de los TMPs en tándem, es decir, compuestos con las siguientes estructuras ejemplares:

Fc-TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃;

Fc-TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄;

5 Fc-TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄-L-TMP₅;

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-Fc;

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄-L-Fc;

TMP₁-L-TMP₂-L-TMP₃-L-TMP₄-L-TMP₅-L-Fc;

10 en que TMP₁, TMP₂, TMP₃, TMP₄ y TMP₅ pueden tener estructuras iguales o diferentes y en que Fc y cada TMP y cada L se definen como se expusieron anteriormente, y cada conector es opcional. En cada caso anterior, el grupo Fc puede ser monómero o dímero y, en los casos en que el Fc es dímero, se pueden fijar uno o más multímeros de TMP a cada cadena Fc. Se contemplan también otros ejemplos en que los dímeros o multímeros de TMP están fijados tanto al extremo N como al C de una o ambas cadenas de Fc, incluyendo el caso en que están fijados dímeros o multímeros de TMP a los cuatro extremos de dos cadenas de Fc.

15 Preferiblemente, los compuestos de esta segunda realización del invento tendrán de aproximadamente 200 a 400 aminoácidos en total (es decir, serán polipéptidos).

Métodos de preparación

20 Los compuestos de este invento pueden ser preparados de diversas maneras. Puesto que muchos de los compuestos serán péptidos, o incluirán un péptido, los métodos para sintetizar péptidos tienen aquí una particular relevancia. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas para síntesis en fase sólida. Las técnicas adecuadas son bien conocidas en este campo e incluyen las descritas por Merrifield en Chem. Polypeptides, páginas 335-61 (compilado por Katsoyannis y Panayotis, 1.973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2.149 (1.963); Davis et al., Biochem. Intl. 10: 394-414 (1.985); Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis (1.969); Patente de EE.UU. n° 3.941.763; Finn et al., "The Proteins", 3ª edición, volumen 2, páginas 105-253 (1.976); y Erickson et al., "The Proteins", 3ª edición, volumen 2, páginas 257-527 (1.976). La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales ya que es el método más económicamente eficaz para preparar péptidos pequeños.

25 Los péptidos pueden también generarse en células huésped transformadas, usando técnicas de DNA recombinante. Para hacer esto, se prepara una molécula de DNA recombinante que codifica el péptido. Los métodos para preparar dichas moléculas de DNA y/o RNA son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, secuencias que codifican los péptidos podrían ser escindidas de DNA usando enzimas de restricción adecuadas. Las secuencias relevantes pueden ser creadas usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) con la inclusión de sitios de restricción útiles para la subsiguiente clonación. Alternativamente, la molécula de DNA/RNA podría ser sintetizada usando técnicas de síntesis química, tal como el método de la fosforamidita. Además, se podría utilizar una combinación de estas técnicas.

30 El invento también incluye un vector que codifica los péptidos en una huésped apropiado. El vector comprende la molécula de DNA que codifica los péptidos, operativamente ligada a apropiadas secuencias para control de la expresión. Los métodos para efectuar esta ligación operativa, antes o después de que la molécula de DNA que codifica el péptido sea insertada en el vector, son bien conocidos. Las secuencias para el control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómica, señales de inicio, señales de parada, señales de remate, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o la traducción.

El vector resultante que comprende la molécula de DNA que codifica el péptido es utilizado para transformar un huésped apropiado. Esta transformación puede ser llevada a cabo utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

35 En la práctica de este invento, puede utilizarse cualquiera de un gran número de células huésped asequibles y bien conocidas. La selección de un huésped particular depende de diversos factores reconocidos por la técnica. Estos factores incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión elegido, toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de DNA sobre la célula huésped, velocidad de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, bioseguridad y costes. Un equilibrio de estos factores debe ser enfrentado al conocimiento de que no todos los huéspedes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de DNA particular.

40 Dentro de estas directrices generales, los huéspedes microbianos útiles incluyen bacterias (tal como *E. coli*), levaduras (tales como *Saccharomyces sp.* y *Pichia pastoris*) y otros hongos, insectos, plantas, células de mamífero (incluyendo el ser humano) en cultivo, y otros huéspedes conocidos en la técnica.

A continuación, el huésped transformado es cultivado bajo unas condiciones de fermentación convencionales para que se expresen los péptidos deseados. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica.

Finalmente, los péptidos son purificados del cultivo por fermentación o de las células huésped en que se expresan. Estos métodos de purificación son también bien conocidos en la técnica.

- 5 Los compuestos que contienen péptidos derivatizados o que contienen grupos no peptídicos pueden ser sintetizados mediante técnicas de química orgánica bien conocidas.

Usos de los compuestos

10 Los compuestos de este invento tienen la capacidad para unirse a, y activar, el receptor c-Mpl y/o tienen la capacidad para estimular la producción (tanto *in vivo* como *in vitro*) de plaquetas ("actividad trombopoyética") y precursores de plaquetas ("actividad megacariocitopoyética"). Para medir la(s) actividad(es) de estos compuestos se pueden usar ensayos estándares, tales como los descritos en el Documento WO 95/26746, titulado "Compositions and Methods for Stimulating Megakaryocyte Growth and Differentiation". Además, en la presente sección de Ejemplos se describen ensayos *in vivo*.

15 Los estados que se van a tratar mediante los métodos y composiciones del presente invento son generalmente aquellos en que está implicada una existente deficiencia de megacariocitos/plaquetas o una prevista o esperada deficiencia de megacariocitos/plaquetas en el futuro (por ejemplo, a causa de una proyectada cirugía o donación de plaquetas). Dichos estados pueden ser el resultado de una deficiencia (temporal o permanente) de ligando activo de Mpl *in vivo*. El término genérico para la deficiencia de plaquetas es trombocitopenia y, por lo tanto, los métodos y composiciones del presente invento son generalmente apropiados para tratar profiláctica o terapéuticamente la trombocitopenia en pacientes que lo necesitan.

20 La Organización Mundial de la Salud ha clasificado los grados de trombocitopenia en relación con el número de plaquetas circulantes en el individuo (Miller et al., Cancer 47: 210-211 (1.981)). Por ejemplo, un individuo que no muestra señales de trombocitopenia (Grado 0) tendrá generalmente al menos 100.000 plaquetas/mm³. Una trombocitopenia suave (Grado 1) indica un nivel de plaquetas circulantes de entre 79.000 y 99.000/mm³. Una trombocitopenia moderada (Grado 2) muestra entre 50.000 y 74.000 plaquetas/mm³ y una trombocitopenia grave se caracteriza por entre 25.000 y 49.000 plaquetas/mm³. La trombocitopenia debilitante o de riesgo vital se caracteriza por una concentración de plaquetas circulantes inferior a 25.000/mm³.

25 La trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) puede presentarse por diversas razones, incluyendo la quimioterapia y otra terapia con diversidad de fármacos, terapia por radiación, cirugía, pérdida accidental de sangre y otros estados morbosos específicos. Son estados morbosos específicos ejemplares que acarrear trombocitopenia y pueden ser tratados de acuerdo con este invento: anemia aplásica; trombocitopenia idiopática o inmune (ITP; del inglés, idiopathic or immune thrombocytopenia), incluyendo la púrpura trombocitopénica idiopática asociada con el cáncer de mama; ITP asociada con HIV y púrpura trombocitopénica trombótica relacionada con HIV; tumores metastásicos que dan lugar a trombocitopenia, lupus eritematoso sistémico, incluyendo el síndrome de lupus neonatal; esplenomegalia; síndrome de Fanconi; deficiencia de vitamina B12; deficiencia de ácido fólico; anomalía de May-Hegglin; síndrome de Wiskott-Aldrich; enfermedad hepática crónica; síndrome mielodisplásico asociado con trombocitopenia; hemoglobinuria paroxística nocturna; trombocitopenia profunda aguda tras terapia con C7E3 Fab (Abciximab); trombocitopenia aloinmune, incluyendo trombocitopenia aloinmune materna; trombocitopenia asociada con anticuerpos antifosfolípidos y trombosis; trombocitopenia autoinmune; trombocitopenia inmune provocada por fármacos, incluyendo la trombocitopenia provocada por carboplatina y la trombocitopenia provocada por heparina; trombocitopenia fetal; trombocitopenia de la gestación; síndrome de Hughes; trombocitopenia lupoide; pérdida accidental y/o masiva de sangre; trastornos mieloproliferativos; trombocitopenia en pacientes con malignidades; púrpura trombocitopénica trombótica, incluyendo microangiopatía trombótica que se manifiesta como púrpura trombocitopénica trombótica/síndrome urémico hemolítico en pacientes con cáncer; anemia hemolítica autoinmune; perforación de un divertículo duodenal oculto; aplasia pura de células rojas; trombocitopenia autoinmune; nefropatía epidémica; insuficiencia renal aguda asociada con rifampicina; trombocitopenia de Paris-Trousseau; trombocitopenia aloinmune neonatal; hemoglobinuria paroxística nocturna; cambios hematológicos en el cáncer de estómago; síndromes urémicos hemolíticos en la infancia; y manifestaciones hematológicas relacionadas con una infección vírica, incluyendo trombocitopenia asociada con CMV y el virus de la hepatitis A. Además, ciertos tratamientos para el sida (por ejemplo, AZT) dan lugar a trombocitopenia. Ciertos trastornos en la cicatrización de heridas podrían también beneficiarse de un aumento de los números de plaquetas.

30 Con respecto a previstas deficiencias de plaquetas, por ejemplo, a causa de una futura cirugía, un compuesto del presente invento podría ser administrado de varios días a varias horas antes de la necesidad de plaquetas. Con respecto a situaciones agudas, por ejemplo, una pérdida accidental y masiva de sangre, se podría administrar un compuesto de este invento junto con sangre o plaquetas purificadas.

35 Los compuestos de este invento pueden ser también útiles para estimular ciertos tipos celulares distintos de los megacariocitos si se halla que dichas células expresan el receptor Mpl. Los estados asociados con dichas células que expresan el receptor Mpl, que son sensibles a una estimulación por el ligando de Mpl, también caen dentro del

alcance de este invento.

Los compuestos de este invento pueden ser utilizados en cualquier situación en que se desee una producción de plaquetas o células precursoras de plaquetas o en que se desee la estimulación del receptor c-Mpl. De esta manera, por ejemplo, los compuestos de este invento pueden ser utilizados para tratar cualquier estado de un mamífero en que haya necesidad de plaquetas, megacariocitos y similares. Dichos estados se describen con detalle en las siguientes fuentes ejemplares: WO95/26746, WO95/21919, WO95/18858 y WO95/21920 y se incorporan a esta memoria

Los compuestos de este invento pueden ser también útiles para mantener la viabilidad o el tiempo de almacenamiento de las plaquetas y/o megacariocitos y células relacionadas. En consecuencia, podría ser útil incluir una cantidad eficaz de uno o más de tales compuestos en una composición que contuviera dichas células.

Por "mamífero" se quiere significar cualquier mamífero, incluyendo seres humanos; animales domésticos, incluyendo perros y gatos; animales exóticos y/o de zoo, incluyendo monos; animales de laboratorio, incluyendo ratones, ratas y cobayas; animales de granja, incluyendo caballos, ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos; y similares. El mamífero preferido es el ser humano.

Composiciones farmacéuticas

El presente invento también proporciona métodos para utilizar composiciones farmacéuticas de los compuestos del invento. Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para administración por inyección o para administración oral, nasal, transdérmica o de otra forma, incluyendo, por ejemplo, la inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar (por ejemplo, fármacos en forma de aerosol) o subcutánea (incluyendo la administración por depósito, para una liberación de larga duración); por vía sublingual, anal o vaginal, o mediante implantación quirúrgica, por ejemplo, encajadas bajo la cápsula esplénica, en el cerebro o en la córnea. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o una pluralidad de dosis a lo largo de un período de tiempo. En general, el invento comprende composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de un compuesto del invento junto con agentes diluyentes, conservantes, agentes solubilizadores, agentes emulsivos, agentes adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen agentes diluyentes con diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato o fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizadores (por ejemplo, Tween 80 o polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico y metabisulfito sódico), conservantes (por ejemplo, timerosal y alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa y manitol); y la incorporación del material a preparaciones corpusculares de compuestos polímeros tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc., o a liposomas. Puede utilizarse también ácido hialurónico, el cual puede ejercer el efecto de provocar una duración prolongada en la circulación. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir opcionalmente aún otros diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, monolaurato de polioxietileno-sorbitán, estearato magnésico, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, almidones, sacarosa, dextrosa, goma arábica, fosfato cálcico, aceite mineral, manteca de cacao y aceite de *Theobroma*. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de las proteínas y derivados presentes. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición (1.990, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 18042, EE.UU.), páginas 1.435-1.712 que se incorporan a esta memoria como referencia. Las composiciones pueden ser preparadas en forma líquida o pueden estar en forma de polvo seco, tal como en forma liofilizada. También se contemplan formulaciones implantables para liberación continua, como lo son las formulaciones transdérmicas.

Para uso aquí se contemplan formas de dosificación sólidas orales, las cuales se describen, en general, en Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, 1.990 (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 18042, EE.UU.), en el capítulo 89 que se incorpora en esta memoria como referencia. Las formas de dosificación sólidas incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, pastillas o gránulos, sellos y glóbulos. Además, se puede usar la encapsulación liposómica o proteinoide para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, las microesferas proteinoideas presentadas en la Patente de EE.UU. nº 4.925.673). Se puede usar la encapsulación liposómica, y los liposomas se pueden derivatizar con diversos polímeros (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.013.556). K. Marshall, "Modern Pharmaceutics", compilado por G. S. Banker y C. T. Rhodes, capítulo 10, 1.979, incorporada en esta memoria como referencia, proporciona una descripción de posibles formas de dosificación sólidas para el producto terapéutico. En general, la formulación incluirá el compuesto del invento e ingredientes inertes que permitan la protección frente al ambiente estomacal y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

También se contemplan específicamente formas de dosificación orales de los anteriores compuestos del invento. Si es necesario, los compuestos pueden ser químicamente modificados para que la distribución oral sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la fijación de al menos un grupo a la propia molécula de compuesto de modo que dicho grupo permita (a) la inhibición de la proteólisis y (b) la incorporación a la corriente sanguínea desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento de la estabilidad global del compuesto y el aumento del tiempo de circulación en el organismo. Los ejemplos de dichos grupos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y

poliprolina [Abuchowski y Davis, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en "Enzymes as Drugs", compilado por Hocenberg y Roberts, Wiley-Interscience, New York, EE.UU. (1.981), páginas 367-383; Newmark et al., J. Appl. Biochem. 4: 185-189 (1.982)]. Otros polímeros que podrían utilizarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Como se indicó anteriormente, se prefieren los grupos polietilenglicol para uso farmacéutico.

5 Para las formas de dosificación para distribución oral, también es posible utilizar una sal de un aminoácido alifático modificado, tal como N-[8-(2-hidroxibenzoil)amino]caprilato sódico (SNAC), como un vehículo para potenciar la absorción de los compuestos terapéuticos de este invento. La eficacia clínica de una formulación de heparina usando SNAC ha sido demostrada en una prueba de Fase II llevada a cabo por Emisphere Technologies. Véase la Patente de EE.UU. nº 5.792.451, "Oral drug delivery compositions and methods".

10 El compuesto terapéutico puede ser incluido en la formulación como múltiples partículas finas en forma de gránulos o glóbulos con un tamaño de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para administración en cápsulas podría ser también en forma de polvo, pellas ligeramente comprimidas o incluso tabletas. El compuesto terapéutico podría ser preparado mediante compresión.

15 Pueden incluirse tanto colorantes como agentes saboreadores. Por ejemplo, la proteína (o el derivado) puede ser formulada (tal como mediante encapsulación en liposomas o microesferas) y luego adicionalmente incluida en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saboreadores.

20 Se puede diluir o aumentar el volumen del compuesto terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se pueden usar ciertas sales inorgánicas, incluyendo trifosfato cálcico, carbonato magnésico y cloruro sódico, como cargas. Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell son algunos diluyentes comercialmente asequibles.

25 Pueden incluirse agentes disgregantes en la formulación del compuesto terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como agentes disgregantes incluyen, pero no se limitan a, el almidón, incluyendo Explotab, un agente disgregante comercial basado en almidón. También se pueden usar almidón-glicolato sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, rayadura de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los agentes disgregantes es la de resinas insolubles de intercambio catiónico. Se pueden usar gomas pulverulentas como agentes disgregantes y como agentes aglutinantes, y estos pueden incluir gomas pulverulentas tales como agar, goma karaya y goma tragacanto. El ácido alginico y su sal sódica son también útiles como agentes disgregantes.

30 Pueden utilizarse agentes aglutinantes para mantener juntas las partículas del agente terapéutico con objeto de formar una tableta dura, y dichos agentes aglutinantes incluyen materiales procedentes de productos naturales tales como goma arábica, goma tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Podrían utilizarse tanto polivinilpirrolidona (PVP) como hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC) en disoluciones alcohólicas para granular el compuesto terapéutico.

35 Se puede incluir un agente antifricción en la formulación del compuesto terapéutico para evitar la adherencia durante el proceso de formulación. Se pueden usar lubricantes como una capa entre el compuesto terapéutico y la pared de la matriz, y aquellos pueden incluir, pero no se limitan a: ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden utilizar lubricantes solubles tales como laurilsulfato sódico, laurilsulfato magnésico, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y Carbowax 4000 y 6000.

Podrían añadirse agentes mejoradores de la fluencia para mejorar las propiedades de fluencia del fármaco durante la formulación y facilitar el reordenamiento durante la compresión. Los agentes mejoradores de la fluencia pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

45 Para facilitar la disolución del compuesto terapéutico en el ambiente acuoso, podría añadirse un agente tensioactivo como agente humectante. Los agentes tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato sódico, dioctil-sulfosuccinato sódico y dioctil-sulfonato sódico. Podrían utilizarse detergentes catiónicos, los cuales podrían incluir cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. La lista de posibles detergentes no iónicos que podrían ser incluidos en la formulación como agentes tensioactivos consiste en: lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerilo, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de sacarosa y ácido graso, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos agentes tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de la proteína o el derivado solos o mezclados en diferentes relaciones.

Los ácidos grasos, tales como, por ejemplo, el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido linolénico, son, por ejemplo, aditivos que posiblemente potencian la absorción del compuesto.

55 Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. El fármaco podría ser incorporado a una matriz inerte que permitiera la liberación por mecanismos de difusión o lixiviación, tal como, por ejemplo, las gomas. También pueden incorporarse matrices de degeneración lenta, por ejemplo, alginatos y polisacáridos, a la formulación. Otra forma de liberación controlada de este compuesto terapéutico es mediante un método basado en el sistema

terapéutico Oros (Alza Corp.); es decir, el fármaco es encerrado en una membrana semipermeable que permite que entre agua y expulse el fármaco por efectos osmóticos a través de un única abertura pequeña. Ciertos revestimientos entéricos también ejercen un efecto de liberación retardada.

5 Pueden usarse otros revestimientos para la formulación. Estos incluyen una diversidad de azúcares que podrían ser aplicados en una cubeta para revestimiento. El agente terapéutico podría ser también proporcionado en una tableta con revestimiento pelicular, y los materiales usados en este caso se dividen en 2 grupos. El primero son los materiales no entéricos e incluye metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metil-hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en los materiales entéricos, que son comúnmente ésteres del ácido ftálico.

10 Se podría utilizar una mezcla de materiales para obtener el revestimiento pelicular óptimo. El revestimiento con película puede ser llevado a cabo en una máquina para revestimiento en cubeta, o en un lecho fluidizado o mediante revestimiento por compresión.

15 También se contempla aquí la distribución pulmonar de la presente proteína (o derivados de la misma). La proteína (o el derivado) es suministrada a los pulmones de un mamífero por inhalación y atraviesa el revestimiento epitelial pulmonar hasta llegar a la corriente sanguínea [Otros comunicados relativos a esto incluyen Adjei et al., Pharmaceutical Research 7: 565-569 (1.990); Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics 63: 135-144 (1.990) (acetato de leuprolida); Braquet et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology 13 (supl. 5): s.143-146 (1.989) (endotelina 1); Hubbard et al., Annals of Internal Medicine 3: 206-212 (1.989) (α 1-antitripsina); Smith et al., J. Clin. Invest. 84: 1.145-1.146 (1.989) (α 1-proteinasa); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", Proceedings of
20 Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, EE.UU., Marzo de 1.990 (hormona humana recombinante del crecimiento); Debs et al., The Journal of Immunology 140: 3.482-3.488 (1.988) (interferón γ y factor α de necrosis tumoral); y Platz et al., Patente de EE.UU. n° 5.284.656 (factor estimulador de colonias de granulocitos).

25 Para uso en la práctica de este invento se contempla una gran variedad de dispositivos mecánicos diseñados para la distribución pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, nebulizadores, inhaladores de dosis calibrada e inhaladores de polvo, todos los cuales resultan familiares a los expertos en la técnica.

30 Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente asequibles adecuados para la práctica de este invento son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado, EE.UU.; el inhalador de dosis calibrada Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina, EE.UU.; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts, EE.UU.

Todos los dispositivos citados requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del compuesto del invento. Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado además de agentes diluyentes, agentes adyuvantes y/o vehículos útiles en terapia.

35 El compuesto del invento debería ser ventajosamente preparado en forma corpuscular con un tamaño medio de partícula inferior a 10 μ m (o micrómetros), muy preferiblemente de 0,5 a 5 μ m, para una distribución más eficaz a la zona distal del pulmón.

40 Los vehículos incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para uso en las formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Se pueden utilizar agentes tensioactivos naturales o sintéticos. Se puede usar polietilenglicol (incluso aparte de su uso para derivatizar la proteína o el compuesto análogo). Se pueden usar dextranos, tal como ciclodextrano. Se pueden usar sales biliares y otros potenciadores relacionados. Se pueden utilizar celulosa y derivados de celulosa. Se pueden usar aminoácidos, tal como para uso en una formulación de un tampón.

45 Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión y otros tipos de vehículos.

50 Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, sea de chorro o sea ultrasónico, comprenderán típicamente el compuesto del invento disuelto en agua con una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de disolución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar sencillo (por ejemplo, para estabilización de proteínas y para regulación de la presión osmótica). La formulación para nebulizador puede también contener un agente tensioactivo para reducir o evitar la agregación superficialmente inducida de la proteína, causada por la atomización de la disolución al formarse el aerosol.

55 Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis calibrada comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el compuesto del invento suspendido en un propulsor con la ayuda de un agente tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarburo, un hidrocloreofluorocarburo, un hidrofloreofluorocarburo o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico

puede ser también útil como agente tensioactivo.

Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el compuesto del invento, y pueden también incluir un agente de carga, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol, en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, del 50 al 90 % en peso de la formulación.

También se contempla la distribución nasal del compuesto del invento. La distribución nasal permite el paso directo de la proteína a la corriente sanguínea después de la administración del producto terapéutico por la nariz, sin necesidad del depósito del producto en el pulmón. Las formulaciones para distribución nasal incluyen aquéllas con dextrano o ciclodextrano. También se contempla la distribución por medio del transporte a través de otras membranas mucosas.

Dosificaciones

El régimen de dosificación implicado en un método para tratar los estados anteriormente descritos será determinado por el médico que asiste al paciente, considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, tales como, por ejemplo, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de toda infección, el momento de administración y otros factores clínicos. Generalmente, la dosis debería estar en el intervalo de 0,1 µg a 100 mg del compuesto del invento por kilogramo de peso corporal por día, preferiblemente de 0,1 a 1.000 µg/kg, y más preferiblemente de 0,1 a 150 µg/kg, administrados en dosis diarias o en dosis equivalentes con intervalos más largos o más cortos, por ejemplo, un día sí y otro no, dos veces a la semana, semanalmente, o dos o tres veces al día.

El compuesto del invento puede ser administrado mediante un bolo inicial seguido de una infusión continua para mantener unos niveles circulantes terapéuticos del producto farmacológico. Como otro ejemplo, el compuesto del invento puede ser administrado como una dosis de una sola vez. Quienes tienen una experiencia normal en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones y regímenes de administración eficaces, según se determinan mediante una buena práctica médica y el estado clínico del paciente concreto. La frecuencia de administración dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición (1.990, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 18042, EE.UU.), páginas 1.435-1.712, cuya descripción se incorpora en esta memoria como referencia. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se puede calcular una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, la superficie corporal o el tamaño de los órganos. Una refinación adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento, que afecta a cada una de las formulaciones anteriormente mencionadas, es rutinariamente realizada por quienes tienen una experiencia normal en la técnica sin una experimentación excesiva, especialmente a la luz de la información sobre dosificación y de los ensayos aquí descritos, así como de los datos farmacocinéticos observados en las pruebas clínicas humanas anteriormente discutidas. Las dosificaciones apropiadas pueden ser determinadas mediante el uso de ensayos establecidos para determinar dosificaciones de niveles sanguíneos, junto con datos de dosis-respuesta apropiados. El régimen de dosificación final será determinado por el médico que asiste al paciente considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, tales como, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la sensibilidad del paciente, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de toda infección, el momento de administración y otros factores clínicos. Conforme se lleven estudios a cabo, surgirá más información relativa a los niveles de dosificación apropiados y a la duración del tratamiento para diversas enfermedades y estados.

Los métodos, composiciones y compuestos terapéuticos del presente invento pueden ser también empleados, solos o en combinación con otras citocinas, receptor Mpl soluble, factores hematopoyéticos, interleucinas, factores de crecimiento o anticuerpos, en el tratamiento de estados morbosos caracterizados por otros síntomas además de las deficiencias de plaquetas. Se prevé que el compuesto del invento demuestre su utilidad en el tratamiento de ciertas formas de trombocitopenia en combinación con estimuladores generales de la hematopoyesis, tales como IL-3 y GM-CSF. Otros factores estimuladores megacariocíticos, es decir, meg-CSF, factor de las células madre (SCF; del inglés, stem cell factor), factor inhibidor de la leucemia (LIF; del inglés, leukemia inhibitory factor) y oncostatina M (OSM), u otras moléculas con actividad estimuladora de megacariocitos pueden también emplearse con ligando de Mpl. Las citocinas o factores hematopoyéticos ejemplares adicionales para dicha coadministración incluyen IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor 1 estimulador de colonias, (CSF-1; del inglés, colony stimulating factor-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF; del inglés, granulocyte colony stimulating factor), EPO, interferón alfa (IFN-alfa), interferón de consenso, IFN-beta, IFN-gamma, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, trombopoyetina (TPO), angiopoyetinas, por ejemplo, Ang-1, Ang-2, Ang-4 y Ang-Y, el polipéptido similar a angiopoyetina humano, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; del inglés, vascular endothelial growth factor), angiogenina, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica

ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor IA de la proteína morfogénica ósea, receptor IB de la proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor α del factor neurotrófico ciliar, factor 1 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas, factor 2 α quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas, factor 2 β quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas, factor β de crecimiento de células endoteliales, endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, sustancia atractiva de neutrófilos derivada de células epiteliales, factor 4 de crecimiento de fibroblastos, factor 5 de crecimiento de fibroblastos, factor 6 de crecimiento de fibroblastos, factor 7 de crecimiento de fibroblastos, factor 8 de crecimiento de fibroblastos, factor 8b de crecimiento de fibroblastos, factor 8c de crecimiento de fibroblastos, factor 9 de crecimiento de fibroblastos, factor 10 de crecimiento de fibroblastos, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales, receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico ligante de heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor I de crecimiento similar a insulina, receptor del factor de crecimiento similar a insulina, factor II de crecimiento similar a insulina, proteína ligante del factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de la leucemia, receptor α del factor inhibidor de la leucemia, factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento nervioso, neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor de crecimiento placentario, factor 2 de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor A de crecimiento derivado de plaquetas, factor AA de crecimiento derivado de plaquetas, factor AB de crecimiento derivado de plaquetas, cadena del factor B de crecimiento derivado de plaquetas, factor BB de crecimiento derivado de plaquetas, receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulador del crecimiento de células pre-B, receptor del factor de células madre, TNF, incluyendo TNF0, TNF1 y TNF2, factor α de crecimiento transformante, factor β de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante, factor β 1.2 de crecimiento transformante, factor β 2 de crecimiento transformante, factor β 3 de crecimiento transformante, factor β 5 de crecimiento transformante, factor β 1 de crecimiento transformante latente, proteína I ligante del factor β de crecimiento transformante, proteína II ligante del factor β de crecimiento transformante, proteína III ligante del factor β de crecimiento transformante, receptor de tipo I del factor de necrosis tumoral, receptor de tipo II del factor de necrosis tumoral, receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, factor de crecimiento del endotelio vascular, y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos. También puede ser útil administrar, simultánea o secuencialmente, una cantidad eficaz de un receptor Mpl soluble de mamífero, el cual parece producir el efecto de causar que los megacariocitos se fragmenten en plaquetas una vez que los megacariocitos han alcanzado la forma madura. De esta manera, se espera que la administración de un compuesto del invento (para aumentar el número de megacariocitos maduros) seguida de la administración del receptor Mpl soluble (para inactivar el ligando y permitir que los megacariocitos maduros produzcan plaquetas) sea un medio particularmente eficaz para estimular la producción de plaquetas. La dosificación anteriormente indicada sería ajustada para compensar dichos componentes adicionales en la composición terapéutica. El progreso del paciente tratado puede ser controlado por métodos convencionales.

En los casos en que los compuestos del invento se añaden a composiciones de plaquetas y/o megacariocitos y células relacionadas, la cantidad que se habrá de incluir será generalmente determinada experimentalmente mediante técnicas y ensayos conocidos en este campo técnico. Un intervalo ejemplar de cantidades es 0,1 μ g - 1 mg de compuesto del invento por 10^6 células.

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas del presente invento a un problema o situación específico estará dentro de las capacidades de quien tiene una experiencia normal en la técnica a la luz de las enseñanzas aquí contenidas. A continuación se muestran ejemplos de los productos del presente invento y procedimientos representativos para su aislamiento, uso y fabricación.

Ejemplos

I. A continuación se exponen métodos ejemplares para preparar algunos de los compuestos del primer grupo aquí descrito.

A. Materiales y Métodos

Todos los derivados de aminoácidos (todos de configuración L) y resinas usados en la síntesis peptídica fueron adquiridos a Novabiochem. Los reactivos para la síntesis peptídica (DCC, HOBt, etc.) fueron adquiridos a Applied Biosystems, Inc., en forma de disolución. Los dos derivados de PEG fueron de Shearwater Polymers, Inc. Todos los disolventes (diclorometano, N-metilpirrolidina, metanol y acetonitrilo) fueron de EM Sciences. La HPLC (cromatografía de alta eficacia en fase líquida; del inglés, *high performance liquid chromatography*) analítica se llevó a cabo en un sistema Beckman con una columna Vydac (0,46 cm x 25 cm, fase inversa C18, 5 μ m), un caudal de 1 ml/min y detección UV doble a 220 y 280 nm. Para todas las operaciones de HPLC se utilizaron gradientes lineales con dos fases móviles: Tampón A - H₂O (TFA al 0,1 %) y Tampón B - acetonitrilo (TFA al 0,1 %). Los péptidos numerados a los que aquí se hace referencia, por ejemplo, 17b, 18, 19 y 20, son numerados en relación con la Tabla I y algunos de ellos son adicionalmente ilustrados en las Figuras 2 y 3.

Síntesis peptídica. Todos los péptidos fueron preparados mediante el bien establecido método de síntesis gradual en fase sólida. La síntesis en fase sólida con química de Fmoc fue llevada a cabo usando un sintetizador peptídico ABI. Típicamente, la síntesis peptídica comenzó con una resina Wang precargada a una escala de 0,1 milimoles. La desprotección de Fmoc se llevó a cabo con el protocolo estándar de piperidina. La copulación fue efectuada usando DCC/HOBt. Los grupos protectores de cadenas laterales fueron: Glu(O-t-Bu), Thr(t-Bu), Arg(Pbf), Gln(Trt), Trp (t-Boc) y Cys(Trt). Para el primer precursor peptídico para pegilación, se usó Dde para la protección de la cadena lateral de la Lys del conector y se usó Boc-Ile-OH para la última copulación. Se eliminó el Dde usando hidrazina anhídrido (2 % en NMP, 3x2 min), lo que fue seguido de copulación con anhídrido bromoacético preformado por la acción de DCC. Para el péptido 18, la cadena lateral de la cisteína del conector fue protegida mediante un grupo tritilo. La desprotección final y la escisión de todas las peptidil-resinas se efectuaron a temperatura ambiental durante 4 h usando ácido trifluoroacético (TFA) que contenía H₂O al 2,5 %, fenol al 5 %, triisopropilsilano al 2,5 % y tioanisol al 2,5 %. Después de la eliminación del TFA, el péptido escindido fue precipitado con éter dietílico anhidro frío. La formación de disulfuros del péptido cíclico fue llevada directamente a cabo sobre el material crudo usando DMSO al 15 % en H₂O (pH de 7,5). Todos los péptidos crudos fueron purificados por HPLC preparativa en fase inversa, y las estructuras fueron confirmadas por espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS; del inglés, electrospray ionization mass spectrometry) y análisis de aminoácidos.

Alternativamente, todos los péptidos anteriormente descritos podrían ser también preparados usando la química de t-Boc. En este caso, la resina de partida sería la clásica resina Merrifield o Pam y los grupos protectores de cadenas laterales serían: Glu(OBzl), Thr(Bzl), Arg(Tos), Trp (CHO) y Cys(p-MeBzl). Se utilizaría fluoruro de hidrógeno (HF) para la escisión final de las peptidil-resinas.

Todos los péptidos dímeros en tándem descritos en este estudio que tienen conectores compuestos de aminoácidos naturales pueden ser también preparados mediante tecnología de DNA recombinante.

PEGilación. Se desarrolló una nueva estrategia convergente para la pegilación de péptidos sintéticos que consiste en combinar, por medio de la formación de un enlace conjugado en disolución, un péptido y un grupo PEG cada uno de los cuales lleva una función especial que es mutuamente reactiva hacia la otra. Los péptidos precursores pueden ser fácilmente preparados con la síntesis convencional en fase sólida, como se describió anteriormente. Como se describe más adelante, estos péptidos son "preactivados" en un sitio específico con un grupo funcional apropiado. Los precursores son purificados y totalmente caracterizados antes de hacerlos reaccionar con el grupo PEG. La ligación del péptido con PEG tiene normalmente lugar en fase acuosa y puede ser fácilmente controlada mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos pegilados pueden ser fácilmente purificados mediante HPLC preparativa y caracterizados mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas con desorción por láser.

Preparación del péptido 19. Se disolvieron el péptido 17b (12 mg) y MeO-PEG-SH 5000 (30 mg, 2 equivalentes) en 1 ml de tampón acuoso (pH de 8). La mezcla fue incubada a temperatura ambiental durante aproximadamente 30 minutos y la reacción fue comprobada mediante HPLC analítica, la cual mostró una compleción de la reacción > 80 %. El material pegilado fue aislado mediante HPLC preparativa.

Preparación del péptido 20. Se disolvieron el péptido 18 (14 mg) y MeO-PEG-maleimida (25 mg) en aproximadamente 1,5 ml de tampón acuoso (pH de 8). La mezcla fue incubada a temperatura ambiental durante aproximadamente 30 minutos, momento en que se había completado una transformación de ~70 % según se comprobó por HPLC analítica al aplicar una parte alícuota de muestra a la columna de HPLC. El material pegilado fue purificado mediante HPLC preparativa.

Ensayo de bioactividad. El bioensayo *in vitro* de TPO es un ensayo mitogénico en que se utiliza un clon, dependiente de IL-3, de células 32D murinas que han sido trasfectadas con receptor mpl humano. Este ensayo se describe con mayor detalle en el Documento WO 95/26746. Las células son mantenidas en medio MEM que contiene Fetal Clone II al 10 % y 1 ng/ml de mIL-3. Antes de la adición de las muestras, se preparan las células enjuagándolas dos veces con medio de crecimiento que carece de mIL-3. Se prepara una curva estándar extendida de TPO de doce puntos, que varía de 3.333 a 39 pg/ml. Se preparan cuatro diluciones (1.000 a 125 pg/ml), de las que se estima que caen dentro de la porción lineal de la curva estándar, para cada muestra y se desarrollan por triplicado. Se añade un volumen de 100 µl de cada dilución de muestra o de patrón a los pocillos apropiados de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene 10.000 células/pocillo. Después de cuarenta y cuatro horas a 37°C y CO₂ al 10 %, se añade MTS (un compuesto de tetrazolio que es bioreducido por las células hasta un formazán) a cada pocillo. Aproximadamente seis horas más tarde, se lee la densidad óptica a 490 nm en un dispositivo lector de placas. Se genera una curva de dosis-respuesta (logaritmo de concentración de TPO frente a densidad óptica - valor de fondo) y se lleva cabo un análisis, por regresión lineal, de los puntos que caen en la porción lineal de la curva estándar. Las concentraciones de las muestras de ensayo desconocidas son determinadas usando la ecuación lineal resultante y una corrección para el factor de dilución.

Abreviaturas. HPLC (cromatografía de alta eficacia en fase líquida); ESI-MS (espectrometría de masas con ionización por electropulverización); MALDI-MS (espectrometría de masas con desorción/ionización por láser, asistida por matriz; del inglés, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry); PEG (polietilenglicol). Todos los aminoácidos se representan mediante los códigos estándares de tres letras o una sola letra. t-Boc: terc-

butoxicarbonilo; tBu: terc-butilo; Bzl: bencilo; DCC: dicitclohexilcarbodiimida; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; NMP: N-metil-2-pirrolidiona; Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofuran-5-sulfonilo; Trt: tritilo; Dde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo.

B. Resultados

5 Dímeros de TMP en tándem con conectores de poliglicocola. El diseño de dímeros de TMP unidos secuencialmente se basó en la suposición de que se requería una forma dímera de TMP para su interacción eficaz con c-Mpl (el receptor de TPO) y de que, dependiendo de cómo estuvieran enrolladas entre sí en el entorno del receptor, las dos moléculas de TMP podrían estar conjuntamente ligadas en la configuración de extremo C a N de un modo que no perturbara la conformación dímera global. Evidentemente, la actividad de los dímeros enlazados en tándem puede también depender de una apropiada selección de la longitud y la composición del conector que une los extremos C y N de los dos monómeros de TMP secuencialmente alineados. Puesto que no se disponía de información estructural sobre el TMP unido a c-Mpl, se sintetizó una serie de péptidos dímeros con conectores compuestos de 0 a 10 y 14 restos de glicocola (Tabla I). Se escogió la glicocola a causa de su sencillez y flexibilidad. Se razonó que una cadena peptídica flexible de poliglicocola podría permitir la plegadura libre, en la conformación requerida, de las dos repeticiones de TMP ligadas, mientras que secuencias de aminoácidos más estéricamente impedidas pueden adoptar estructuras secundarias indeseadas cuya rigidez podría alterar el correcto empaquetamiento del péptido dímero en el entorno del receptor.

Los péptidos resultantes son fácilmente asequibles mediante métodos convencionales de síntesis peptídica en fase sólida (R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* 85: 2.149 (1.963)] con química de Fmoc o de t-Boc. A diferencia de la síntesis del dímero en paralelo C-terminalmente enlazado (ID. SEC. nº 2) que requería el uso de un resto de lisina ortogonalmente protegido como punto de ramificación inicial para construir las dos cadenas peptídicas de un modo seudosimétrico [S. E. Cwirla et al., *Science* 276: 1.696-1.699 (1.997)], la síntesis de los presentes dímeros en tándem fue una ensambladura gradual y sencilla de las cadenas peptídicas continuas desde el extremo C al N. Puesto que la dimerización de TMP producía un efecto más drástico sobre la actividad proliferativa que sobre la afinidad de unión como se muestra para el dímero C-terminal [S. E. Cwirla et al., *Science* 276: 1.696-1.699 (1.997)], los péptidos sintéticos fueron analizados directamente en cuanto a su actividad biológica en un ensayo de proliferación celular dependiente de TPO usando un clon, dependiente de IL-3, de células 32D murinas trasfectadas con el c-Mpl de longitud completa [R. Palacios et al., *Cell* 41: 727 (1.985)]. Como mostraron los resultados del ensayo (véase más adelante la Tabla I), todos los dímeros en tándem enlazados por poliglicocola presentaron aumentos de potencia > 1.000 veces en comparación con el monómero y fueron aún más potentes que el dímero C-terminal en este ensayo de proliferación celular. La actividad absoluta del dímero C-terminal en el presente ensayo era menor que la de la proteína TPO nativa, lo que difiere de los hallazgos previamente comunicados según los cuales se había hallado que el dímero C-terminal era tan activo como el ligando natural [S. E. Cwirla et al., *Science* 276: 1.696-1.699 (1.997)]. Esto podría ser debido a diferencias en las condiciones usadas en los dos ensayos. No obstante, la diferencia de actividad entre los dímeros en tándem (extremo C del primer monómero enlazado al extremo N del segundo monómero) y los dímeros en paralelo (extremo C del primer monómero enlazado al extremo C del segundo monómero) en el mismo ensayo demostró claramente la superioridad del producto dimerizado en tándem en comparación con los productos dimerizados en paralelo. Es interesante advertir que una gran variedad de longitudes es tolerada por el conector. Al parecer, con los monómeros de TMP seleccionados (ID. SEC. nº 1), el conector óptimo está compuesto de 8 glicocolas.

Otros dímeros en tándem. Después de esta primera serie de dímeros de TMP en tándem, se diseñaron otras diversas moléculas con conectores diferentes o que contenían modificaciones en el propio monómero. La primera de estas moléculas, el péptido 13, tiene un conector compuesto de GPNG, una secuencia conocida por tener una elevada tendencia a formar una estructura secundaria de tipo giros β . Se halló que este péptido, aunque aún aproximadamente 100 veces más potente que el monómero, era > 10 veces menos activo que el compuesto análogo unido por GGGG. Por lo tanto, parecía que la introducción de un giro β relativamente rígido en la región del conector causaba una ligera distorsión de la conformación óptima del agonista en esta forma de conector corta.

El Trp9 de la secuencia de TMP es un resto muy conservado entre los péptidos activos aislados de bancos peptídicos aleatorios. También hay un Trp muy conservado en las secuencias de consenso de péptidos miméticos de EPO, y se halló que este resto de Trp está implicado en la formación de un núcleo hidrófobo entre los dos péptidos miméticos de EPO (EMPs) y contribuye a interacciones hidrófobas con el receptor de EPO [O. Livnah et al., *Science* 273: 464-471 (1.996)]. Por analogía, se pensó que el resto Trp9 del TMP podía tener una función similar en la dimerización del ligando peptídico y, en un intento de modular y estimar los efectos de las fuerzas hidrófobas no covalentes ejercidas por los dos anillos de indol, se construyeron varios compuestos análogos que resultaban de mutaciones en el Trp. De esta manera, en el péptido 14, el resto de Trp de cada uno de los dos monómeros de TMP fue sustituido por una Cys, y se formó por oxidación un enlace disulfuro intramolecular entre las dos cisteínas que fue concebido para mimetizar las interacciones hidrófobas entre los dos restos de Trp en la dimerización peptídica. El péptido 15 es la forma reducida del péptido 14. En el péptido 16, los dos restos de Trp fueron sustituidos por Ala. Como muestran los datos del ensayo, los tres compuestos análogos resultaron inactivos. Estos datos demostraron adicionalmente que el Trp es importante para la actividad del péptido mimético de TPO, no sólo para la formación del dímero.

5 Cada uno de los dos péptidos siguientes (péptidos 17a y 18) contiene un resto de Lys o Cys en su conector de 8 aminoácidos. Estos dos compuestos son precursores de los dos péptidos pegilados (péptidos 19 y 20) en que la cadena lateral de la Lys o Cys esta modificada por un grupo polietilenglicol (PEG). Se decidió introducir un grupo PEG en el centro de un conector relativamente largo para que el componente PEG grande (5 kDa) estuviera bastante alejado de los importantes sitios ligantes de la molécula peptídica. El PEG es un polímero biocompatible conocido que es utilizado cada vez más como un modificador covalente para mejorar los perfiles farmacocinéticos de compuestos terapéuticos basados en péptidos y proteínas.

10 Se ideó un método modular, basado en disolución, para la pegilación conveniente de péptidos sintéticos o recombinantes. El método se basa en la ahora bien establecida estrategia de ligación quimiosselectiva, en la que se utiliza la reacción específica entre un par de funciones mutuamente reactivas. De esta manera, para el péptido pegilado 19, la cadena lateral de la lisina fue preactivada con un grupo bromoacetilo para obtener el péptido 17b, para facilitar la reacción con un PEG derivatizado con tiol. Para hacer esto, se empleó un grupo protector ortogonal, Dde, para la protección de la ϵ -amina de la lisina. Una vez que se hubo ensamblado la cadena peptídica completa, la amina N-terminal fue vuelta a proteger con t-Boc. Luego se eliminó el Dde para permitir la bromoacetilación. Esta estrategia permitió obtener un péptido crudo de alta calidad que fue fácilmente purificado utilizando HPLC convencional en fase inversa. La ligación del péptido con el PEG modificado con tiol tuvo lugar en un tampón acuoso con un pH de 8, y la reacción se completó en 30 minutos. Un análisis, por MALDI-MS, del material pegilado purificado reveló un espectro característico con forma de campana, con un aumento de 44 Da entre los picos adyacentes. Para el péptido-PEG 20, se dispuso un resto de cisteína en la región conectora, y el grupo tiol de la cadena lateral de aquélla sirve como un punto de fijación para un PEG que contiene maleimida. Se utilizaron condiciones similares para la pegilación de este péptido. Como revelaron los datos del ensayo, estos dos péptidos pegilados tenían una bioactividad *in vitro* aún mayor en comparación con los correspondientes compuestos no pegilados.

15 El péptido 21 tiene un motivo potencial de glicosilación, NGS, en su conector de 8 aminoácidos. Puesto que los dímeros en tándem ejemplares están compuestos por aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos, la expresión de dicha molécula en un apropiado sistema celular eucariótico debería producir un glicopéptido con el grupo hidrato de carbono añadido a la carboxiamida de la cadena lateral de Asn. La glicosilación es un proceso común de modificación postraduccional que puede tener muchos efectos positivos sobre la actividad biológica de una proteína dada al aumentar su solubilidad acuosa y su estabilidad *in vivo*. Como muestran los datos del ensayo, la incorporación de este motivo de glicosilación al conector mantuvo la elevada bioactividad. En efecto, el precursor sintético del potencial glicopéptido tenía una actividad comparable a la del compuesto análogo unido por $-(\text{Gly})_8-$. Se espera que, una vez glicosilado, este péptido tenga el mismo orden de actividad que los péptidos pegilados a causa de las similares propiedades químicofísicas mostradas por un PEG y un grupo hidrato de carbono.

20 El último péptido es un dímero de un dímero. Se preparó oxidando el péptido 18, lo que formó un enlace disulfuro intermolecular entre los dos restos de cisteína situados en el conector. Este péptido fue diseñado para enfocar la posibilidad de que el TMP fuera activo como tetrámero. Los datos del ensayo mostraron que este péptido no era más activo que un dímero medio en tándem con respecto a una base molar ajustada, lo que apoya indirectamente la idea de que, en realidad, la forma activa del TMP es un dímero ya que, de lo contrario, la dimerización de un dímero en tándem tendría un impacto más sobre la bioactividad.

25 En la Tabla I siguiente se resumen las actividades relativas de los compuestos anteriormente descritos, en término de la IC_{50} basada en ensayos *in vitro* como los anteriormente descritos.

TABLA I

Compuesto	Potencia Relativa
(EC_{50})	4,0
TPO	4,0
Monómero de TMP (ID. SEC. nº 1)	1,0
Dímero C-C de TMP (ID. SEC. nº 2)	3,5
TMP-(Gly) _n -TMP:	
1 n = 0	4,5
2 n = 1	4,0
3 n = 2	4,0
4 n = 3	4,0
5 n = 4	4,0
6 n = 5	4,0

Compuesto	Potencia Relativa
7 n = 6	4,0
8 n = 7	4,0
9 n = 8	4,5
10 n = 9	4,0
11 n = 10	4,0
12 n = 14	4,0
13 TMP-GPNG-TMP (ID. SEC. nº 10)	3,0
14 IEGPTLRQ <u>CLAARA</u> -GGGGGGGG-IEGPTLRQ <u>CLAARA</u> <div style="text-align: center;"> (ID. SEC. nº 11) </div>	0,5
15 IEGPTLRQ <u>CLAARA</u> -GGGGGGGG-IEGPTLRQ <u>CLAARA</u> (ID. SEC. nº 12)	0,5
16 IEGPTLRQ <u>ALAARA</u> -GGGGGGGG-IEGPTLRQ <u>ALAARA</u> (ID. SEC. nº 13)	0,5
17a TMP-GGGKGGGG-TMP (ID. SEC. nº 14)	4,0
17b TMP-GGGK(BrAc)GGGG-TMP (ID. SEC. nº 15)	ND
18 TMP-GGGCGGGG-TMP (ID. SEC. nº 16)	4,0
19 TMP-GGGK(PEG)GGGG-TMP (ID. SEC. nº 17)	5,0
20 TMP-GGGC(PEG)GGGG-TMP (ID. SEC. nº 18)	5,0
21 TMP-GGGNGSGG-TMP (ID. SEC. nº 19)	4,0
22 TMP-GGGCGGGG-TMP (ID. SEC. nº 20)	4,0
 TMP-GGGCGGGG-TMP	

NOTA: En la Tabla I, los números indican aproximadamente el logaritmo de la actividad, por lo que la diferencia de actividad entre "1" y "4" es aproximadamente 1.000 veces. Un incremento de 0,5 es un punto intermedio, por lo que la diferencia de actividad entre "1" y "3,5" es aproximadamente 500 veces. "ND" significa "no determinado".

II. A continuación se exponen métodos ejemplares para preparar algunos de los compuestos del segundo grupo aquí descrito.

A. Preparación de un compuesto de fusión de Fc, del tipo mostrado en la Figura 6C

5 Una secuencia de DNA que codifica la región Fc de IgG1 humana fusionada en marco con un dímero del péptido mimético de TPO (ID. SEC. nº 34) fue puesta bajo el control del promotor luxPR en el vector de expresión plasmídico pAMG21, del modo siguiente.

El gen de fusión fue construido usando tecnología de PCR estándar. Los moldes para las reacciones PCR fueron el vector de fusión que contiene la secuencia de Fc y un gen sintético que codifica el resto del compuesto de ID. SEC. nº 34. El gen sintético fue construido a partir de los 4 oligonucleótidos solapantes mostrados a continuación:

10	1830-52	AAA GGT GGA GGT GGT GGT ATC GAA GGT CCG ACT CTG CGT CAG TGG CTG GCT GCT CGT GCT (ID. SEC. nº 35)
	1830-53	ACC TCC ACC ACC AGC ACG AGC AGC CAG CCA CTG ACG CAG AGT CGG ACC (ID. SEC. nº 36)
15	1830-54	GGT GGT GGA GGT GGC GGC GGA GGT ATT GAG GGC CCA ACC CTT CGC CAA TGG CTT GCA GCA CGC GCA (ID. SEC. nº 37)

ES 2 422 231 T3

1830-55 AAA AAA AGG ATC CTC GAG ATT ATG CGC GTG CTG
 CAA GCC ATT GGC GAA GGG TTG GGC CCT CAA TAC
 CTC CGC CGC C

(ID. SEC. nº 38)

- 5 Los 4 oligonucleótidos fueron sometidos a hibridación de extremos complementarios para formar el dúplex mostrado a continuación:

```

AAAGGTGGAGGTGGTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCT
1-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
                                CCAGGCTGAGACGCAGTCACCGACCGACGAGCACGA
  K G G G G G I E G P T L R Q W L A A R A

GGTGGTGGAGGTGGCGGCGGAGGTATTGAGGGCCCAACCCCTTCGCCAATGGCTTGCAGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCACCACCTCCACCGCCGCTCCATAACTCCCGGGTTGGGAAGCGGTTACCGAACGTCGT
  G G G G G G G I E G P T L R Q W L A A

CGCGCA
-----148
GCGCGTATTAGAGCTCCTAGGAAAAAAA

  R A *
```

ID. SEC. nº 39 [oligonucleótidos colineales 1830-52 y 1830-54]

ID. SEC. nº 40 [oligonucleótidos colineales 1830-53 y 1830-55] e

- 10 ID. SEC. nº 41 [la secuencia de aminoácidos codificada]

Este dúplex fue multiplicado en una reacción PCR usando 1830-52 y 1830-55 como cebadores sentido y antisentido.

La porción Fc de la molécula fue generada en una reacción PCR con DNA de Fc usando los cebadores:

1216-52 AAC ATA AGT ACC TGT AGG ATC G (ID. SEC. nº 42)

- 15 1830-51 TTCGATACCACCACCTCCACCTTTACCCGGAG-
 ACAGGGAGAGGCTCTTCTGC (ID. SEC. nº 43)

Los oligonucleótidos 1830-51 y 1830-52 contienen un solapamiento de 24 nucleótidos, lo que permite que los dos genes se fusionen entre sí en el marco de lectura correcto al combinarse los anteriores productos de PCR en una tercera reacción usando los cebadores externos, 1216-52 y 1830-55.

- 20 El producto génico final de PCR (el gen de fusión de longitud completa) fue sometido a digestión con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Bam*HI y fue luego ligado en el vector pAMG21 (véase más adelante), también sometido a digestión con *Xba*I y *Bam*HI. Se transformaron células huésped competentes de la cepa 2596 de *E. coli* (GM221, descrita más adelante) con el DNA ligado. Los clones fueron explorados en cuanto a la capacidad para producir el producto proteico recombinante y para poseer la fusión génica que tiene la secuencia de nucleótidos correcta. Los niveles de expresión de proteína se determinaron mediante estudios en matraces de 50 ml de capacidad, con sacudimiento. Se analizaron lisados de células completas en cuanto a la expresión de la fusión, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE; del inglés, polyacrylamide gel electrophoresis) y tinción con Coomassie.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión se muestra debajo de la correspondiente secuencia de nucleótidos:

XbaI
 |
 1 TCTAGATTTGTTTTAACTAATTAAGGAGGAATAACATATGGACAAAACCTCACACATGTC 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGATCTAAACAAAATTGATTAATTCCTCCTTATTGTATACCTGTTTTGAGTGTGTACAG
 M D K T H T C P

61 CACCTTGTCCAGCTCCGGAACCTCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGAACAGGTCGAGGCCTTGAGGACCCCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTTG
 P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P

121 CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTTGA 180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTTCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTGTACGCACCACCACCTGCACT
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S

181 GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCAGTATTAC
 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A

241 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCA 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTTCTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCTGTCATGGCACACCAGTCGCAGGAGT
 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T

301 CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAG 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGCAGGACGTGGTCCCTGACCGACTTACCGTTCCTCATGTTACGTTCCAGAGGTTGTTTC
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A

```

361  CCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC 420
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      GGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTGGTG
      L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q

      AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      TCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCTTGGTCCAGTCGGACTGGA
      V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C

      GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCG
      L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P

      CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      GCCTCTTGTGTGATGTTCTGCTGCGGAGGGCACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGA
      E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y

      ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCG
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
      TGTCGTTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCCTTGCAGAAGGTACGAGGC
      S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V

      TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
      ACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGTGATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCAT
      M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

      AAGGTGGAGGTGGTGGTATCGAAGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTG
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
      TTCCACCTCCACCACCATAGCTTCCAGGCTGAGACGCAGTCACCGACCGACGAGCACGAC
      G G G G G I E G P T L R Q W L A A R A G

      GTGGTGGAGGTGGCGCGGAGGTATTGAGGGCCCAACCTTCGCCAATGGCTTGCAGCAC
781  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
      CACCACCTCCACCGCCGCTCCATAACTCCCGGGTTGGGAAGCGGTTACCGAACGTCGTG
      G G G G G G G I E G P T L R Q W L A A R
  
```

BamHI

```

      |
      GCGCATAATCTCGAGGATCCG
841  -----+-----+-----+-----+-----+ 861
      CGCGTATTAGAGCTCCTAGGC
      A
  
```

ID. SEC. nº 44 [cadena sencilla que se lee 5' → 3'],

ID. SEC. nº 45 [cadena sencilla que se lee 3' → 5'] e

ID. SEC. nº 46 [secuencia de aminoácidos codificada]

5 pAMG21

El plásmido de expresión pAMG21 es obtenible del ATCC bajo el número de acceso 98113, donde fue depositado el 24 de Julio de 1.996.

GM221 (cepa huésped nº 2596 de Amgen)

10 La cepa huésped nº 2596 de Amgen es una cepa de *E. coli* K-12 que ha sido modificada para que contenga tanto el represor lambda cl857s7, sensible a la temperatura, en la región *ebg* precoz como el represor lacI^Q en la región *ebg* tardía (68 minutos). La presencia de estos dos genes represores permite el uso de este huésped con una diversidad de sistemas de expresión; sin embargo, ambos represores son irrelevantes para la expresión a partir de luxP_R . El

huésped no transformado no presenta resistencias a antibióticos.

El sitio de unión al ribosoma (RBS; del inglés, *ribosome binding site*) del gen *cl857s7* ha sido modificado para que incluya un RBS potenciado. Se ha insertado en el operón *ebg* entre las posiciones nucleotídicas 1.170 y 1.411 según se numera en el número de acceso M64441Gb_Ba de Genbank con delección de la secuencia *ebg* intrónica.

- 5 La construcción fue suministrada al cromosoma usando un fago recombinante llamado MMebg-cl857s7 RBS potenciado #4 en F'tet/393. Después de recombinación y resolución, sólo queda en la célula el inserto cromosómico anteriormente descrito. Recibió el nuevo nombre de F'tet/GM101.

10 F'tet/GM101 fue luego modificado mediante el suministro de una construcción lacI^Q en el operón *ebg* entre las posiciones nucleotídicas 2.493 y 2.937 según se numera en el número de acceso M64441Gb_Ba de Genbank con la delección de la secuencia *ebg* intrónica.

15 La construcción fue suministrada al cromosoma usando un fago recombinante llamado AGebg-LacIQ#5 en F'tet/GM101. Después de recombinación y resolución, sólo queda en la célula el inserto cromosómico anteriormente descrito. Recibió el nuevo nombre de F'tet/GM221. El episoma F'tet fue curado de la cepa usando naranja de acridina en una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ en LB. La cepa curada fue identificada como sensible a tetraciclina y fue guardada como GM221.

La construcción de fusión de Fc contenida en el plásmido pAMG21 (a la que aquí se hace referencia como pAMG21-Fc-TMP-TMP), que, a su vez, está contenido en la cepa huésped GM221, ha sido depositada en la ATCC bajo el número de acceso 98957, con una fecha de depósito de 22 de Octubre de 1.998.

20 Expresión. Cultivos de pAMG21-Fc-TMP-TMP en *E. coli* GM221 en medio Caldo Luria que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina fueron incubados a 37°C antes de la inducción. Se llevó a cabo la inducción de la expresión del producto génico Fc-TMP-TMP a partir del promotor *luxPR* después de la adición del autoinductor sintético N-(3-oxohexanoil)-DL-homoserina-lactona a los medios de cultivo hasta una concentración final de 20 ng/ml, y se incubaron los cultivos a 37°C durante 3 horas más. Después de 3 horas, los cultivos bacterianos fueron examinados por microscopía en cuanto a la presencia de cuerpos de inclusión y fueron luego recogidos por centrifugación. Se observaron cuerpos de inclusión refractivos en los cultivos inducidos, lo que indicaba que el Fc-TMP-TMP era muy probablemente producido en la fracción insoluble de *E. coli*. Los sedimentos celulares de la centrifugación fueron lisados directamente mediante resuspensión en tampón para muestras de Laemmli que contenía β -mercaptoetanol al 10 % y fueron analizados por PAGE con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE; del inglés, *sodium dodecyl sulfate*-PAGE). En un gel de SDS-PAGE se observó una banda intensa teñida con Coomassie, de aproximadamente 30 kDa. El producto génico esperado tendría una longitud de 269 aminoácidos y un peso molecular esperado de aproximadamente 29,5 kDa. La fermentación fue llevada también a cabo bajo condiciones discontinuas estándares a escala de 10 l, resultando unos niveles de expresión del Fc-TMP-TMP similares a los obtenidos a escala de laboratorio analítico.

35 Purificación de Fc-TMP-TMP. Las células fueron desechas en agua (1/10) mediante homogeneización a alta presión (2 pasadas a 96,527 MPa), y los cuerpos de inclusión fue recolectados por centrifugación (4.200 rpm en J-6B durante 1 hora). Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en guanidina 6 M, Tris 50 mM, DTT 8 mM, pH de 8,7, durante 1 hora en una relación 1/10. La mezcla solubilizada fue diluida 20 veces en urea 2 M, Tris 50 mM, arginina 160 mM, cisteína 3 mM, pH de 8,5. La mezcla fue agitada en frío durante la noche. En este punto del procedimiento, las subunidades monómeras de Fc-TMP-TMP se dimerizan para formar el compuesto unido por disulfuro, que tiene la estructura mostrada en la Figura 6C y es luego concentrado aproximadamente 10 veces por ultrafiltración. Luego fue diluido 3 veces con Tris 10 mM, urea 1,5 M, pH de 9. El pH de esta mezcla fue luego ajustado a 5 con ácido acético. El precipitado fue separado por centrifugación y el sobrenadante fue cargado en una columna de SP-Sepharose Fast Flow equilibrada en NaAc 20 mM, NaCl 100 mM, pH de 5 (10 mg/ml de carga proteica; temperatura ambiental). La proteína fue separada por elución usando un gradiente, de 20 volúmenes de columna del mismo tampón, que variaba de NaCl 100 mM a NaCl 500 mM. La cantidad reunida de la columna fue diluida 3 veces y fue cargada en una columna de SP-Sepharose HP en NaAc 20 mM, NaCl 150 mM, pH de 5 (10 mg/ml de carga proteica; temperatura ambiental). La proteína fue separada por elución usando un gradiente, de 20 volúmenes de columna del mismo tampón, que variaba de NaCl 150 mM a NaCl 400 mM. El pico fue reunido y filtrado.

III. Lo siguiente es un resumen de datos *in vivo* en ratones con diversos compuestos de este invento.

50 Ratones. Hembras BDF1 normales, de aproximadamente 10-12 semanas de edad.

Programa de sangrías. Se trataron diez ratones por grupo el día 0; dos grupos comenzaron separados por 4 días para un total de 20 ratones por grupo. Se sangraron cinco ratones en cada punto temporal; los ratones fueron sangrados un mínimo de tres veces a la semana. Se anestesiaron los ratones con isoflurano y se obtuvo un volumen total de 140-160 μl de sangre por punción del seno orbital. El recuento sanguíneo se realizó en un analizador sanguíneo Technicon H1E que llevaba cargado el software para sangre murina. Los parámetros medidos fueron: glóbulos blancos, glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, plaquetas y neutrófilos.

Tratamientos. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas para un tratamiento por bolo, o implantes de bombas

microsmóticas de 7 días para suministro continuo. Las inyecciones subcutáneas se suministraron en un volumen de 0,2 ml. Las bombas osmóticas fueron insertadas en una incisión subcutánea realizada en la piel, entre las escápulas de los ratones anestesiados. Los compuestos fueron diluidos en disolución salina tamponada con fosfato, con albúmina sérica bovina al 0,1 %. Todos los experimentos incluían un grupo testigo, etiquetado "vehículo", que sólo fue tratado con este agente diluyente. La concentración de los artículos de ensayo en las bombas fue ajustada para que el caudal calibrado de las bombas proporcionara los niveles de tratamiento indicados en los gráficos.

Compuestos. Una titulación de dosis del compuesto fue suministrada a los ratones en las bombas microsmóticas de 7 días. Los ratones fueron tratados con una sola dosis de 100 µg/kg de diversos compuestos en las bombas osmóticas de 7 días. Algunos de los mismos compuestos fueron luego administrados a ratones como una sola inyección en bolo.

Resultados del ensayo de actividad. Los resultados de los experimentos de actividad se muestran en las Figuras 4 y 5. En los ensayos de dosis-respuesta usando bombas microsmóticas de 7 días (datos no mostrados), el máximo efecto que se vio con el compuesto de ID. SEC. nº 18 fue con 100 µg/kg/día; la dosis de 10 µg/kg/día produjo aproximadamente el 50 % de la actividad máxima, y 1 µg/kg/día fue la dosis mínima con la que pudo verse actividad en este sistema de ensayo. El compuesto en una dosis de 10 µg/kg/día tuvo una actividad aproximadamente igual que el rHu-MGDF no pegilado en una dosis de 100 µg/kg/día en el mismo experimento.

IV. Discusión

Es bien aceptado que el MGDF actúa de un modo similar a la hormona de crecimiento humana (hGH); es decir, una molécula del ligando proteico se une a dos moléculas del receptor para su activación [J. A. Wells et al., Ann. Rev. Biochem. 65: 609-634 (1.996)]. Esta interacción es mimetizada por la acción del péptido TMP mucho más pequeño. Sin embargo, los presentes estudios sugieren que este mimetismo requiere la acción concertada de dos moléculas de TMP ya que la dimerización covalente de TMP de un modo paralelo C-C o secuencial C-N aumentaba la potencia biológica *in vitro* del monómero original por un factor superior a 10^3 . La biopotencia relativamente baja del monómero se debe probablemente a una formación ineficaz del dímero no covalente. Un dímero covalente preformado tiene la capacidad de eliminar la barrera entrópica para la formación de un dímero no covalente, que es exclusivamente conducida por interacciones no covalentes débiles entre dos moléculas del pequeño péptido de 14 restos.

Es interesante advertir que la mayor parte de los dímeros en tándem son más potentes que los dímeros C-terminales en paralelo. Parece que la dimerización en tándem proporciona a la molécula una conformación de mejor ajuste que la dimerización C-C en paralelo. La característica aparentemente asimétrica de un dímero en tándem podría haberlo acercado más al ligando natural que, como una molécula asimétrica, utiliza dos sitios diferentes para unirse a dos moléculas receptoras idénticas.

La introducción del grupo PEG fue ideada para potenciar la actividad *in vivo* del péptido modificado, al proporcionarle una protección contra la degradación proteolítica y al lentificar su aclaramiento por filtración renal. Resultó inesperado que la pegilación pudiera aumentar más la bioactividad *in vitro* de un péptido TMP dimerizado en tándem en el ensayo de proliferación basado en células.

V. Lo siguiente es un resumen de datos *in vivo* en monos con diversos compuestos de este invento.

Con objeto de evaluar en hembras de mono rhesus los parámetros hematológicos asociados con la administración de TMP mediante administración subcutánea, se diseñó y llevó a cabo el protocolo siguiente. Se juntaron cinco grupos de tres monos cada uno. El Grupo 1 sirvió como testigo y recibió tampón de acetato (acetato sódico 20 mM, cloruro sódico 0,25 M, pH de 5) que no contenía TMP ni MGDF humano recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF). El Grupo 2 recibió una o más administraciones de TMP en los intervalos indicados más adelante; el Grupo 3 recibió 1.000 µg/kg de TMP en los intervalos indicados más adelante; el Grupo 4 recibió 5.000 µg/kg de TMP en los intervalos indicados más adelante; y el Grupo 5 recibió 100 µg/kg de PEG-rHuMGDF en los intervalos indicados más adelante.

El día en que se administró la primera dosis única fue denominado Día 0 del Ciclo 1. En el Ciclo 2, las dosis se administraron los Días 21, 23, 25, 28, 30 y 32. Durante el Ciclo 3, se administró una sola dosis el Día 84, y, en el Ciclo 4, se administró una sola dosis el Día 123. Se observaron los signos clínicos en los animales una vez al día durante el periodo de aclimatación, tres veces al día (antes de la administración, de inmediatamente a 30 minutos después de la administración, y de dos a tres horas después de la administración) en los días de administración y una vez al día en los días sin administración. Se calculó diariamente el consumo de alimento basándose en el número de trozos de alimento suministrados y en el número que dejó cada animal, desde 7 días antes del inicio del periodo de administración hasta el final del periodo de recuperación. El peso corporal de cada animal fue medido dos veces antes del régimen de administración y dos veces durante los periodos de administración y recuperación. Se prepararon muestras de sangre para hematología una vez antes del inicio de la administración y una vez los Días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 22, 24, 26, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 55, 62, 69, 76, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 111, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144 y 150. Para el análisis farmacocinético, se recogieron muestras de suero de 0,5 ml una vez antes de la administración y una vez a las 1, 4 y 24 horas después de la administración. Se recogieron muestras los Días 0, 21, 32, 84 y 123 y se almacenaron a

aproximadamente -70°C hasta su análisis. Para el análisis de anticuerpos, se recogieron muestras de sangre de 2 ml una semana antes de la dosis única y una vez los Días 0 (antes de la administración), 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83, 90, 97, 104, 111, 118, 129, 136, 143 y 150. Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

5 Los resultados indicaron que los valores de plaquetas aumentaron en todos los grupos tratados, viéndose los mayores aumentos en los grupos de PEG-rHuMGDF y de alta dosis de TMP. En el Ciclo 1, los valores máximos de plaquetas aumentaron aproximadamente 3,3 veces y 3,1 veces en el grupo de PEG-rHuMGDF (Día 9) y en el grupo de 5.000 µg/kg de TMP (Día 9), respectivamente, en comparación con la cuenta media de plaquetas en el grupo testigo. Los valores de plaquetas del grupo de baja dosis de TMP aumentaron aproximadamente 1,5 veces con respecto a los del testigo en los mismos días de estudio especificados. Se advirtieron respuestas similares en todos los demás ciclos.

10 Sin embargo, en el Ciclo 4, el grupo de PEG-rHuMGDF no presentó una cuenta aumentada de plaquetas tan grande como en los ciclos previos. El grupo de PEG-rHuMGDF presenta unas cuentas aumentadas de plaquetas de aproximadamente 2 veces con respecto al grupo testigo 9 días después de la dosis de este ciclo. Por comparación, en el Ciclo 4, la cuenta media de plaquetas en el grupo de TMP de dosis máxima era 3,3 veces mayor que en el grupo testigo. Además, los animales del grupo de PEG-rHuMGDF tenían una cuenta media de plaquetas 53 % menor que la cuenta media de plaquetas del grupo testigo al inicio del Ciclo 4 (por dosis), y la cuenta media de plaquetas del grupo al final del Ciclo 4 (27 días después de la dosis) era 79 % menor que la cuenta del grupo testigo. Para todo los animales de los grupos de TMP, las cuentas medias de plaquetas al inicio y fin del Ciclo 4 eran ±15 % de la cuenta de plaquetas en el grupo testigo.

15 En los Ciclos 1 y 2, se advirtió una tendencia hacia una disminución de las cuentas de glóbulos rojos (RBC; del inglés, *red blood cell*) en todos los grupos tratados en comparación con el testigo. La disminución fue muy evidente los Días 41 a 43, y la mayor disminución de RBC se advirtió en el grupo de PEG-rHuMGDF. Lo más pronto que las cuentas comenzaron a volver a los niveles normales (en comparación con el testigo) fue el Día 47. Los niveles de glóbulos blancos (WBC; del inglés, *white blood cell*) durante los Ciclos 1 y 2 estaban drásticamente aumentados (2,6 veces) en comparación con los del testigo el Día 35. Se advirtió un ligero aumento en el grupo de 5.000 µg/kg de TMP el Día 33. El Día 37 los valores comenzaron a dirigirse hacia los niveles normales (testigo). Una respuesta similar se vio en el Ciclo 3, sin cambio aparente en los WBC en el Ciclo 4 en ninguno de los grupos tratados.

20 Durante el Ciclo 3, las cuentas de RBC estaban ligeramente disminuidas el Día 13 (después de la dosis única del Ciclo 3) en todos los grupos tratados salvo en el grupo de 500 µg/kg de TMP. Los valores de RBC comenzaron a volver a los niveles normales (en comparación con el testigo) el Día 17.

25 En el Ciclo 4, las cuentas de RBC disminuyeron en todos los grupos tratados en comparación con el testigo salvo en el grupo de 500 µg/kg de TMP. A diferencia de los otros ciclos, hubo más de un nadir presente en este ciclo. Estas disminuciones aparecieron del Día 1 al 9 después de la dosis y lo más pronto que comenzaron las recuperaciones fue el Día 11.

30 Los resultados indicaban que podía detectarse un aumento de las cuentas de plaquetas, por encima de las cuentas de los animales testigo, de 7 a 9 días después de la administración en todos los animales tratados y en todos los ciclos analizados. Parecía que la fase de dosis repetidas causaba una mayor respuesta en la producción de plaquetas en comparación con las fases de dosis única. En el Ciclo 4, la respuesta de plaquetas obtenida en el grupo de PEG-rHuMGDF era menor en comparación con la de los ciclos previos y en comparación con la respuesta del grupo de dosis elevada de TMP. Se advirtieron disminuciones en las cuentas de RBC en los Ciclos 1, 2, 3 y 4 en la mayoría de los grupos tratados en algún punto durante cada ciclo del estudio; sin embargo, todos los parámetros hematológicos volvieron a los niveles normales (en comparación con el testigo) una vez cesada la administración.

35 En conjunto, estos resultados indicaban que el tratamiento con TMP era bien tolerado por los monos rhesus y que el TMP daba lugar a cuentas aumentadas de plaquetas después de varios ciclos de tratamiento. No parecía que hubiera, basándose en los resultados de las cuentas de plaquetas, una respuesta biológicamente significativa al TMP mediada por el sistema inmune. Por contraste, el tratamiento con PEG-rHuMGDF en los diversos ciclos mostró una inhibición de la respuesta de plaquetas en el Ciclo 4, lo que sugiere que se han generado anticuerpos hacia PEG-rHuMGDF y que estos anticuerpos anti-MGDF pueden reaccionar cruzadamente con la TPO endógena del rhesus.

ES 2 422 231 T3

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgt ccagctccgg aactcctggg gggaccgtca 60
gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccttgaggtc 120
acatgctgtg tggtagcgtg gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaactctt tctcatgtct cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa 684

```

<210> 4

<211> 684

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 4

```

tacctgtttt gagtgtgtac aggtggaaca ggtcagaggcc ttgaggacc cctggcagt 60
cagaaggaga aggggggttt tgggttctctg tgggagtact agagggcctg gggactccag 120
tgtacgcacc accacctgca ctcggtgctt ctgggactcc agttcaagtt gaccatgcac 180
ctgccgcacc tccacgtatt acggttctgt ttcggcgccc tctctgcat gttgtcgtgc 240
atggcacacc agtcgcagga gtggcaggac gtggctctga ccgacttacc gttcctcatg 300
ttcacgttcc agaggttgtt tccggagggt cgggggtagc tcttttggtg gaggttccgg 360
tttcccgtcg gggctcttgg tgtccacatg tgggacgggg gtagggcctt actcgactgg 420
ttcttggtcc agtcggactg gacggaccag tttccgaaga tagggctcgt gtagcggcac 480
ctcacctctc cgttaccctg cggcctcttg ttgatgttct ggtgcggagg gcacgacctg 540
aggctgccga ggaagaagga gatgtcgttc gagtggcacc tgttctcgtc caccgtcgtc 600
cccttgacga agagtacgag gcactacgta ctccgagacg tgttggtgat gtgcgtcttc 660
tcggagaggg acagaggccc attt 684

```

10 <210> 5

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 5

```

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
  1           5           10           15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          20           25           30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
          35           40           45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
  50           55           60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
  65           70           75           80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

```


				85					90					95			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		
			100					105					110				
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
		115					120					125					
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
	130					135					140						
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
145					150					155					160		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
				165					170						175		
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr		
			180					185					190				
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
		195					200					205					
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
	210					215					220						

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 6

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

10 <210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 7

Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 8

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 8

Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 9

Gly Pro Asn Gly

1

10 <210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 10

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Pro
1 5 10 15

Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
20 25 30

<210> 11

<211> 36

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<220>

25 <223> Péptido cíclico; la estructura secundaria es mantenida por un enlace disulfuro entre restos de Cys intramoleculares en las posiciones 9 y 31

<400> 11

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 12

30 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

35 <400> 12

ES 2 422 231 T3

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Arg Leu Gln Cys Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 13

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 13

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

10 <210> 14

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 14

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 15

<211> 36

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> El resto de Lys de la posición 18 está bromoacetilado

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido derivatizado

<400> 15

ES 2 422 231 T3

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

- <210> 16
- <211> 36
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido
 <400> 16

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

- 10 <210> 17
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 15 <223> La Lys de la posición 18 está pegilada
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido derivatizado
- <400> 17

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

- 20 <210> 18
- <211> 36
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 25 <223> La Cys de la posición 18 está pegilada
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido derivatizado
- <400> 18

ES 2 422 231 T3

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 19

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 19

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asn Gly Ser Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

10 <210> 20

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Subunidad monómera de un homodímero; las subunidades del homodímero están enlazadas por un enlace disulfuro entre restos de Cys de la posición 18 de cada subunidad

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 20

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

20 <210> 21

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 21

ES 2 422 231 T3

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> El péptido está derivatizado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica covalentemente enlazada
 <220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido
 <400> 22

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 20 25 30

<210> 23
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> El péptido está covalentemente enlazado en los extremos amínico y carboxílico con una región Fc inmunoglobulínica
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido
 <400> 23

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 20 25 30

<210> 24
 <211> 36
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo carboxílico con una región Fc inmunoglobulínica
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido
 <400> 24

ES 2 422 231 T3

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

10 <400> 25

Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Gly Pro Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala
 20 25 30

Arg Ala

<210> 26

<211> 36

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

20 <400> 26

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 27

<211> 36

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

30 <223> Péptido cíclico; la estructura secundaria es mantenida por una unión disulfuro entre restos de Cys intramoleculares en las posiciones 9 y 31

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

ES 2 422 231 T3

<400> 27

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 28

<211> 36

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 28

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 29

<211> 36

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<220>

20 <223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<400> 29

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 30

<211> 36

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

ES 2 422 231 T3

<400> 30

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 31

<211> 36

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 31

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 32

15 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<220>

20 <223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<400> 32

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Asn Gly Ser Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 33

25 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<220>

30 <223> El péptido es una subunidad de un homodímero: las subunidades del homodímero están covalentemente

ES 2 422 231 T3

enlazadas por medio de un enlace disulfuro entre restos de Cys de la posición 18 de cada unidad

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<400> 33

Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

5

<210> 34

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<220>

<223> El péptido está covalentemente enlazado en el extremo amínico con una región Fc inmunoglobulínica

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr
 20 25 30

Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 35 40

15

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 35

aaaggtggag gtggtggtat cgaaggtccg actctgcgtc agtggctggc tgctcgtgct 60

25

<210> 36

<211> 48

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30

<400> 36

acctccacca ccagcacgag cagccagcca ctgacgcaga gtcggacc

48

<210> 37

<211> 66

<212> DNA

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 37

ggtaggtggag gtggcggcgg aggtattgag ggccaaccc ttcgccaatg gcttgagca 60
cgcgca 66

5 <210> 38
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 38

aaaaaaagga tcctcgagat tatgcgctg ctgcaagcca ttggcgaagg gttgggcct 60
caatacctcc gccgcc 76

15 <210> 39
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 39

20 **aaaggtggag gtggtggtat cgaaggccg actctgcgct agtggctggc tgctcgtgct 60**
ggtaggtggag gtggcggcgg aggtattgag ggccaaccc ttcgccaatg gcttgagca 120
cgcgca 126

<210> 40
 <211> 124
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 40

ccaggctgag acgcagtcac cgaccgacga gcacgaccac cacctccacc gccgcctcca 60
taactcccgg gttgggaagc ggttaccgaa cgctcgtcgc gtattagagc tcctagaaa 120
aaaa 124

30 <210> 41
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

35 <400> 41

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro
20 25 30

Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
35 40

- <210> 42
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
- <400> 42
- aacataagta cctgtaggat cg** 22
- <210> 43
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
- <400> 43
- ttcgatacca ccacctccac ctttaccggg agacagggag aggctcttct gc** 52
- <210> 44
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
- <400> 44
- tctagatttg ttttaactaa ttaaaggagg aataacatat ggacaaaact cacacatgtc 60**
cacctgttcc agctccggaa ctcttggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac 120
ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga 180
gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 240
ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 360
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 420
aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 480
gcctggtcaa aggcttctat cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 540
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggtccc ttcttctctt 600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 660
tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 720
aagtgaggag tgggtggtatc gaaggtccga ctctgcgtca gtggctggct gctcgtgctg 780
gtggtgagg tggcggcgga ggtattgagg gcccaaccct tcgccaatgg cttgcagcac 840
gcgcataatc tcgaggatcc g 861
- 25 <210> 45
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
- 30 <400> 45

ES 2 422 231 T3

```
agatcctaac aaaattgatt aatttcctcc ttattgtata cctgttttga gtgtgtacag 60
gtggaacagg tcgaggcctt gaggaccccc ctggcagtca gaaggagaag gggggttttg 120
ggttcctgtg ggagtactag agggcctggg gactccagtg tacgcaccac cacctgcact 180
cgggtgcttct gggactccag ttcaagttga ccatgcacct gccgcacctc cacgtattac 240
ggttctgttt cggcgccttc ctctcatgtg tgctctgcat ggcacaccag tccgaggagt 300
ggcaggacgt ggtcctgacc gacttaccgt tcctcatggt cacgttccag aggttgtttc 360
gggaggggtcg ggggtagctc ttttggtaga ggtttcgggt tcccgtcggg gctcttgggtg 420
tccacatgtg ggacgggggt agggccctac tcgactgggt cttgggtccag tcggactgga 480
cggaccagtt tccgaagata gggtcgctgt agcggcacct caccctctcg ttaccctcgc 540
gcctcttgtt gatgttctgg tgcggagggc acgacctgag gctgccgagg aagaaggaga 600
tgtctgttca gtggcacctg ttctctgcca ccgtctgccc cttgcagaag agtacgaggc 660
actacgtact ccgagacgtg ttggatgatg gcgtcttctc ggagagggac agaggcccat 720
ttccacctcc accaccatag cttccaggct gagacgcagt caccgaccga cgagcacgac 780
caccacctcc accgccgctc ccataactcc cgggttggga agcggttacc gaacgtcgtg 840
cgcgtattag agctcctagg c 861
```

<210> 46

<211> 269

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido

<400> 46

ES 2 422 231 T3

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg
225 230 235 240

Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile
245 250 255

Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
260 265

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que se une a un receptor mpl que comprende la estructura
 $TMP_1-(L_1)_n-TMP_2$,
 donde el extremo C del péptido TMP_1 está conectado al extremo C del péptido TMP_2 , mediante L_1 , y
- 5 donde TMP_1 y TMP_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que compuestos nucleares que comprende la estructura seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) $X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$,
 donde
 X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Lys, y Val;
- 10 X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;
 X_4 es Pro;
 X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;
 X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;
 X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;
- 15 X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;
 X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;
 X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;
- (b) $X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$,
 donde
- 20 X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;
 X_3 es Ala;
 X_4 es Pro;
 X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr and Ser;
 X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;
- 25 X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;
 X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;
 X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;
 X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;
- (c) $X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$,
- 30 donde
 X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;
 X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;
 X_4 es Pro;
 X_5 es Ser;
- 35 X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;
 X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;
 X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

(d) X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} ,

donde

5 X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

X_6 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Val, Ala, y Phe;

10 X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

(e) X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} ,

15 donde

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

20 X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;

X_7 es Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

25 (f) X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} ,

donde

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

30 X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;

X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln y Asn;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;

35 X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

(g) X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} ,

donde

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

5 X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;

X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Tyr, Cys, Ala, y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

10 y

(h) $X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$,

donde

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

15 X_4 es Pro;

X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, y Phe;

X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

20 X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr, Cys, Ala, y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Val, Ala, Phe, Met, y Lys;

y donde L_1 es un conector; y n es 0 ó 1;

y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

25 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichos TMP_1 y TMP_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en:

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$;

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$;

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}$;

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$;

30 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$;

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$;

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$;

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}$; y

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$,

35 donde $X_2 - X_{10}$ son como se ha definido y X_1 y $X_{11} - X_{14}$ se seleccionan del grupo que consiste en:

(a) X_1 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser, y Arg;

X_{11} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, y Glu;

- X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser, y Gln;
- X_{13} se selecciona del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, y Gly; y
- X_{14} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu, y Gly;
- (b) X_1 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser, y Arg;
- 5 X_{11} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Lys, His, y Glu;
- X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser, y Gln;
- X_{13} se selecciona del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, y Gly; y
- X_{14} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu, y Gly;
- y
- 10 (c) X_1 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser, y Arg;
- X_{11} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, y Glu;
- X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Gly, Ser, y Gln;
- X_{13} se selecciona del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, y Gly; y
- X_{14} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu, y Gly.
- 15 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichos TMP_1 y/o TMP_2 se han derivado como se indica en uno o más de los siguientes:
- una o más de las uniones (enlaces) peptídicas [-C(O)NR-] han sido sustituidas por una unión no peptídica tal como una unión -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-]; una unión fosfonato; una unión -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-]; una unión urea [-NHC(O)NH-]; una unión -CH₂-amina secundaria; o una unión peptídica alquilada [-C(O)NR⁶- en la que R⁶ es alquilo inferior];
- 20 el extremo N es un grupo -NRR¹; a un grupo -NRC(O)R; a un grupo -NRC(O)OR; a un grupo -NRS(O)₂R; a un grupo -NHC(O)NHR, en los que R y R¹ son hidrógeno y alquilo inferior con la condición de que ambos, R y R¹, no sean hidrógeno; a un grupo succinimida; a un grupo benciloxycarbonil-NH- (CBZ-NH-); o a un grupo benciloxycarbonil-NH- que tiene en el anillo fenílico de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxilo inferior, cloro y bromo; y
- 25 el extremo C es -C(O)R², en el que R² es seleccionado del grupo que consiste en alcoxilo inferior y -NR³R⁴ en que R³ y R⁴ son independientemente seleccionados del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es cíclico.
5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que L₁ comprende un péptido.
- 30 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que L₁ comprende Y_n, donde Y es un aminoácido natural o un estereoisómero del mismo y n es 1 a 20.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que L₁ comprende (Gly)_n, donde n es 1 a 20, y cuando n es mayor que 1, hasta la mitad de los residuos de Gly se pueden sustituir por otro aminoácido seleccionado de los restantes 19 aminoácidos naturales o un estereoisómero de los mismos.
- 35 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que L₁ se selecciona del grupo que consiste en (Gly)₃Lys(Gly)₄ (ID. SEC. nº: 6); (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (ID. SEC. nº: 7); (Gly)₃Cys(Gly)₄ (ID. SEC. nº: 8); y GlyProAsnGly (ID. SEC. nº: 9).
- 40 9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que L₁ comprende un residuo de Cys.
10. Un dímero del compuesto de acuerdo con la reivindicación 9.
11. El dímero de acuerdo con la reivindicación 10, que es



12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que L₁ comprende (CH₂)_n, donde n es 1 a 20.

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en

IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº 10);



5

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineal) (ID. SEC. nº 12);

IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (ID. SEC. nº: 13);

IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº: 14);

IEGPTLRQWLAARA-GGGK(BrAc)GGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº 15);

10 IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº 16);

IEGPTLRQWLAARA-GGGK(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº: 17);

IEGPTLRQWLAARA-GGGC(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº: 18);

IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº 19);



15 y

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (ID. SEC. nº 21).

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para usar en:

(a) incrementar los megacariocitos o plaquetas en un paciente que lo necesite;

(b) tratar la trombocitopenia en un paciente que lo necesite;

20 (c) tratar la trombocitopenia idiopática o inmune (TPI) en un paciente que lo necesite; o

(d) tratar el síndrome mielodisplásico en un paciente que lo necesite.

15. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la fabricación de un medicamento para:

(a) incrementar los megacariocitos o plaquetas en un paciente que lo necesite;

25 (b) tratar la trombocitopenia en un paciente que lo necesite;

(c) tratar la trombocitopenia idiopática o inmune (TPI) en un paciente que lo necesite; o

(d) tratar el síndrome mielodisplásico en un paciente que lo necesite.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, o el uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde dicha cantidad es de 1µg/kg a 100mg/kg.

30 17. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable del mismo.

18. Un polinucleótido que codifica un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

19. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 18, que codifica un compuesto que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en ID. SEC. nº: 34 o ID. SEC. nº:46.

20. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, donde el compuesto que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en ID. SEC. n°: 34 o ID. SEC. n°:46 es un dímero.
21. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19.
22. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 21.
- 5 23. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 22, donde dicha célula huésped es una *E.coli*.
24. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicha *E.coli* es una *E.coli* GM221 depositada en el ATCC con número de acceso 98957.
- 10 25. Un método para producir el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en un medio nutriente adecuado y aislar dicho compuesto de dicha célula o medio nutriente.

Figura 1

```

1 ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGTCAGCTCCGGAACCTCTGGGGGGACCGTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
a TACCTGTTTTGAGTGTGTACAGGTGGAACAGGTCGAGGCCTTGAGGACCCCTGGCAGT
M D K T H T C P P C P A P E L L G G P S -
61 GTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
a CAGAAGGAGAAGGGGGTTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAG
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V -
121 ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
a TGTACGCACCACCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCAC
T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V -
181 GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
a CTGCCGCACCTCCACGTATTACGGTTCTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCGTGC
D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T -
241 TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
a ATGGCACACCAGTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTGACCGACTTACCGTTCCCTCATG
Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y -
301 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
a TTCACGTTCCAGAGGTTGTTTCGGGAGGGTTCGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGG
K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A -
361 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
a TTTCCCGTTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGG
K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T -
421 AAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
a TTCTTGGTCCAGTCGGACTGGACGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCAC
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V -
481 GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
a CTCACCCTCTCGTTACCCGTCCGCCCTTGTGATGTTCTGGTGGGAGGGCAGGACCTG
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D -
541 TCCGACGGCTCCTTCTTCCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
a AGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATGTCGTTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTC
S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q -
601 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
a CCCTTGAGAAGAGTACGAGGCACTACGACTCCGAGACGTGTTGGTGTGATGTGCGTCTTC
G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K -
661 AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 684
a TCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTT
S L S L S P G K

```

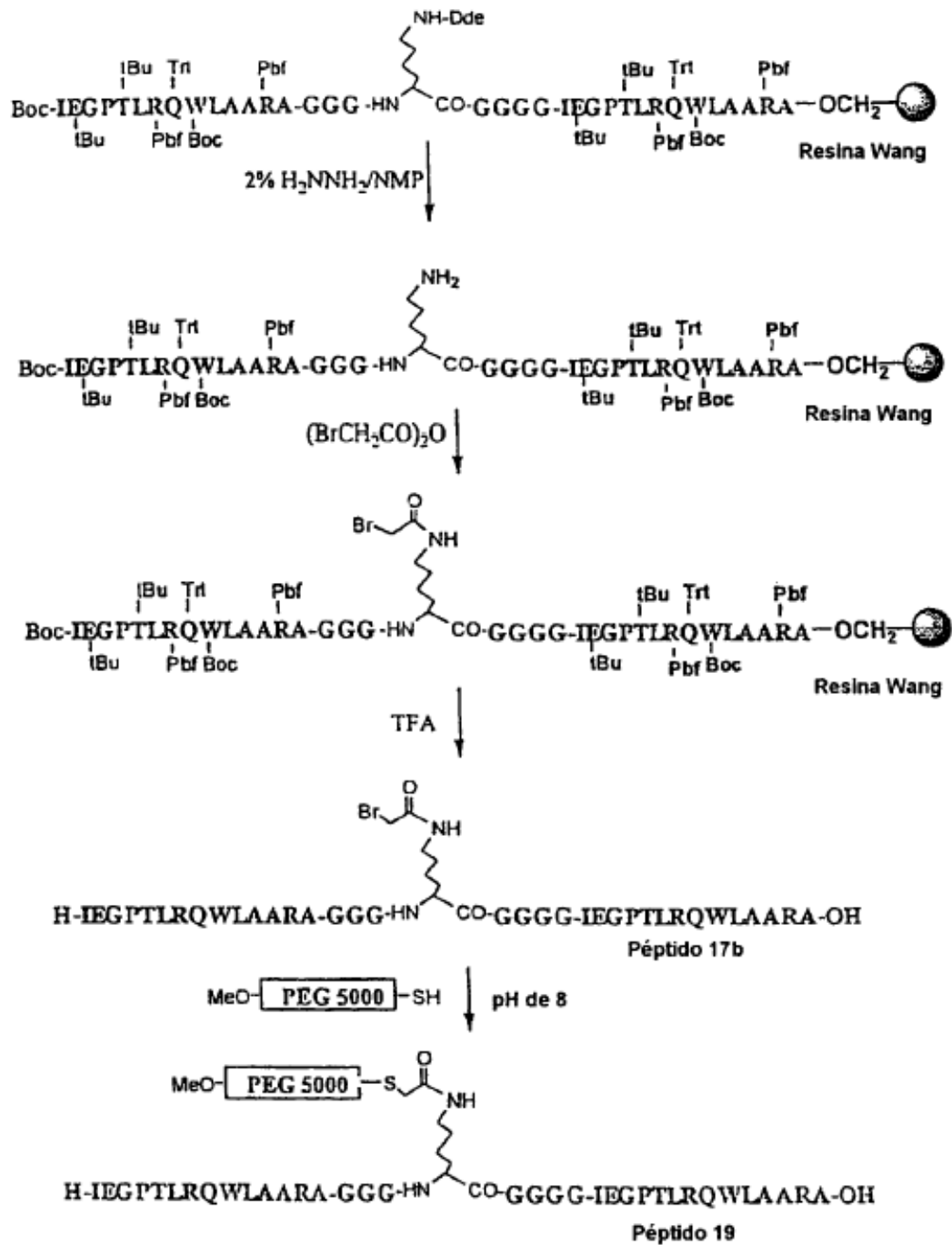


FIGURA 2

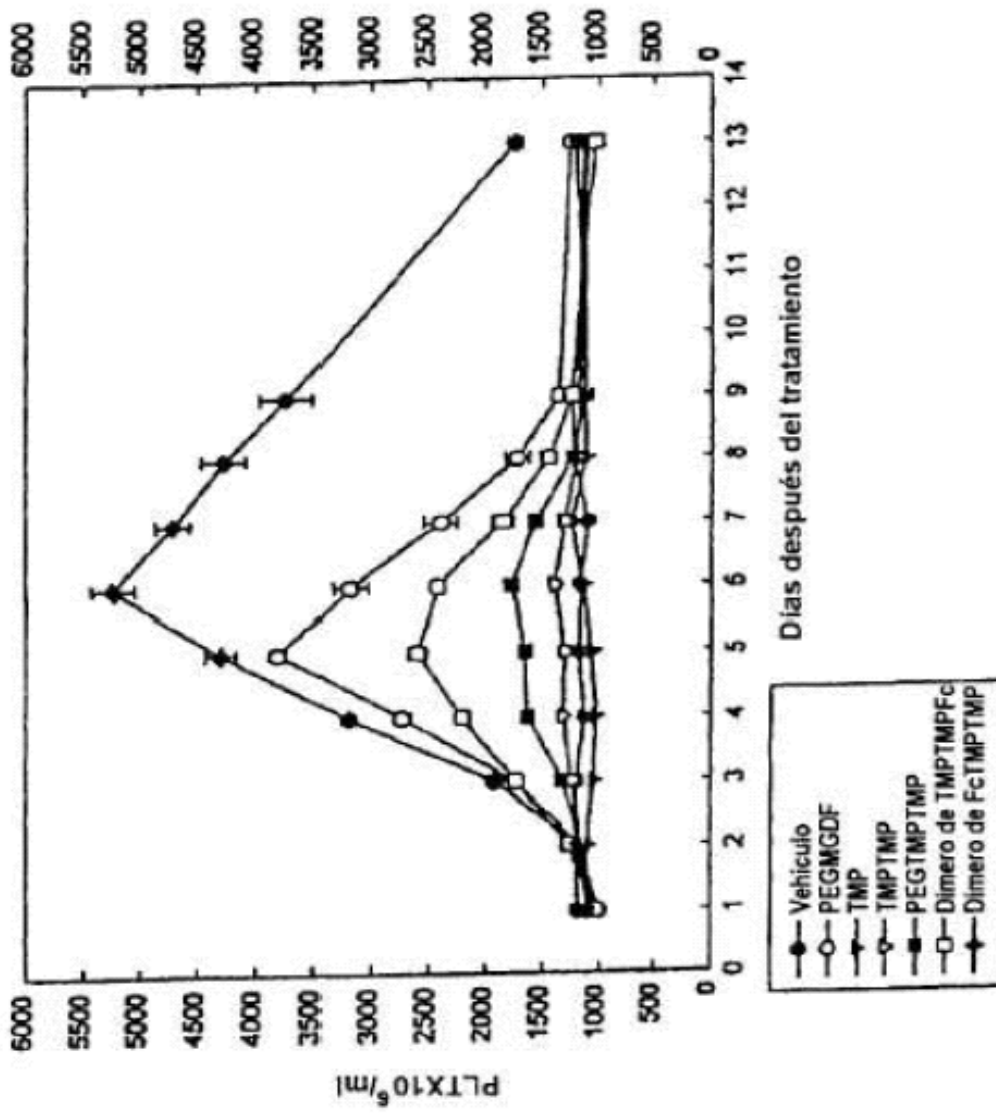


FIGURA 4

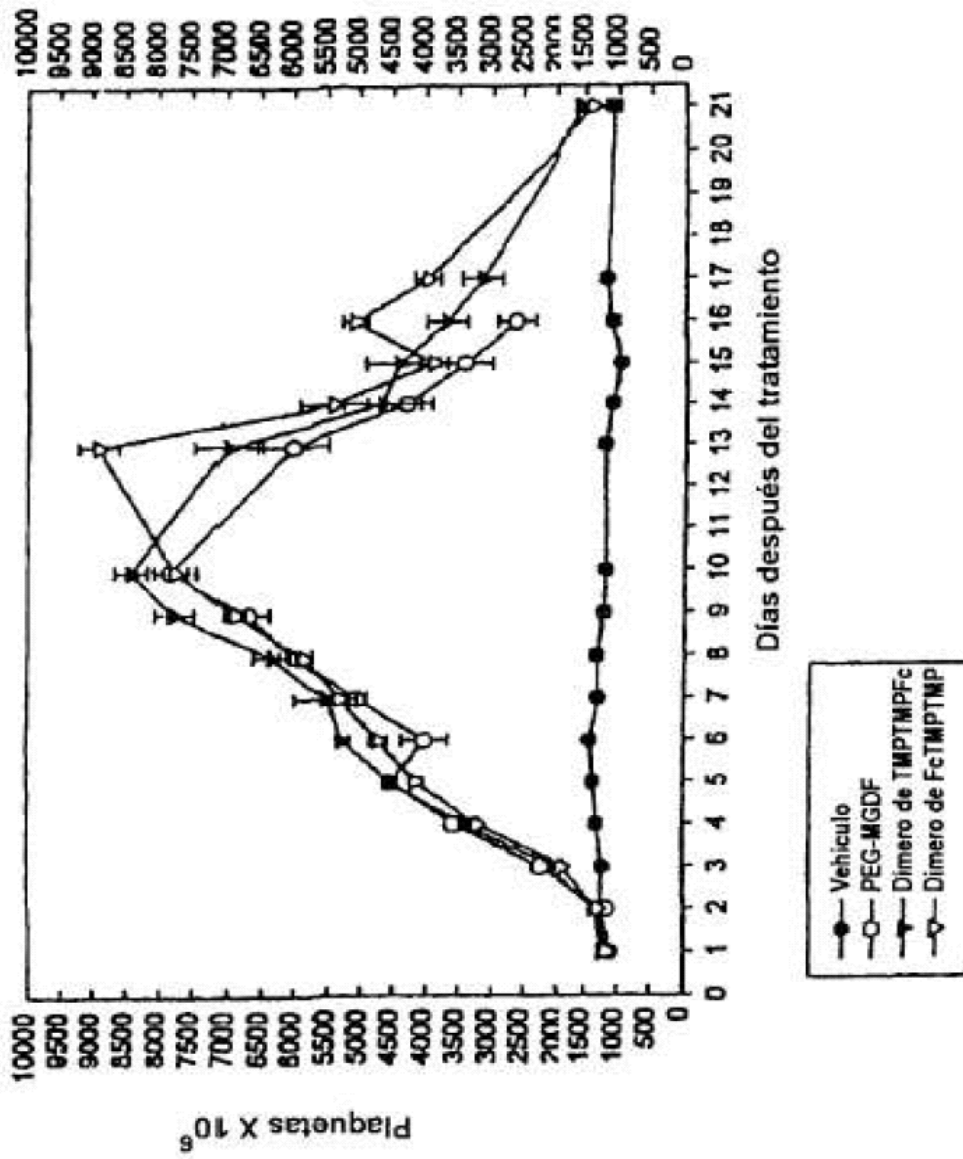


FIGURA 5

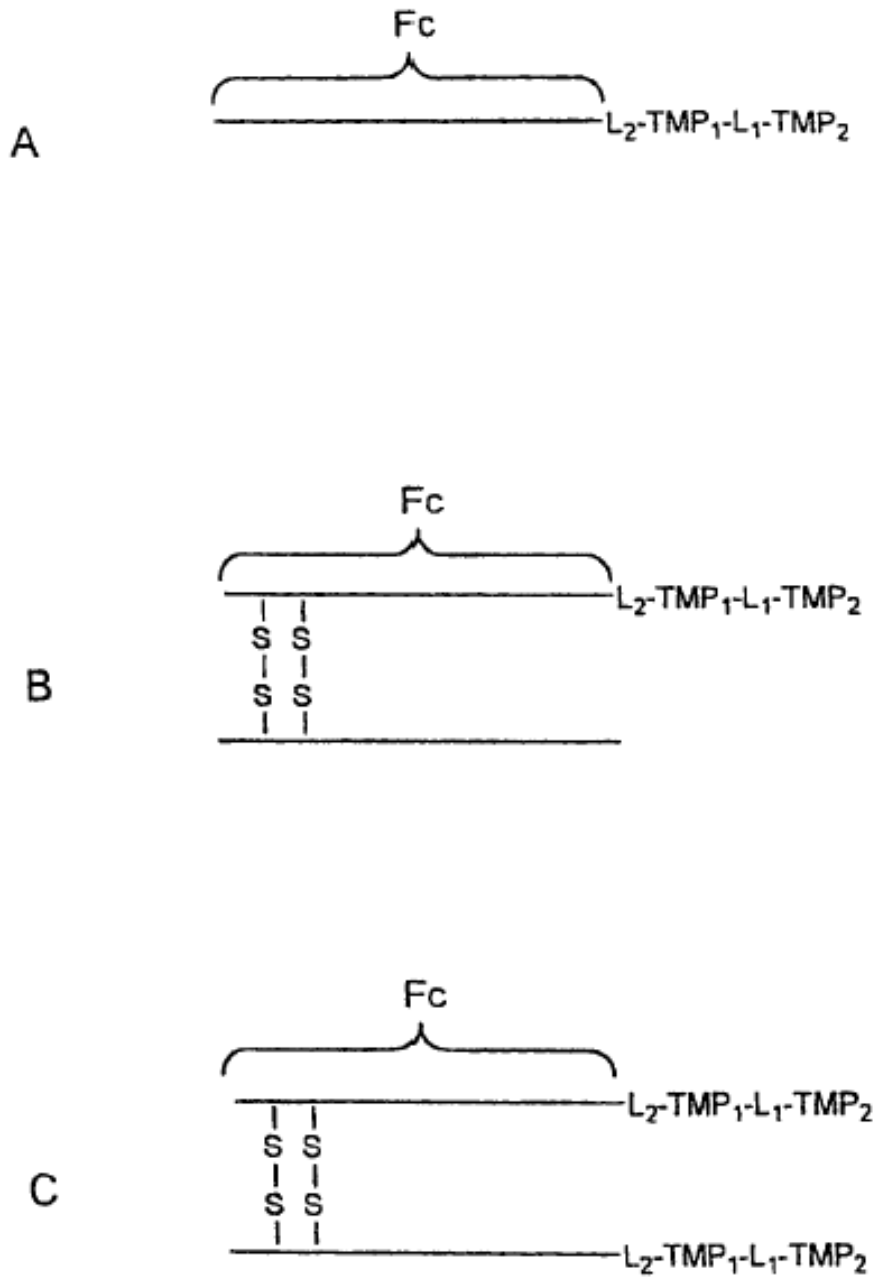


FIGURA 6