

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 649**

51 Int. Cl.:

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: **14.02.2006 E 06735131 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1984014**

54 Título: **Uso de compuestos péptidos de TPO y composiciones farmacéuticas en el tratamiento de la anemia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2014

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

**YURKOW, EDWARD J.;
MACDONALD, BRIAN R. y
WEIS, JEFFERY K.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 516 649 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de compuestos péptidos de TPO y composiciones farmacéuticas en el tratamiento de la anemia

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención presenta compuestos peptídicos que se unen a un receptor trombopoyético (c – mpl o TPO – R) o de otra manera actúa como un agonista de trombopoyetina (TPO). La invención se puede aplicar en los campos de bioquímica y química medicinal y, particularmente, presenta agonistas de TPO para su uso en el tratamiento de una enfermedad humana. Los compuestos peptídicos de la invención pueden emplearse para tratar la anemia y / o prevenir el desarrollo de la anemia y / o mantener una producción normal de glóbulos rojos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] El gen que codifica la TPO se ha clonado y caracterizado. Véanse Kuter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11104 - 11108 (1994); Barley et al. Cell 77: 1117 - 1124 (1994); Kaushansky et al. Nature 369: 568 - 571 (1994); Wendling et al. Nature 369: 571 - 574 (1994); and Sauvage et al. Nature 369: 533 - 538 (1994). La TPO es una glicoproteína con, al menos, dos formas, con masas moleculares aparentes de 25 kDa y 31 kDa, con una secuencia aminoácida N – terminal. Véase Bartley et al., Cell 77: 1117 – 1124 (1994). LA TPO parece tener dos regiones diferentes separadas por un sitio de clivaje Arg – Arg potencial. La región aminoácida está altamente conservada tanto en hombres como en ratones, y tiene cierta homología con la eritropoyetina y los interferones a y b. La región carboxi – terminal muestra una amplia divergencia de especies.

25 [0003] Se han descrito las secuencias de ADN y las secuencias peptídicas codificadas para la TPO - R humana (también conocida como c - mpl). Véase Vigon et al. Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 89: 5.640 - 5644 (1992). La TPO - R es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de la hematopoyetina, una familia caracterizada por tener un diseño estructural común del dominio extracelular, incluyendo cuatro residuos C conservados en la parte N - terminal y un motivo WSXWS (SEC ID N°: 1) cerca de la región transmembrana. Véase Bazan Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 87: 6.934 - 6.938 (1990). La prueba de que este receptor desempeña un papel funcional en la hematopoyesis incluye las observaciones de que su expresión está restringida al bazo, la médula ósea, o el hígado fetal en ratones (véase Souyri et al Cell 63: 1137 - 1147 (1990)) y a megacariocitos, plaquetas, y células CD34⁺ en humanos (véase Methia et al Blood 82: 1395 - 1401 (1993)). Algunos expertos postulan que el receptor funciona como un homodímero, similar a la situación con los receptores para G - CSF y eritropoyetina.

35 [0004] La disponibilidad de genes clonados para la TPO - R facilita la búsqueda de agonistas de este importante receptor. La disponibilidad de la proteína recombinante del receptor permite el estudio de la interacción receptor - ligando en una variedad de sistemas de generación de diversidad de péptidos aleatorios y semialeatorios. Estos sistemas se describen en las patentes U.S 6.251.864, 6.083.913, 6.121.238, 5.932.546, 5.869.451, 6.506.362, y 6.465.430, y en Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 87: 6378 - 6.382 (1.990).

40 [0005] Las células morfológicamente reconocibles y funcionalmente capaces que circulan en la sangre incluyen eritrocitos, granulocitos neutrofilicos, eosinofilicos y basófilos, linfocitos B, T, no B, no T y plaquetas. Estas células hematopoyéticas maduras derivan de y son reemplazadas, según sea necesario, por las células precursoras morfológicamente reconocibles para los respectivos linajes como eritroblastos para la serie de los eritrocitos, mieloblastos, promielocitos y mielocitos para la serie de granulocitos y megacariocitos para las plaquetas. Las células precursoras se derivan de células más primitivas que se pueden dividir de manera simplista en dos grandes subgrupos: las células madre y las células progenitoras (para revisión, véase Broxmeyer, HE, 1983, "Colony Assays of Hematopoietic Progenitor Cells and Correlations to Clinical Situations," CRC Critical Review en Oncology / Hematology 1: 227 - 257).

50 [0006] Las definiciones de células madre y progenitoras son operacionales y dependen más de su función que de criterios morfológicos. Las células madre tienen una amplia capacidad de autorenovación o de automantenimiento (Lajtha, Diferenciación, 14: 23 (1979)), una necesidad, ya que la ausencia o el agotamiento de estas células podrían tener como resultado el agotamiento total de uno o más linajes celulares, circunstancias que conducirían en poco tiempo a la enfermedad y la muerte. Algunas células madre se diferencian según las necesidades, pero otras células madre producen otras células madre para mantener el *pool* de estas células. Así, además de mantener su propia clase, las células madre pluripotenciales son capaces de diferenciarse en varios sublinajes de células progenitoras con una capacidad de autorenovación más limitada o nula. Estas células progenitoras dan lugar en última instancia a las células precursoras morfológicamente reconocibles. Las células progenitoras son capaces de proliferar y diferenciarse a lo largo de una, o más de una, de las vías de diferenciación mieloides (Lajtha, células sanguíneas, 5: 447 (1979)).

65 [0007] Una variedad de agentes infecciosos, anomalías genéticas y factores ambientales puede causar una deficiencia en uno o más tipos de células hematopoyéticas. Además, la quimioterapia y la radiación utilizadas en el tratamiento del cáncer y ciertos trastornos inmunológicos pueden causar pancitopenias o combinaciones de anemia, neutropenia y trombocitopenia. Por lo tanto, el aumento o la sustitución de las células hematopoyéticas es, a menudo, crucial para el éxito de dichos tratamientos. (Para una discusión general de los trastornos hematológicos y sus causas,

véase, por ejemplo, "*Hematology*" in Scientific American Medicine, E. Rubenstein y D. Federman, eds., Volumen 2, Capítulo 5, Scientific American, New York (1996)).

5 **[0008]** La terapia actual disponible para muchos trastornos hematológicos, así como la destrucción de las células hematopoyéticas endógenas causada por la quimioterapia o la radioterapia es el trasplante de médula ósea. Sin embargo, el uso del trasplante de médula ósea está severamente restringido, ya que es muy raro tener donantes perfectamente coincidentes (genéticamente idénticos), excepto en los casos de gemelos idénticos o donde se almacenan las células de médula ósea de un paciente en remisión en estado congelado viable. Excepto en estos casos autólogos, existe un malapareamiento genético inevitable en algún grado, lo que conlleva complicaciones graves y, algunas veces, letales. Estas complicaciones son dos. En primer lugar, el paciente, generalmente, se incapacita inmunológicamente con antelación mediante medicamentos con el fin de evitar el rechazo inmunológico de las células de médula ósea extraña (reacción de injerto contra huésped). En segundo lugar, siempre y cuando las células de médula ósea donadas se establezcan, pueden atacar al paciente (enfermedad injerto contra huésped), que es reconocido como extraño. Incluso con los donantes familiares estrechamente compatibles, estas complicaciones de malapareamiento parcial son una causa de mortalidad y morbilidad sustancial directamente debida a un trasplante de médula ósea de un individuo genéticamente distinto.

20 **[0009]** También se ha investigado la sangre periférica como fuente de células madre para la reconstitución hematopoyética (Nothdurft, W., et al, 1977, Scand J. Haematol 19:470 - 481; Sarpel, SC, et al, 1979, Exp. Hematol 7: 113 - 120; Raghurachar, A., et al, 1983, J. Cell Biochem Suppl 7A: 78; Juttner, CA, et al, 1985, Brit J. Haematol 61: 739 - 745; Abrams, RA, et al, 1983, J. Cell Biochem Suppl 7A: 53; Prummer, O., et al, 1985, Exp Hematol 13: 891 - 898). En algunos estudios, se obtuvieron resultados prometedores para pacientes con diversas leucemias (Reiffers, J., et al, 1986, Exp Hematol 14: 312 - 315; Goldman, JM, et al, 1980, J. Br . Haematol 45: 223 - 231; Tilly, H., et al, jul 19, 1986, *The Lancet*, págs 154 - 155, véase también a, LB y Juttner, CA, 1987, Brit J. Haematol 66: 285 - 288, y las referencias allí citadas); y con linfoma (Korbling, M., et al, 1986, Blood 67: 529 - 532). Sin embargo, otros estudios que utilizan la sangre periférica no pudieron llevar a cabo la reconstitución (Hershko, C., et al, 1979, The Lancet 1: 945 - 947; Ochs, HD, et al, 1981, Pediatr Res 15: 601). Los estudios también han investigado el uso del trasplante de células de hígado fetal (Caín, GR, et al, 1986, *Transplantation* 41: 32-25; Ochs, HD, et al, 1981, Pediatr Res 15: 601; Paige, CJ ., et al, 1981, J. Exp Med 153: 154 - 165; Touraine, JL, 1980, Excerpta Med 514: 277; Touraine, JL, 1983, *Birth effects* 19: 139; véase también Bueno, RA, et al, 1983, *Celular Immunol* 82: 44 - 45 y las referencias citadas en el mismo) o el trasplante de células de bazo neonatales (Yunis, EJ, et al, 1974, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 72: 4100) como fuentes de células madre para la reconstitución hematopoyética. También se han trasplantado células de timo neonatal en experimentos de reconstitución inmune (Vickery, CA, et al, 1983, J. Parasitol 69 (3): 478 - 485; Hirokawa, K., et al, 1982, Clin Immunol Immunopathol 22: 297 - 304).

35 **[0010]** Claramente, hay una tremenda necesidad de métodos de expansión de células sanguíneas *in vitro* o en terapias, lo que aumenta la producción de células hematopoyéticas *in vivo*.

40 **[0011]** La anemia, que se define como una reducción en la concentración de hemoglobina de la sangre, se asocia por lo general con una reducción de la masa de glóbulos rojos circulantes total. Independientemente de la causa, la anemia disminuye la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, y cuando es lo suficientemente grave, causa síntomas y signos clínicos.

45 **[0012]** Clínicamente, la anemia se caracteriza por palidez de la piel y de las membranas mucosas, y por las manifestaciones de hipoxia, siendo más comunes debilidad, fatiga, letargo, o mareos. La hipoxia del miocardio puede producir circulación hiperdinámica con un aumento en la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico. Se pueden desarrollar soplos del flujo de eyección y, si la anemia es lo suficientemente grave, puede estar seguida de insuficiencia cardíaca.

50 **[0013]** Las anemias se clasifican generalmente en una de dos maneras: o bien mediante la clasificación etiológica (basado en la causa) o por clasificación morfológica (basado en los cambios en la forma y tamaño). Normalmente se emplea más la clasificación etiológica.

55 **[0014]** La anemia hemolítica aloimmune se produce cuando el anticuerpo de un individuo reacciona con los glóbulos rojos (GRS) de otro. La anemia hemolítica aloimmune se produce normalmente después de una transfusión de sangre ABO incompatible y enfermedad de Rhesus de recién nacido. También puede ocurrir después de un trasplante alogénico. (Hoffbrand, AV en *Essential Hematology*, 3ª Ed., Blackwell Scientific Publications, 1993, p. 90).

60 **[0015]** La administración de ciertos medicamentos puede causar anemia transitoria inducida por fármacos. Esto puede ocurrir por tres mecanismos: 1) un anticuerpo dirigido contra un complejo membrana de eritrocito - fármaco (por ejemplo, penicilina o cefalotina); 2) la deposición del complemento a través del complejo fármaco - proteína (antígeno) - anticuerpo en la superficie del eritrocito (por ejemplo, quinidina o clorpropamida); o 3) una anemia hemolítica autoinmune en la que se desconoce el papel del fármaco (por ejemplo, metildopa). En cada caso, la anemia sólo desaparece después de suspender el fármaco (sin embargo, con metildopa, los anticuerpos pueden persistir durante muchos meses). (Hoffbrand, A.V. en *Essential Hematology*, 3ª Ed., Blackwell Scientific Publications, 1993, p. 90 - 1).

- 5 [0016] La anemia aplásica se define como la pancitopenia (anemia, leucopenia y trombocitopenia) resultante de la aplasia de médula ósea. Se clasifica en tipos primarios: una forma congénita (anemia de Fanconi) y una forma adquirida sin causa desencadenante obvia (idiopática). Las causas secundarias pueden ser resultado de varias causas industriales, iatrogénicas e infecciosas. La causa subyacente parece ser una reducción sustancial del número de células madre pluripotenciales hematopoyéticas y un defecto en las células madre restantes o una reacción inmune contra ellas haciéndolas incapaces de dividirse y diferenciarse lo suficiente como para poblar la médula ósea. (Hoffbrand, A.V. en *Essential Hematology*, 3^a ed, Blackwell Scientific Publications, 1993, p 121). Se han demostrado en algunos casos células T supresoras, así como inmunoglobulinas, que inhiben la eritropoyetina o bloquean la diferenciación de células madre hematopoyéticas *in vitro*. (Andreoli, T. en *Essentials of Medicine*, WB Saunders, 1986, p. 349).
- 10 [0017] Neelis et al., *Blood*, 90 (1): 58 - 63 (1997), da a conocer que la TPO recombinante humana estimula la recuperación del linaje de glóbulos rojos de la sangre en monos rhesus expuestos a irradiación corporal total de 5 Gy (rayos X de 300 kV), con una regeneración de reticulocitos que se inició 10 días antes que en los animales tratados con placebo. Neelis et al. describe también la mejora de los valores de hemoglobina y hematocitos respecto a los controles.
- 15 [0018] Basser et al, *Blood*, 89 (9): 3118 - 3128 (1997), describe que la administración de PEG - rHuMGDF más filgastrim elevaron las células progenitoras de sangre periférica de pacientes expuestos al carboplatino 600 mg / m² y a ciclofosfamida 1200 mg / m².
- 20 [0019] Papayannopoulou et al., *Exp. Hematol*, 24 (5): 660 - 669 (1996), describe los efectos de EPO y TPO en la diferenciación *in vitro* hacia la eritropoyesis y la trombopoyesis.
- 25 [0020] Kaushansky et al., *J. Clin. Investir*, 96 (3): 1683 - 1687 (1995), da a conocer que TPO actúa en sinergia con EPO para expandir progenitores eritroides. Kaushansky et al., *Exp. Hematol*, 24 (2): 265 - 269 (1996), describe que la TPO expandió las células progenitoras BFU - E, CFU - GM y CFU-MK en animales mielosuprimidos.
- 30 [0021] La anemia es un problema grave, y ha hecho urgente la búsqueda de un agonista del factor de crecimiento sanguíneo capaz de prevenir el desarrollo de la anemia, de tratar la anemia, de favorecer la supervivencia de los precursores de eritrocitos y / o mantener la producción normal de glóbulos rojos. La presente invención proporciona dicho agonista.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 35 [0022] La presente invención se refiere al uso de compuestos peptídicos de bajo peso molecular definidos tal como se definen en las reivindicaciones en el tratamiento de la anemia. Los compuestos peptídicos de bajo peso molecular definidos tienen propiedades de unión a TPO - R fuertes, puede activar la TPO - R, permite reducir potencialmente los efectos secundarios en comparación con los agonistas conocidos de TPO, y tienen la capacidad de estimular, *in vivo* e *in vitro*, la producción de glóbulos rojos de la sangre. Los compuestos peptídicos de bajo peso molecular se pueden encontrar en diversas formas, por ejemplo, monómeros, dímeros y oligómeros y / o pueden ser derivatizados con un polímero hidrófilo. Por consiguiente, dichos compuestos peptídicos son útiles para fines terapéuticos en el tratamiento y / o prevención de la anemia, así como para fines de diagnóstico en el estudio de la anemia.
- 40 [0023] Los compuestos peptídicos adecuados para fines terapéuticos y / o de diagnóstico tienen una CI₅₀ de 2 mM o menos, y más preferiblemente de 2 nM o menos, según se determina mediante, por ejemplo, un ensayo de unión de Baf / 3 (discutido más adelante), en el que un IC₅₀ menor se correlaciona con una afinidad de unión más fuerte a TPO - R. Para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen preferiblemente una IC₅₀ de no más de 100 μm, más preferiblemente no más de 500 nM, más preferiblemente no más de 100 pm, y más preferiblemente no más de 5 pm.
- 45 [0024] Los compuestos peptídicos adecuados para fines de diagnóstico y / o terapéutico tienen una EC₅₀ de 2 mM o menos, y más preferiblemente de 2 nM o menos, como se determina usando técnicas bien conocidas en ensayos bien conocidos, tales como, por ejemplo, un ensayo de unión de Baf / 3 (discutido a continuación), en el que una EC₅₀ menor se correlaciona con una afinidad de unión más fuerte a TPO - R. Para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen preferiblemente una CE₅₀ de no más de 100 μm, más preferiblemente no más de 500 nM, más preferiblemente no más de 100 pm, y más preferiblemente no más de 5 pm.
- 50 [0025] El peso molecular de los compuestos peptídicos varía desde 500 a 8.000 daltons, más preferiblemente de 900 a 2.000 daltons. Si los compuestos peptídicos están oligomerizados, dimerizados y / o derivatizados con un polímero hidrófilo como se describe en el presente documento, el peso molecular de dicho péptido será mayor y puede variar desde 1.500 a 120.000 daltons, más preferiblemente de 3.000 a 80.000 daltons y más preferiblemente de 30.000 a 50.000 daltons.
- 55 [0026] Algunos polímeros hidrófilos adecuados incluyen, de manera no limitante, polialquil éteres como se ejemplifica por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquilenos, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextrano y derivados de dextrano, etc, como se describen en las patentes U.S. 5.672.662 y 5.869.451.
- 60
- 65

5 **[0027]** Cuando los compuestos peptídicos son derivatizados con un polímero hidrófilo, la vida media de la solubilidad y de la circulación aumentan y se oculta la inmunogenicidad. Lo anterior se puede lograr disminuyendo poco o nada su actividad de unión. Generalmente, tales polímeros hidrófilos tienen un peso molecular medio que varía de 500 a 100.000 daltons, más preferiblemente de 2.000 a 40.000 daltons y, aún más preferiblemente, de 5.000 a 20.000 daltons. En realizaciones preferidas, tales polímeros hidrófilos tienen un peso molecular medio de 5.000 daltons, 10.000 daltons y 20.000 daltons.

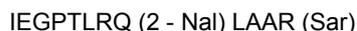
10 **[0028]** Los compuestos peptídicos de la invención pueden ser derivatizados con o acoplados a dichos polímeros usando cualquiera de los métodos establecidos en Zallipsky, S., Bioconjugate Chem, 6: 150 - 165 (1995); Monfardini, C, et al, Bioconjugate Chem, 6: 62 - 69 (1995); Las patentes U.S 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; 4.179.337 o WO 95/34326.

15 **[0029]** Los compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser derivatizados con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal soluble en agua de unidades de repetición de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares, que normalmente van desde 500 daltons a 40.000 daltons. Los PEG empleados pueden tener pesos moleculares que varían de 5.000 daltons a 20.000 daltons. El PEG acoplado a los compuestos peptídicos de la presente invención puede ser ramificado o no ramificado. (Véase, por ejemplo, Monfardini, C., et al, Bioconjugate Chem, 6: 62 - 69 (1995)). Los PEG se encuentran disponibles comercialmente en Nektar Therapeutics (San Carlo, CA), Sigma Chemical Co. y otras compañías. Tales PEG incluyen, de manera no limitante, monometoxipolietilenglicol (MePEG - OH), monometoxipolietilenglicol - succinato (MePEG - S), succinato de monometoxipolietilenglicol - succinimidilo (MePEG - S - NHS), monometoxipolietilenglicol - amina (MePEG - NH₂), monometoxipolietilenglicol - tresilato (MePEG - TRES), y monometoxipolietilenglicol - imidazolilo - carbonilo (MePEG - IM).

25 **[0030]** Brevemente, en una realización, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, tiene preferiblemente un extremo protegido por un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. A partir de entonces, el polímero se activa en el otro extremo mediante reacción con un agente de activación adecuado, como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro cianúrico, bromuro o fluoruro), diimidazol, un reactivo de anhídrido (por ejemplo, un anhídrido dihalo succínico, como anhídrido dibromo succínico), azida de acilo, éter p - diazoumbencilo, 3 - (p - diazoniumfenoxi) - 2 - hidroxipropiléter) y similares. El polímero activado se hace reaccionar entonces con un compuesto peptídico de la presente invención para producir un compuesto peptídico derivatizado con un polímero. Alternativamente, puede activarse un grupo funcional en los compuestos peptídicos de la invención para reaccionar con el polímero, o los dos grupos se pueden unir en una reacción de acoplamiento concertada utilizando métodos de acoplamiento conocidos. Se apreciará fácilmente que los compuestos peptídicos de la invención se pueden derivatizar con PEG utilizando un gran número de esquemas de reacción diferentes conocidos y usados por los expertos en la técnica.

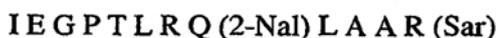
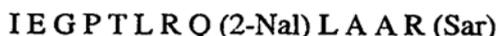
40 **[0031]** Cuando se utiliza para fines de diagnóstico, los compuestos peptídicos se marcan preferentemente con un marcador detectable y, por consiguiente, los compuestos peptídicos sin tales etiqueta sirven como intermedios en la preparación de compuestos de péptido marcado.

45 **[0032]** Un compuesto peptídico particularmente preferido es (SEC ID N°: 5):



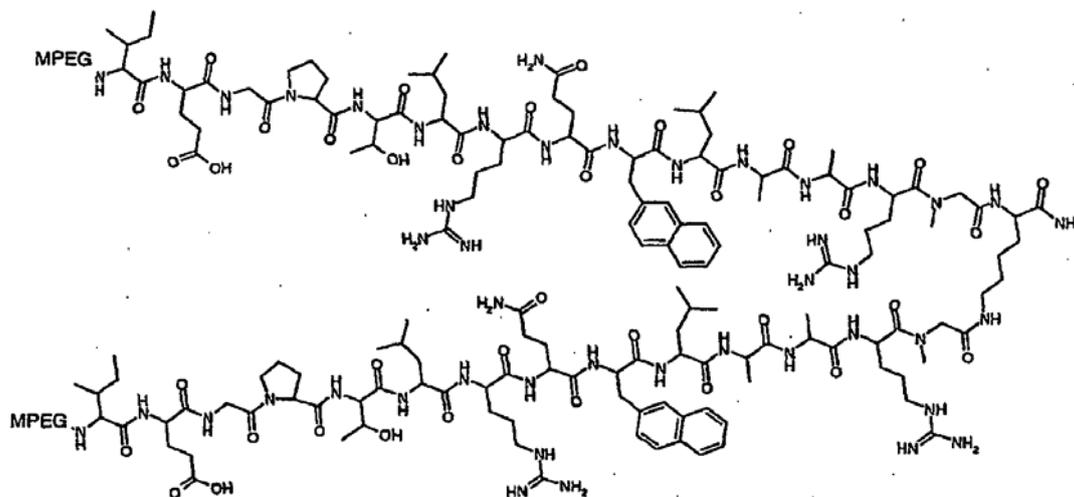
donde (Sar) es sarcosina.

50 **[0033]** En otra realización, el compuesto peptídico está dimerizado u oligomerizado para aumentar la afinidad y / o actividad del compuesto peptídico. Un compuesto peptídico particularmente preferido es un péptido 29 - mer con dos 14 - mer idénticos unidos por un residuo lisinamida. Por consiguiente, un compuesto peptídico particularmente preferido es (SEC ID N°: 6, también denominado en este documento Compuesto de TPO N° 1):



60 Un compuesto peptídico más preferido es una versión pegilada del Compuesto de TPO N° 1. La forma pegilada puede incluir un residuo de 20.000 PEG unido covalentemente a cada isoleucina N - terminal. Se detalla a continuación la estructura molecular completa de un ejemplo de dicho compuesto:

65



20 **[0034]** (Este compuesto se denomina en este documento Compuesto de TPO PEGilado N° 1). El nombre químico completo del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 es:

25 Metoxipolyetileneglicol20000 – propionil – L – Isoleucil – L – Glutamil – Glicil – L – Prolil – L – Treonil – L – Leucil – L – Arginil – L – Glutaminil – L – 2 – Naftilalanil – L – Leucil – L – Alanil – L – Alanil – L – Arginil – Sarcosil – Ne – (metoxipolietilenoglicol20000 – propionil – L – Isoleucil – L – Glutamil – Glicil – L – Prolil – L – Treonil – L – Leucil – L – Arginil – L – Glutaminil – L – 2 – Naftilalanil – L – Leucil – L – Alanil – L – Alanil – L – Arginil – Sarcosil -) - Lisinamida.

30 **[0035]** El Compuesto de TPO PEGilado N° 1 se compone de dos cadenas peptídicas de 14 amino ácido idénticos unidos por un residuo lisinamida y unidos en cada N - terminal a una cadena de polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de 20.000 Daltons. El peso molecular del péptido parental sin PEG es de 3295 Daltons y con dos cadenas de PEG es de 43.295 Daltons. El Compuesto de TPO PEGilado N° 1 tiene una estructura molecular abreviada de (MPEG – Ile – Glu – Gly – Pro – Thr – Leu – Arg - Gln (2 - Nal) Leu – Ala – Ala - Arg (Sar))₂ Lys - NH₂; donde (2 - Nal) es β – (2 - naftil) alanina, (SAR) es sarcosina y MPEG es metoxipoli (etileno glicol) (PM 20.000 Daltons).

35 **[0036]** Uno o más compuestos de péptidos, y, en particular compuestos peptídicos PEGilados, incluyendo equivalentes farmacéuticamente aceptables de los mismos (denominados colectivamente aquí como "compuestos peptídicos", "compuestos peptídicos de TPO" o "compuestos peptídicos de TPO de la invención"), son útiles para la prevención y el tratamiento de enfermedades mediadas por la TPO, y en particular para el tratamiento y / o prevención de la anemia. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para el tratamiento y / o prevención de la anemia, en el que un paciente que tiene anemia, o un paciente que se espera que desarrolle anemia, reciba, o se le administre, una dosis o cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto peptídico de la presente invención.

40 **[0037]** La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos peptídicos descritos en este documento y un vehículo fisiológicamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas, incluyendo formas de dosificación oral, así como polvos de inhalación y soluciones, y soluciones inyectables e infusibles.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0038]

55 La figura 1 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en los niveles de hemoglobina como se expone en el Ejemplo 1.
 La figura 2 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el recuento de glóbulos rojos tal como se expone en el Ejemplo 1.
 La figura 3 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el hematocrito como se expone en el Ejemplo 1.
 La figura 4 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el peso corporal como se expone en el Ejemplo 1.
 La figura 5 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en los niveles de hemoglobina como se expone en el Ejemplo 2.
 La figura 6 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el recuento de glóbulos rojos tal como se expone en el Ejemplo 2.
 65 La figura 7 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el hematocrito como se

expone en el Ejemplo 2.

La figura 8 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el peso corporal como se expone en el Ejemplo 2.

5 La figura 9 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en los niveles de hemoglobina como se expone en el Ejemplo 3.

La figura 10 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el recuento de glóbulos rojos tal como se expone en el Ejemplo 3.

La figura 11 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el hematocrito como se expone en el Ejemplo 3.

10 La figura 12 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el peso corporal como se expone en el Ejemplo 3.

La figura 13 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el hematocrito como se expone en el Ejemplo 4.

15 La figura 14 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el peso corporal como se expone en el Ejemplo 4.

La figura 15 muestra el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el peso corporal como se expone en el Ejemplo 5.

La figura 16 muestra lo que se cree que es el mecanismo antianémico de acción del Compuesto de TPO PEGilado N° 1.

20 La figura 17 muestra los que se creen que son algunos de los efectos del linaje de células hematopoyéticas del Compuesto de TPO PEGilado N° 1.

Las figuras 18A y 18B muestran el efecto en las plaquetas y el hematocrito de los ratones tratados con carboplatino como resultado del tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 como se expone en el Ejemplo 6.

25 La figura 19 muestra el efecto sobre la deposición de fibrinógeno y coágulos de sangre en secciones de cerebro de ratones tratados con carboplatino como resultado del tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 tal como se expone en el Ejemplo 6.

La figura 20 muestra el efecto del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en la activación de la TPO - R humana en células Baf / 3 como se expone en el Ejemplo 7.

30 La figura 21 muestra que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 activa las células Baf / 3 que expresan recombinantemente TPO – R humana de manera dependiente a la dosis como se expone en el Ejemplo 7.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

35 **[0039]** Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y el alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente invención.

40 **[0040]** "Agonista" se refiere a un ligando biológicamente activo que se une a su receptor biológicamente activo complementario y activa este último ya sea para causar una respuesta biológica en el receptor o para mejorar la actividad biológica preexistente del receptor.

[0041] "CE₅₀" y "concentración efectiva del 50 %" se refieren a la concentración de un agonista que produce un 50 % de la respuesta eficaz posible máxima para ese agonista.

45 **[0042]** "IC₅₀" y "concentración inhibitoria del 50 %" se refieren a la concentración de ligando de competición que desplaza el 50 % de la unión del agonista específico.

50 **[0043]** "Equivalentes farmacéuticamente aceptables" incluye, sin limitación, sales farmacéuticamente aceptables, sales de adición de ácido, ésteres, amidas, hidratos, metabolitos, profármacos, e isómeros. Se espera que muchos de los equivalentes farmacéuticamente aceptables tengan una actividad idéntica o similar *in vitro* o *in vivo* a la de los compuestos peptídicos de la invención.

55 **[0044]** "Sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales de metal alcalino no tóxico, de metal alcalinotérreo y de amonio comúnmente utilizadas en la industria farmacéutica incluyendo las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario, amonio, y sales de zinc protamina, que se preparan mediante métodos bien conocidos en la técnica. El término también incluye sales de adición de ácido no tóxicas, que se preparan generalmente haciendo reaccionar los compuestos peptídicos de esta invención con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales representativas incluyen las sales clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, napsilato, y similares.

60 **[0045]** "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la efectividad biológica y las propiedades de las bases libres y que no son biológicamente o de otra manera indeseable, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, fosfórico ácido y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido

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

5 **[0046]** "Éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos ésteres que retienen, tras la hidrólisis del enlace éster, la eficacia biológica y las propiedades del ácido carboxílico o alcohol y no son biológicamente o de otra manera indeseables. Para una descripción de ésteres farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Estos ésteres se forman típicamente a partir del ácido carboxílico correspondiente y un alcohol. Generalmente, la formación del éster se puede lograr a través de técnicas sintéticas convencionales. (Véase, por ejemplo, *March Advanced Organic Chemistry*, 3^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985) p. 1157 y las referencias citadas en el mismo, y Mark et al. *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1980)). El componente alcohol del éster comprenderá generalmente (i) un alcohol alifático C₂ - C₁₂ que puede contener o no uno o más enlaces dobles y puede contener o no carbonos ramificados o (ii) alcoholes heteroaromáticos o aromáticos C₇ - C₁₂. Esta invención también contempla el uso de esas composiciones, que son tanto los ésteres descritos en el presente documento, como, al mismo tiempo, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 **[0047]** "Amida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas amidas que mantienen, tras la hidrólisis del enlace amida, la eficacia biológica y las propiedades del ácido carboxílico o amina y no son biológicamente o de otra manera indeseables. Para una descripción de amidas farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Estas amidas se forman típicamente a partir del ácido carboxílico correspondiente y una amina. Generalmente, la formación de la amida se puede lograr a través de técnicas sintéticas convencionales. (Véase, por ejemplo, *March Advanced Organic Chemistry*, 3^a ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985) p. 1152 y Mark et al. *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1980)). Esta invención también contempla el uso de esas composiciones, que son tanto las amidas descritas en el presente documento, como, al mismo tiempo, las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de las mismas.

30 **[0048]** "Portador farmacéutica o terapéuticamente aceptable" se refiere a un medio portador que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el huésped o paciente.

35 **[0049]** "Estereoisómero" se refiere a un compuesto químico con el mismo peso molecular, composición química, y constitución que otro, pero con los átomos agrupados de manera diferente. Es decir, determinados restos químicos idénticos están en orientaciones diferentes en el espacio y, por lo tanto, cuando es puro, tiene la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica tan leve que es indetectable con la instrumentación actual. Los compuestos peptídicos de la presente invención pueden tener uno o más átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, incluir diversos estereoisómeros. Todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención.

40 **[0050]** "Cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz" como se aplica a las composiciones de la presente invención se refiere a la cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad mediante cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado suele implicar un aumento de la producción de glóbulos rojos.

45 **[0051]** Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: Fenilalanina es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y glicina es Gly o G. Además, Bu es Butoxi, Bzl es bencilo, CHA es ciclohexilamina, Ac es acetilo, Me es metilo, Pen es penicilamina, Aib es ácido aminoisobutírico, Nva es norvalina, Abu es ácido butírico amino, Thi es tienilalanina, OBn es O - bencilo e hyp es hidroxiprolina.

55 **[0052]** Además de péptidos consistentes únicamente en aminoácidos de origen natural, también se presentan peptidomiméticos o análogos peptídicos. Los análogos peptídicos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos" (Fauchere, J. *Adv Drug Res* 15: 29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p.392 (1985) y Evans et al. *J. Med Chem* 30: 1229 (1987). Pueden emplearse miméticos de péptidos estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o mejorado. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), como un polipéptido de unión al receptor de origen natural, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo formado por: - - CH₂NH --, - CH₂ S --, - CH₂ - CH₂ -, - CH = CH - (cis y trans), - COCH₂ -, - CH (OH) CH₂ -, y - CH₂SO --, mediante métodos conocidos en la técnica y, además descritos en las siguientes referencias: Spatola, A.F. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds, Marcel Dekker, Nueva York, p.. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (marzo de 1983), vol. 1, Número 3, Peptide Backbone Modifications (general

review); . Morley, Trends Pharm Sci (1980) pp 463 - 468 (*general review*); Hudson, D. et al, Int J Pept Prot Res 14: 177 - 185 (1979) (- CH₂ NH -, CH₂ CH₂ -); Spatola et al. Life Sci 38: 1243 - 1249 (1986) (- CH₂ - S); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. I 307 - 314 (1982) (CH - CH-, cis y trans); Almquist et al. J. Med. Chem. 23: 1392 - 1398 (1980) (- COCH₂ -); Jennings - White et al. Tetrahedron Lett 23: 2533 (1982) (- COCH₂ -); Szelke et al. Appln Europea. EP 45665 CA (1982): 97: 39.405 (1982) (- CH (OH) CH₂ -); Holladay et al. Tetrahedron Lett 24: 4401 - 4404 (1983) (- C (OH) CH₂ -); y Hruby Life Sci 31: 189 - 199 (1982) (- CH₂ - S -). Un enlace no péptido particularmente preferido es - CH₂ NH -. Tales miméticos de péptidos pueden tener ventajas significativas en realizaciones de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros.

[0053] El etiquetado de los peptidomiméticos implica normalmente la unión covalente de una o más etiquetas, directamente o a través de un separador (por ejemplo, un grupo amida), a la posición no interferente en el peptidomimético predicha por datos cuantitativos de la estructura - actividad y / o el modelado molecular. Tales posiciones no interferentes en general son posiciones que no forman contactos directos con las macromoléculas (s) (por ejemplo, moléculas de la superfamilia de la inmunoglobulina) a la que se une el mimético de péptido para producir el efecto terapéutico. La derivatización (por ejemplo, etiquetado) de peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético. Generalmente, los peptidomiméticos de péptidos de unión a receptores se unen al receptor con alta afinidad y poseen una actividad biológica detectable (es decir, son agonistas o antagonistas de uno o más cambios fenotípicos mediados por el receptor).

[0054] Se puede utilizar la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D - aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D - lisina en lugar de L - lisina) para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann Rev. Biochem 61: 387 (1992), por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína internos capaz de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

[0055] "Marcador detectable" se refiere a materiales que cuando se unen covalentemente a los compuestos peptídicos de esta invención, permiten la detección del compuesto peptídico *in vivo* en el paciente al que se ha administrado el compuesto peptídico. Los marcadores detectables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, radioisótopos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína), y similares. El marcador detectable particular empleado no es crítico y se selecciona en relación a la cantidad de marcador que se va a emplear, así como a la toxicidad de la etiqueta en la cantidad de etiqueta empleada. La selección de la etiqueta en relación con dichos factores está bien dentro de la experiencia de la técnica.

[0056] La unión covalente del marcador detectable al compuesto peptídico se logra mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando se emplea el radioisótopo ¹²⁵I como marcador detectable, la unión covalente de ¹²⁵I al compuesto peptídico se puede lograr mediante la incorporación del aminoácido tirosina en el compuesto peptídico y luego por yodación del compuesto peptídico. Asimismo, se puede incorporar ³²P en el compuesto peptídico como resto fosfato mediante, por ejemplo, un grupo hidroxilo en el compuesto peptídico usando la química convencional.

[0057] La presente invención proporciona compuestos peptídicos que se unen y activan la TPO - R o de otra forma se comportan como un agonista de TPO. Estos compuestos peptídicos incluyen compuestos de péptidos "dirigidos" y compuestos peptídicos "equivalentes" o "derivados" construidos de manera que tenga una estructura molecular o forma idéntica o similar a los compuestos peptídicos dirigidos, pero que se diferencien de los compuestos peptídicos dirigidos, ya sea con respecto a la susceptibilidad a la hidrólisis o proteólisis y / o con respecto a otras propiedades biológicas, como el aumento de la afinidad por el receptor. La presente invención también presenta composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un agonista de TPO, y más particularmente un compuesto peptídico útil para el tratamiento de la anemia.

[0058] Los compuestos peptídicos de la invención también se pueden administrar a animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, para activar la TPO - R *in vivo*. Por lo tanto, la presente invención abarca métodos para el tratamiento terapéutico de la anemia que comprenden la administración de un compuesto peptídico de la invención en cantidades suficientes para imitar el efecto de la TPO en la TPO - R *in vivo*.

[0059] La actividad de los compuestos peptídicos de la presente invención puede evaluarse *in vitro* o *in vivo* en, por ejemplo, uno de los numerosos modelos descritos en McDonald Am. J. de *Pediatric Hematology / Oncology* 14: 8 - 21 (1992), o los ensayos descritos en este documento.

[0060] Según una realización, las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de la anemia asociada a transfusiones de médula ósea, terapia de radiación o quimioterapia. Los compuestos peptídicos serán administrados, en general, profilácticamente antes de la quimioterapia, radioterapia o el trasplante de médula ósea o después de tal exposición.

- 5 **[0061]** Por consiguiente, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden, como ingrediente activo, al menos uno de los compuestos peptídicos de la invención en asociación con un vehículo o diluyente farmacéutico. Los compuestos peptídicos de esta invención se pueden administrar por vía oral, pulmonar, parental (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (a través de una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual y se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. Véase, por ejemplo, Bernstein et al. Publicación de Patente PCT No. WO 93/25221; Pitt et al. Publicación de Patente PCT No. WO 94/17784; y Pitt et al. Solicitud de Patente Europea 613.683.
- 10 **[0062]** Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, el compuesto peptídico activo se mezcla con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes como estearato de magnesio lubricante. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las tabletas y píldoras pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos entéricos.
- 20 **[0063]** Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, farmacéuticamente aceptables con elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, como agua o solución salina. Además de tales diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir adyuvantes, como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes.
- 25 **[0064]** Las preparaciones según esta invención para administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos o vehículos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Tales formas de dosificación también pueden contener adyuvantes como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y agentes dispersantes. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, por incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. También se pueden fabricar utilizando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso.
- 30 **[0065]** Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes como manteca de cacao o una cera de supositorio. Las composiciones para administración nasal o sublingual también se preparan con excipientes estándar bien conocidos en la técnica.
- 35 **[0066]** Las composiciones de la invención también se pueden microencapsular mediante, por ejemplo, el método de Tice y Bibi (en *Treatise on Controlled Drug Delivery*, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, Nueva York (1992), págs. 315 - 339).
- 40 **[0067]** Las composiciones que contienen el compuesto peptídico se pueden administrar para tratamientos profilácticos y / o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad, como se describió anteriormente, en una cantidad suficiente para curar o, al menos, detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del peso y estado general del paciente.
- 45 **[0068]** En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los compuestos peptídicos de la invención se administran a un paciente susceptible o en riesgo de padecer una enfermedad particular. Tal cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades exactas dependen de nuevo del estado de salud y el peso del paciente.
- 50 **[0069]** Las cantidades del agonista de TPO necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, deben valorarse las dosis de tratamiento para optimizar la seguridad y la eficacia. Normalmente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. La experimentación de dosis eficaces en animales para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación más predictiva de la dosis humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman et al. (eds), Goodman y Gilman: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8ª ed., Pergamon Press (1990); y Remington, *Pharmaceutical Sciences*, 7ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA. (1985).
- 55 **[0070]** Los compuestos peptídicos de esta invención son eficaces en el tratamiento de la anemia cuando se administra en un intervalo de dosificación de 1 ug a 300 ug / kg de peso corporal por día. La dosis específica empleada está regulada por la vía de administración, así como por el juicio del médico dependiendo de factores como la gravedad de la condición, la edad y la condición general del paciente, y similares.
- 60 **[0070]**
- 65 **[0070]**

EJEMPLOS

MODELOS ANIMALES

5 **[0071]** Se observaron los efectos del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en ratones tratados con carboplatino. Para todos los ejemplos del presente documento se preparó una solución madre de 10 mg / ml del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en solución salina estéril. Para mezclarla, la preparación se colocó en un agitador giratorio durante 15 min. a 200 rpm. Este método se utilizó para disolver el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 sin formar espuma. La solución madre se filtró usando un filtro Millex GV (0.22 um). Las soluciones de dosificación se prepararon a continuación a partir de esta solución madre utilizando solución salina estéril. Las soluciones madre y de dosificación se prepararon frescas en el día de uso.

EJEMPLO 1

15 **[0072]** Se determinó el efecto del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en la duración y la gravedad de la anemia después del tratamiento de ratones con carboplatino como se determina por los cambios en los niveles de hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y el hematocrito. Para este estudio, se administraron cantidades crecientes del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 a los ratones un día después de una dosis de carboplatino para caracterizar un posible efecto dependiente de la dosis en varios parámetros de glóbulos rojos.

20 **[0073]** Los grupos de ratones se trataron con carboplatino o vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) mediante la administración intraperitoneal en los días - 2 y - 1 como se expone a continuación. Se determinó previamente que la dosis óptima de carboplatino utilizado para inducir trombocitopenia en la cepa de ratón BALB / c era una dosis total fraccionada de 120mg / kg administrada en dos inyecciones diarias consecutivas (es decir, 2 x 60 mg / kg). Un día después de la segunda dosis de carboplatino, los grupos de ratones se trataron con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 o vehículo (solución salina estéril, SS, libre de conservantes 0,9 % de cloruro de sodio) mediante una inyección intravenosa (bolo) tal como se expone en la Tabla 1. La dosis fue administrada en base al peso (100 ul / 10 g de peso corporal).

30 **Tabla 1**

Grupos de tratamiento:					
Gp	Nº	Pretratamiento (ip), Día - 2 & - 1	Artículo de prueba	Dosis (iv) Día 0	Extracción de sangre
1	10	Vehículo (PBS)	Vehículo (SS)	Control	Sac 5 ratones en los días 5 & 11
2	20	Carboplatino	Vehículo (SS)	Control	Sac 5 ratones en los días 5, 7, 9 & 11
3	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	300 ug / kg	Sac 5 ratones en los días 5, 7, 9 & 11
4	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	1000 ug / kg	Sac 5 ratones en los días 5, 7, 9 & 11
5	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	3000 ug / kg	Sac 5 ratones en los días 5, 7, 9 & 11

Gp = Grupo; Sac = Sacrificados

50 **[0074]** En los días 5, 7, 9 y 11, se pesaron y luego se sacrificaron cinco ratones de cada grupo de ensayo mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre se transfirieron para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. En los días 5 y 11 se analizaron los grupos de ratones de control (5). Los resultados se muestran en las Figs. 1 - 4. Los datos se presentan gráficamente como la media del grupo +SEM.

55 **[0075]** El tratamiento de ratones con carboplatino solo causó una disminución del 20 % en los niveles de hemoglobina en los ratones en el Día 11. Esta disminución fue inhibida por el tratamiento con todas las dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1. La disminución menor en el recuento de GRS y el hematocrito también se asociaron al tratamiento con carboplatino, un efecto que fue inhibido por el tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1; sin embargo, no se llevó a cabo la evaluación estadística de este efecto. Los ratones de todos los grupos tratados con carboplatino solo o carboplatino más las diferentes dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 experimentaron pérdida de peso en los días 5, 7 y 9 con respecto a las mediciones de peso corporal recogidas en el día 0. Los análisis de las mediciones de peso corporal en un subconjunto de los ratones durante el período de estudio de 11 días sugiere que el tratamiento con carboplatino solo causó la disminución observada en los pesos corporales y que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 mejoró la recuperación de la pérdida de peso corporal en todas las dosis probadas.

[0076] Los ratones tratados con carboplatino solo comenzaron a mostrar aspecto y comportamiento alterado en el Día 5. Algunos de los ratones asumieron una posición encorvada y parecían flácidos. Muchos ratones también tenían las áreas anogenitales sucias. El tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 disminuyó el inicio, la frecuencia y la gravedad de estos signos, de manera que parecían ser dependiente de la dosis.

5

EJEMPLO 2

[0077] Se examinó la posibilidad de que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 pudiera sensibilizar las células madre hematopoyéticas de médula ósea de ratones contra los efectos tóxicos del tratamiento carboplatino. Para este estudio, se administró una dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 a los ratones siete días antes de la dosis de carboplatino o inmediatamente después del tratamiento con carboplatino. Un grupo adicional se trató con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 antes y después de la administración de carboplatino. También se observó el efecto de estos regímenes de dosificación en los parámetros hematológicos.

[0078] Los grupos de ratones se trataron con carboplatino o vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) por administración ip en los días 7 y 8 tal como se expone a continuación. Se determinó previamente que la dosis óptima de carboplatino utilizada para inducir trombocitopenia en la cepa de ratón BALB / c era una dosis total fraccionada de 120mg / kg administradas en dos inyecciones diarias consecutivas (es decir, 2 x 60 mg / kg). Siete días antes de la primera dosis de carboplatino o una (1) hora después de la segunda dosis de carboplatino, se trataron grupos de ratones con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (300 ug / kg) o el vehículo (solución salina estéril, SS, libre de conservantes 0,9 % de cloruro de sodio) por inyección IV (bolo) tal como se expone en la Tabla 2. Un grupo adicional se trató con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 tanto antes (día 0) como después (Día 8, t = 1h) de la dosis de carboplatino. Todas las dosificaciones se realizaron en base al peso (100 ul / 10 g de peso corporal).

25

Tabla 2

Diseño del estudio:					
Gp	Nº	Dosis (iv) Día 0	Carboplatino (CBPL) [60 mg / kg, q2d], (ip), Días 7 & 8	Dosis (iv) Día 8 (1 h después de la 2ª dosis de CBPL)	Extracción de sangre Sac 5 ratones en los días
1	10	Vehículo (*SS)	Vehículo (PBS)	Vehículo (*SS)	14 & 26
2	20	Vehículo (*SS)	Carboplatino	Vehículo (*SS)	14, 18, 22 & 26
3	20	Compuesto de TPO PEGilado N° 1 300ug/kg	Carboplatino	Vehículo (*SS)	14, 18, 22 & 26
4	20	Vehículo (*SS)	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1 300ug/kg	14, 18, 22 & 26
5	20	Compuesto de TPO PEGilado N° 1 300ug/kg	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1 300ug/kg	14, 18, 22 & 26

[0079] En los días 14, 18, 22 y 26, se pesaron y luego se sacrificaron cinco ratones de cada grupo de ensayo mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron transferidas para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. Se analizaron los grupos de ratones de control (5) en los días 14 y 26. Los resultados se muestran en las Figs. 5 - 8. Los datos se presentan gráficamente como la media de grupo +SEM.

50

[0080] El tratamiento de ratones con carboplatino solo causaron disminuciones (aprox. 18 %) en los niveles de hemoglobina, el recuento de eritrocitos y hematocrito en los ratones supervivientes en los Días 18 y 22 en comparación con los grupos de control. Estas disminuciones se previnieron por la administración del Compuesto del TPO PEGilado N° 1 en el día 8 (1 hora después del segundo tratamiento con carboplatino) con o sin una dosis adicional de Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el día 0; sin embargo, la administración del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el Día 0 (solo) no afectó a los cambios inducidos por el carboplatino en estos parámetros de eritrocitos.

[0081] Todos los ratones del grupo de control experimentaron ganancia normal de peso entre los días 7 y 26, mientras que todos los ratones tratados con carboplatino solo perdieron pequeñas cantidades de peso corporal (un promedio del 4 %) durante el mismo período de tiempo. Los ratones de todos los grupos que fueron tratados con carboplatino y varios cotratamientos con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1, o mantuvieron el peso corporal mantenido o experimentaron un aumento de peso normal entre los días 7 y 26. El análisis de las medidas de peso corporal durante el período de estudio sugiere que el tratamiento con carboplatino fue el principal contribuyente a la disminución en el peso corporal observada y que el cotratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 evitó esta pérdida de peso, sin embargo, no se llevó a cabo un análisis estadístico. Las diferencias de los pesos corporales observados entre el Día 7 (antes de la dosificación con carboplatino) y el día 26 (finalización del estudio) se presentan en la figura. 8.

65

5 **[0082]** Todos los ratones de los grupos de control parecieron normales durante todo el período de estudio. Los ratones tratados con carboplatino solo comenzaron a mostrar un aspecto y comportamiento alterados a partir del Día 12, con signos frecuentes de encorvamiento y con aspecto desaliñado. Muchos ratones que recibieron carboplatino (sin o con tratamiento de Compuesto de TPO PEGilado N° 1) asumieron una posición encorvada y con aspecto desaliñado durante la última mitad del período de estudio. El tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el Día 8 con o sin tratamiento adicional en el Día 0 pareció retrasar la aparición de estos síntomas y el tratamiento en los días 0 y 8 redujo la severidad y la duración; sin embargo, no se llevó a cabo un análisis detallado de los efectos del tratamiento en las observaciones sistémicas.

10 EJEMPLO 3

15 **[0083]** Se observó el efecto del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en la duración y severidad de la anemia después de regímenes de dosificación en los que se administra el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en distintos momentos después del tratamiento con carboplatino. Para este estudio, se administró una cantidad del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 a los ratones, una (1) hora, un (1) día o cuatro (4) días después de una dosis de carboplatino.

20 **[0084]** Los grupos de ratones se trataron con carboplatino o vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) por administración ip en los días - 1 y 0 como se expone a continuación. Se determinó previamente que la dosis óptima de carboplatino utilizada para inducir trombocitopenia en la cepa de ratón BALB / c era una dosis total fraccionada de 120 mg / kg administradas en dos inyecciones diarias consecutivas (es decir, 2 x 60 mg / kg). Una hora (Día 0), un día (Día 1) o cuatro días (Día 4) después de la segunda dosis de carboplatino, se trataron los grupos de ratones con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (300 ug / kg) o el vehículo (solución salina estéril, SS, libre de conservantes 0,9 % de cloruro de sodio) por inyección IV (bolo) tal como se expone en la Tabla 3. La dosis se administró en base al peso (100 ul / 10 g de peso corporal).

25 **Tabla 3**

Grupos de tratamiento:					
Gp	Nº	Pretratamiento [2 x 60 mg / kg], (ip), Día -1 & 0	Artículo de prueba	Dosis (iv)	Extracción de sangre Sac 5 ratones en
1	10	Vehículo (PBS)	Vehículo (SS)	Control	Días 6 & 12
2	20	Carboplatino	Vehículo (SS)	Control	Días 6, 8, 10 & 12
3	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	300 ug / kg, Día 0	Días 6, 8, 10 & 12
4	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	300 ug / kg, Día 1	Días 6, 8, 10 & 12
5	20	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	300 ug / kg, Día 4	Días 6, 8, 10 & 12

Gp = Grupo; Sac = Sacrificado

35 **[0085]** En los días 6, 8, 10 y 12, se pesaron y luego se sacrificaron cinco ratones de cada grupo de ensayo mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron transferidas para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. Se analizaron los grupos de ratones de control (5) en los días 6 y 12. Los resultados se muestran en las Figs. 9 - 12. Los datos se presentan gráficamente como la media de grupo + SEM.

50 **[0086]** El tratamiento de los ratones con el carboplatino solo causó disminuciones dramáticas (de aprox. 47 %) en los niveles de hemoglobina, el recuento de eritrocitos y el hematocrito en los ratones supervivientes (2 ratones) en el día 12 en comparación con los grupos control. Estas disminuciones se evitaron mediante la administración del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el día 0 (1 hora después del tratamiento con carboplatino) y el día 1; sin embargo, la administración del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en el Día 4 no afectó a los cambios inducidos por el carboplatino en estos parámetros de eritrocitos.

60 **[0087]** Los ratones de todos los grupos tratados con carboplatino solo o carboplatino más las diferentes dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 experimentaron pérdida de peso en los días 6, 8, 10 y 12 respecto a las mediciones de peso corporal recogidas en el día - 1. El análisis de las medidas de peso corporal durante el período de estudio sugiere que el carboplatino fue el principal contribuyente en la disminución observada en el peso corporal. La administración del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en los días 0, 1 o 4 no parece afectar a la pérdida de peso asociada con el tratamiento con carboplatino, sin embargo, no se realizó un análisis estadístico. La disminución en el peso corporal observada entre el día 1 y el día 10 se presentan en la figura. 11.

65 **[0088]** Todos los ratones en los grupos de control parecieron normales durante todo el período de estudio. Los ratones tratados con carboplatino solo comenzaron a mostrar aspecto y comportamiento alterados a partir del Día 2 con signos

frecuentes de encorvamiento y pareciendo flácidos. Muchos ratones que recibieron carboplatino (con o sin tratamiento con Compuesto de TPO PEGilado N° 1) asumieron una posición encorvada y parecieron flácidos en la última mitad del periodo de estudio. Algunos de estos ratones también tenían áreas anogenitales sucias. Otras señales poco frecuentes incluyen parecer demacrados, con los párpados caídos y mostrando una marcha anormal. El tratamiento con Compuesto de TPO PEGilado N° 1 no parece tener un efecto dramático en el inicio, la frecuencia o la severidad de estos síntomas, sin embargo, no se llevó a cabo un análisis detallado.

[0089] Se observó que la prevención de la anemia inducida por el carboplatino cuando se administraron a los animales dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en las 24 horas posteriores a la quimioterapia. Estos datos sugieren que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 tiene efectos mieloprotectores que no se limitan al linaje de megacariocitos.

EJEMPLO 4

[0090] Se observó la capacidad del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 para funcionar como factor de supervivencia para los linajes de megacariocitos y eritrocitos en ratones tratados con carboplatino tal y como se determina por los cambios en los parámetros hematológicos. En estudios previos, se determinó que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en dosis tan bajas como 300 ug / kg evitan la anemia inducida por carboplatino. En este estudio, se examinó el efecto de dosis más bajas del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (es decir, 30, 100 y 300 ug / kg) en la supervivencia de los linajes de eritrocitos para caracterizar la respuesta a la dosis para este efecto.

[0091] Los grupos de ratones se trataron con carboplatino o vehículo (solución salina tamponada con fosfato, PBS) por administración ip en los días - 1 y 0 como se expone a continuación. Se determinó previamente que la dosis óptima de carboplatino utilizado para inducir trombocitopenia en la cepa de ratón BALB / c era una dosis total fraccionada de 120 mg / kg administradas en dos inyecciones diarias consecutivas (es decir, 2 x 60 mg / kg). Una hora después de la segunda dosis de carboplatino, los grupos de ratones se trataron con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 o el vehículo (solución salina estéril, SS, libre de conservantes 0,9 % de cloruro de sodio) por inyección IV (bolo) tal como se expone en la Tabla 4. La dosis se administró en base al peso (100 ul / 10 g de peso corporal).

Tabla 4

Grupos de tratamiento:					
Gp	Nº	Pretratamiento (ip), Día - 1 & 0	Artículo de prueba	Dosis (iv) Día 0	Extracción de sangre
1	10	Vehículo (PBS)	Vehículo (SS)	Control	Sac 5 ratones en los días 6 & 12
2	15	Carboplatino	Vehículo (SS)	Control	Sac 5 ratones en los días 6, 8 & 12
3	15	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	30ug/kg	Sac 5 ratones en los días 6, 8 & 12
4	15	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	100ug/kg	Sac 5 ratones en los días 6, 8 & 12
5	15	Carboplatino	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	300ug/kg	Sac 5 ratones en los días 6, 8 & 12

Gp = Grupo; Sac = Sacrificados

[0092] En los días 6, 8 y 12, se pesaron y luego se sacrificaron cinco ratones de cada grupo de ensayo mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron transferidas para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. Se analizaron los grupos de ratones de control (5) en los días 6 y 12. Los resultados se muestran en las figuras 13 - 14.

[0093] El tratamiento de ratones con carboplatino solo causó una disminución superior al 25 % en los niveles de hemoglobina en los ratones en el Día 12. Esta disminución fue totalmente inhibida por el tratamiento con todas las dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1. El Compuesto de TPO PEGilado N° 1 también inhibió eficazmente las disminuciones en el recuento de eritrocitos y hematocrito inducidas por el tratamiento con carboplatino.

[0094] Esencialmente, todos los ratones de todos los grupos tratados con carboplatino solo o carboplatino más las diferentes dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 experimentaron pérdida de peso en los días 6, 8 y 12 en relación a las medidas de peso corporal recogidas en el día - 1. El análisis de las medidas de peso corporal durante el periodo de estudio de 13 días indica que el tratamiento con carboplatino solo causó una disminución observada en el peso corporal. El Compuesto de TPO PEGilado N° 1 no parece afectar a la pérdida de peso o la recuperación en este estudio.

[0095] Los ratones tratados con carboplatino solo comenzaron a mostrar un aspecto y comportamiento alterados en el

Día 4. Algunos de los ratones asumieron una posición encorvada y tenían aspecto desaliñado. Muchos ratones también tenían heces blandas. Pocos animales parecieron flácidos y pocos presentaron sangre en las heces. El tratamiento con Compuesto de TPO PEGilado N° 1 disminuyó el inicio, la frecuencia y la gravedad de estos signos, de manera que parecían ser dependiente de la dosis.

[0096] El compuesto de TPO PEGilado N° 1 funcionó para mantener la supervivencia de los linajes de eritrocitos en ratones tratados con carboplatino como se determinó mediante el recuento de plaquetas de sangre periférica y otros parámetros hematológicos. Se encontró que todas las dosis del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 prevenían completamente la anemia inducida por carboplatino en el Día 12. Estos resultados sugieren una sensibilidad diferencial / capacidad de respuesta de los linajes megacariocitos y eritrocitos a los efectos de "mantenimiento" de la supervivencia del Compuesto de TPO PEGilado N° 1.

EJEMPLO 5

[0097] Se trataron grupos de ratones con dos rondas del agente quimioterapéutico (carboplatino) con diez días de diferencia, consistiendo cada ronda en dos días consecutivos de carboplatino (es decir, 70 mg / kg / día administrado en los días - 1 y 0 y los días 10 y 11) tal como se expone a continuación. La dosis de carboplatino utilizada para estos estudios de supervivencia excede la dosis máxima tolerada por los ratones (es decir, 120 mg / kg; administrada como 60 mg / kg / día en 2 días consecutivos). Una hora después de la segunda dosis de carboplatino de cada ronda (por ejemplo, el día 0 y 11) los ratones se trataron con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (100 ug / kg) o el vehículo (solución salina estéril, SS, cloruro de sodio libre de conservantes 0,9 %) por inyección IV (bolo) como se expone a continuación. La dosis se administró en base al peso (100 ul / 10 g de peso corporal).

Diseño del estudio:					
Gp	Nº	Pretratamiento (ip), Día -1 & 0, Día 10 & 11	Artículo de prueba 100 ug / kg (iv)	Dosis (iv) ~1h después de la 2ª dosis de CBPL dosis para cada ciclo	Análisis de la extracción de sangre Sac 5 ratones en
1	25	Vehículo (PBS)	Vehículo (*SS)	Control, Día 0 & 11	Días 7, 10, 18, 21 & 28
2	25	Carboplatino (70 mg / kg)	Vehículo (*SS)	Control, Día 0 & 11	Días 7, 10, 18, 21 & 28
3	25	Carboplatino (70 mg / kg)	Compuesto de TPO PEGilado N° 1	100 ug / kg, Día 0 & 11	Días 7, 10, 18, 21 & 28

[0098] En los días 7, 10, 18, 21 y 28 se pesaron y luego se sacrificaron cinco ratones de cada grupo de ensayo (25 ratones / grupo) mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron transferidas para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. Se analizaron los grupos de ratones de control de la misma manera. Los resultados se muestran en la figura. 15. El tratamiento de los ratones con dos rondas de carboplatino dio como resultado el desarrollo de una anemia moderada observada entre los días 10 y 21, mientras que, los ratones tratados con 2 rondas de carboplatino y el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 mantuvieron valores del hematocrito a lo largo de este período similares a los del grupo de control. Curiosamente, de los ratones que no se utilizaron para la evaluación hematológica, 7 ratones del grupo tratado con carboplatino solo murió entre los días 4 y 18, mientras que sólo 1 de ratón del grupo que recibió el tratamiento combinado expiró en el mismo plazo, ocurriendo la mayor parte de las muertes dentro del período de anemia. Estos resultados sugieren que la anemia inducida por carboplatino puede contribuir la muerte de los ratones que recibieron altos niveles de quimioterapia y que el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 puede funcionar para aumentar la supervivencia de los ratones previniendo el desarrollo de la anemia.

EJEMPLO 6

[0099] Para los estudios mecanísticos, se trataron los grupos de ratones con vehículo o con cantidades crecientes de carboplatino (es decir, 60, 70 o 80 mg / kg) durante 2 días consecutivos (día - 1 y día 0). Una hora después de la segunda dosis de carboplatino, los grupos de ratones se trataron con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (100 ug / kg) o el vehículo (solución salina estéril, SS, libre de conservantes 0,9 % de cloruro de sodio) por vía iv. Inyección (bolo) tal como se expone en la Tabla 5.

Tabla 5

Diseño del estudio:				
Gp	Nº	Dosis de CBPL Días -1 & 0 (ip)	Tratamiento (iv), Día 1, 1h después de CBPL	Extracción de sangre / Análisis Sac 3 ratones en
1	3	Vehicle (PBS)	Vehicle (*SS)	Day 15
2	3	Carboplatino (60 mg / kg)	Vehículo (*SS)	Día 15
3	3	Carboplatino (70 mg / kg)	Vehículo (*SS)	Día 15
4	3	Carboplatino (80 mg / kg)	Vehículo (*SS)	Día 15
5	3	Carboplatino (60 mg / kg)	Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 (100ug/kg)	Día 15
6	3	Carboplatino (70 mg / kg)	Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 (100ug/kg)	Día 15
7	3	Carboplatino (80 mg / kg)	Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 (100ug/kg)	Día 15

[0100] El día 15, se pesaron y luego se sacrificaron los ratones de todos los grupos del tratamiento mediante asfixia por CO₂ y se desangraron a través de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron transferidas para separar microcontenedores (de tapón violeta) EDTA para la evaluación hematológica. Además, se aislaron y analizaron para un examen histológico varios órganos (incluyendo el cerebro) de los ratones de control y los ratones tratados con 2 x 70 mg / kg carboplatino con y sin cotratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado Nº 1. Las secciones de estos tejidos se procesaron inmunohistoquímicamente para el fibrinógeno / fibrina.

[0101] El tratamiento de ratones con cantidades crecientes de carboplatino solo causó una caída dramática en el número de plaquetas en ratones que recibieron 2 x 70mg / kg el día 15 y una disminución dependiente de la dosis en el hematocrito (HCT) en ratones tratados con 60 y 70 mg / kg de carboplatino (solo). Estas disminuciones en los recuentos de plaquetas y glóbulos rojos inducida por el carboplatino fueron totalmente inhibidos por el tratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado Nº 1. Cabe señalar que todos los ratones tratados con 2 x 80 mg / kg de carboplatino (solo) o bien fueron encontrados muertos o fueron sacrificados (moribundos) antes del término del estudio. Curiosamente, todos los ratones tratados con 2 x 80 mg / kg de carboplatino y Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 sobrevivieron hasta el final del estudio programado y no mostraron trombocitopenia o anemia en el día 15.

[0102] La evaluación histológica de los cerebros de los ratones de control mostró pequeños vasos sanguíneos normales. Muchos de los vasos contenían glóbulos rojos y mostraban una mancha tenue de fibrinógeno. Se espera una tinción intravascular tenue para el fibrinógeno / fibrina en estos ratones de control, ya que el fibrinógeno es un componente normal del plasma. Las secciones de cerebro de los ratones tratados con carboplatino solo (2 x 70 mg / kg) contenían pequeños vasos sanguíneos que fueron totalmente ocluidos mediante la tinción de material intensamente positiva para fibrinógeno / fibrina. Estos microtrombos se observaron frecuentemente en secciones de tejido de todos los ratones de este grupo de dosis. Los pequeños vasos en secciones de cerebro de ratones tratados con carboplatino y Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 parecieron tinción normal o mostraron fibrinógeno / fibrina ligeramente más oscuro que el grupo de control. Tan solo se observó un fenómeno microtrombótico en el grupo de dosis completa.

[0103] Los resultados de este estudio indican que los fenómenos microtrombóticos son inducidos por la quimioterapia y, ya que se cree que los microtrombos contribuyen a la lisis mecánica de los glóbulos rojos, es probable que estos fenómenos vasculares contribuyan a la anemia inducida por quimioterapia. Además, la capacidad del Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 para prevenir el desarrollo de estos fenómenos trombóticos puede ser un componente del mecanismo por el que este agente previene el desarrollo de la anemia inducida por la quimioterapia. Por último, los fenómenos microtrombóticos también pueden haber contribuido a la mortalidad de los animales que recibieron altas dosis de quimioterapia. Por lo tanto, la capacidad del Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 para prevenir el desarrollo de estos fenómenos trombóticos puede ser responsable de la mayor supervivencia de los animales que recibieron la quimioterapia de dosis alta y el agente.

[0104] Las FIG. 18A y la FIG. 18B muestran el efecto del tratamiento del Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 en las plaquetas y el hematocrito de ratones tratados con carboplatino [como se expone en el Ejemplo 6].

[0105] La figura 19 muestra que la administración del Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 reduce la deposición de fibrinógeno y la formación de coágulos sanguíneos en las secciones de cerebro de ratones tratados con carboplatino como se expone en el Ejemplo 6.

MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO

[0106] La figura 16 muestra lo que se cree que es el mecanismo de acción de los efectos antianémicos del

Compuesto de TPO PEGilado N° 1. Como puede verse en la figura. 16, la quimioterapia induce daños en el endotelio de los vasos sanguíneos pequeños y suprime la hematopoyesis. En ausencia del Compuesto de TPO PEGilado N° 1, se desarrolla rápidamente una trombocitopenia ya que las plaquetas se activan mediante el endotelio alterado y se deposita en las paredes de los vasos sanguíneos circulantes pequeños. Las plaquetas alteradas, producidas por la médula ósea comprometida, contribuyen a este proceso. Las plaquetas activadas inducen la deposición de fibrina en los vasos dañados y se desarrollan trombos microangiopáticos. Estos trombos microangiopáticos median la destrucción mecánica de los glóbulos rojos de la sangre que contribuyen al desarrollo de la anemia inducida por quimioterapia. El cotratamiento con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 inhibe el daño inducido por la quimioterapia en el endotelio de los vasos sanguíneos y / o favorece las cualidades antitrombóticas y profibrinolíticas de las plaquetas circulantes. No se desarrollan trombos microangiopáticos y se mantiene la integridad estructural de los glóbulos rojos de la sangre. El efecto del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 en los precursores de megacariocitos de la médula ósea favorece la producción de plaquetas normales. La hemostasia se mantiene y la anemia se previene.

[0107] La figura 17 muestra lo que se cree que son algunos de los efectos del linaje en células hematopoyéticas del Compuesto de TPO PEGilado N° 1.

EJEMPLO 7

ENSAYO DE UNIÓN

[0108] La actividad de los compuestos peptídicos se puede determinar usando técnicas de ensayo de unidades luminiscentes relacionadas estándar. El ensayo emplea, por ejemplo, células murinas modificadas genéticamente para que expresen de forma estable el receptor de TPO humana y un constructo informador de luciferasa dirigido por el promotor fos. El ensayo puede realizarse como sigue: se exponen a concentraciones crecientes de rhTPO o compuesto peptídico células Baf / 3 privadas de suero hTPOr fos / lux que expresan el receptor de TPO humana, c - mpl (hTPOr), y un constructo informador de luciferasa durante 18 horas. Las células se incubaron entonces en un medio que contiene un sustrato de luciferasa y la luminiscencia de las células se midió usando un luminómetro.

[0109] Como se muestra en la figura. 20, el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 activó las células Baf / 3 que expresan TPO - R humana en un modo dependiente de la dosis. Como se muestra en la figura. 21, se observó una activación más fuerte de TPO - R cuando se estimularon las células con el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 que con TPO en la misma concentración. La EC₅₀ para el Compuesto de TPO PEGilado N° 1 fue de 5 pM.

[0110] Aunque sólo las realizaciones preferidas de la invención se han descrito específicamente, se apreciará que otras modificaciones y variaciones de la invención son posibles siempre que no se alejen del alcance pretendido de la invención.

REIVINDICACIONES

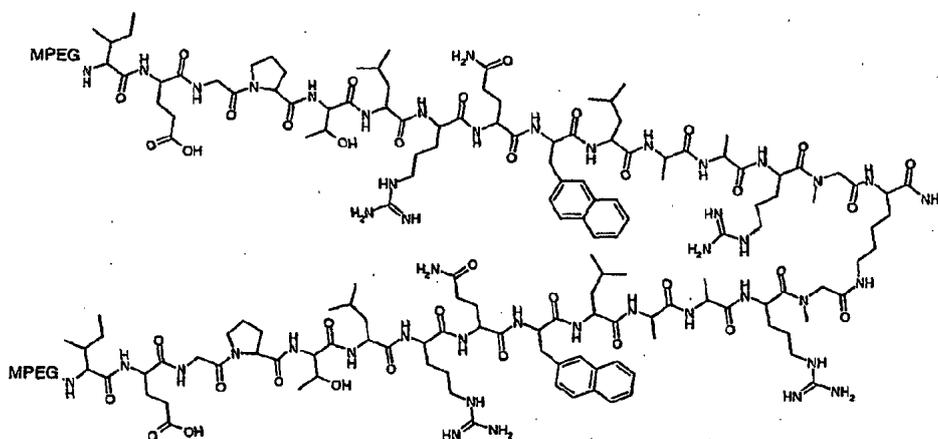
1. Un compuesto peptídico de TPO para su uso en un método para prevenir el desarrollo de la anemia después del tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz de dicho compuesto peptídico de TPO a un sujeto en necesidad del mismo, donde dicho compuesto peptídico de TPO comprende:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5);

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

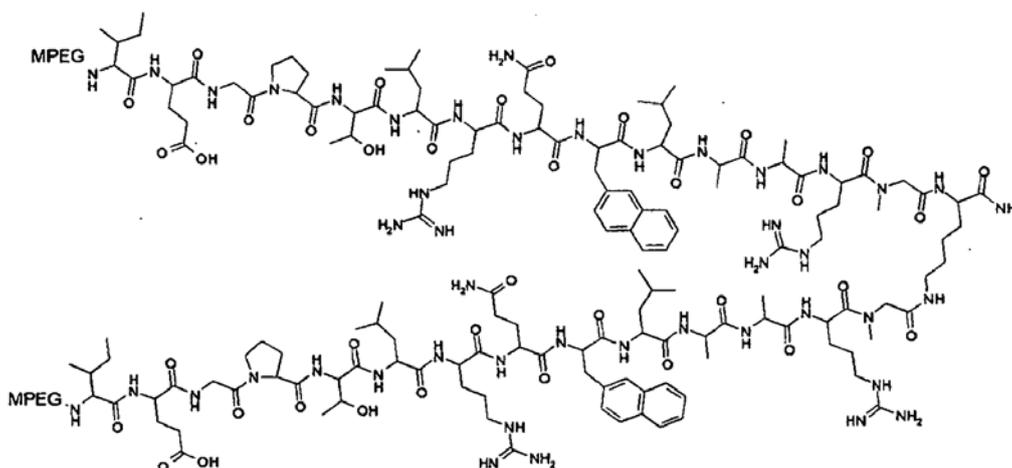
K(NH₂)

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)



donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) CON un peso molecular de 20.000 Daltons.

2. El compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto es un humano.
3. El compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto peptídico de TPO tiene inmunogenicidad reducida respecto a uno o más de rhTPO y rhIL - 11.
4. El compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1 en el que el compuesto peptídico de TPO tiene un perfil PK mejorado con respecto a uno o más de rhTPO y rhIL - 11.
5. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:
IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5).
6. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:



5

10

15

20 donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) con un peso molecular de 20.000 Daltons.

7. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 1, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:

25

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

K(NH₂)

30

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar) .

8. El compuesto peptídico de TPO para uso según las reivindicaciones 1, 5, 6 o 7, en el que dicho tratamiento se selecciona del grupo formado por tratamiento con agentes citotóxicos, agentes antitumorales y la radiación.
9. El compuesto peptídico de TPO para uso según las reivindicaciones 1, 5, 6 o 7, en el que dicha cantidad eficaz es de 1 ug a 300 ug / kg de peso corporal por día.
10. Un compuesto peptídico de TPO para uso en un método para aumentar la producción de células rojas de la sangre que comprende administrar una cantidad eficaz de dicho compuesto peptídico de TPO a un sujeto, en el que dicho compuesto peptídico de TPO comprende:

35

40

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5);

45

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

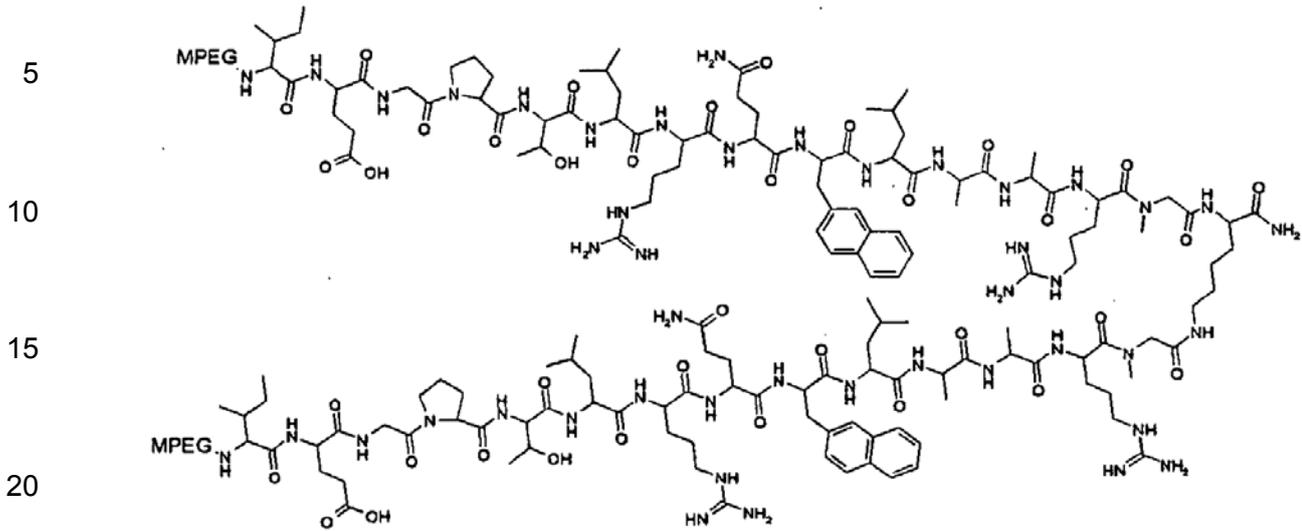
K(NH₂);

50

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

55

60

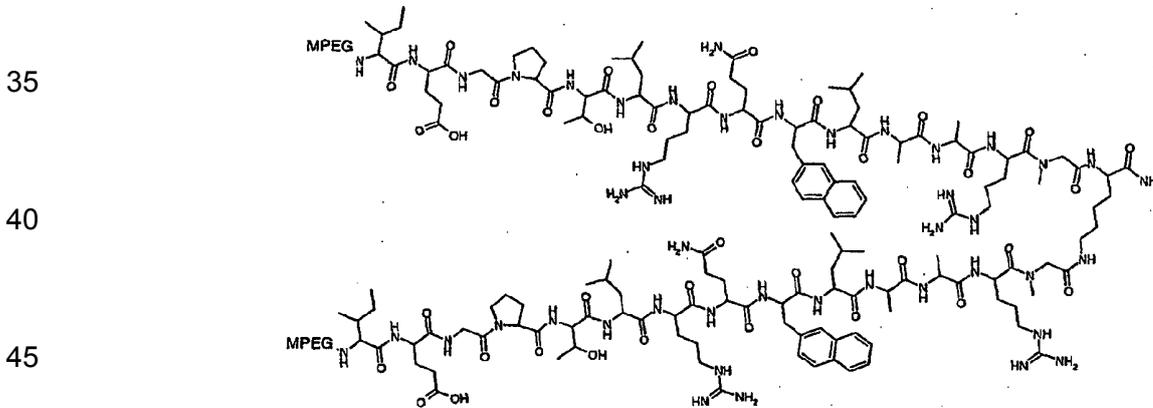


donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

- 25
11. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 10, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5).

- 30
12. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 10, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:



donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

- 50
13. Un compuesto peptídico de TPO para su uso según la reivindicación 10, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

55

K(NH₂)

60

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

- 65
14. El compuesto peptídico de TPO para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde dicho glóbulo rojo sanguíneo se selecciona del grupo formado por linaje específico de células precursoras de

eritrocitos, reticulocitos y eritrocitos.

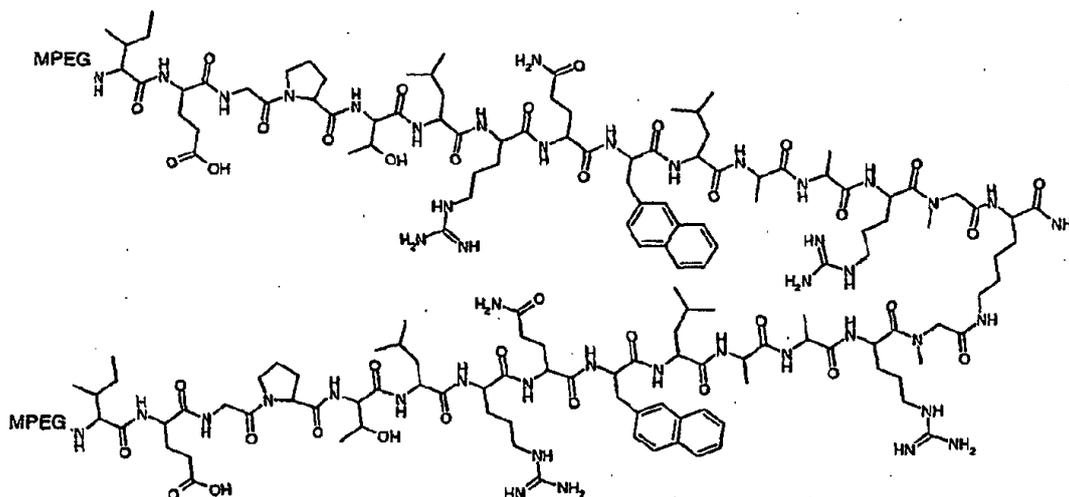
15. Una composición farmacéutica para uso en el aumento de la producción de glóbulos rojos de la sangre que comprende un compuesto peptídico de TPO en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho compuesto peptídico de TPO comprende:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5);

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

K(NH₂)

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)



donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

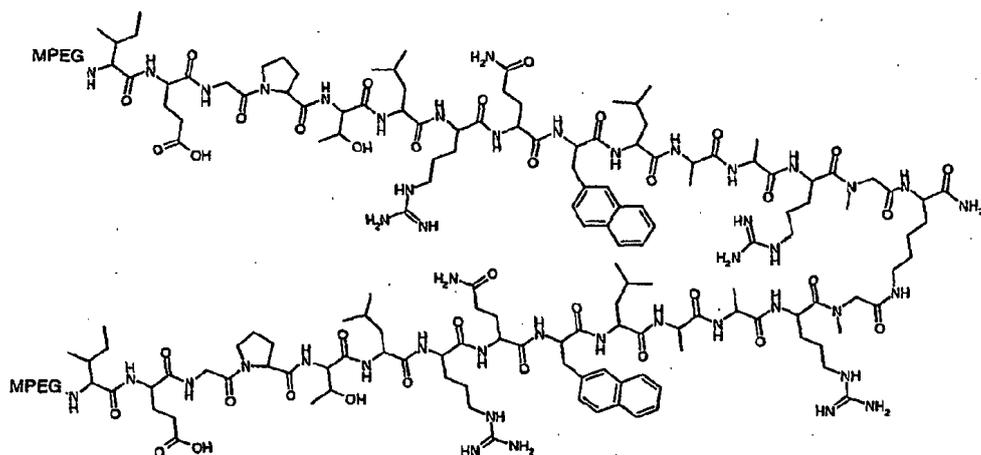
16. Un compuesto peptídico de TPO para su uso en un método de tratamiento de la anemia, que comprende una etapa de administrar una cantidad eficaz de dicho compuesto peptídico de TPO a un sujeto en necesidad del mismo, en donde dicho compuesto peptídico de TPO comprende:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5);

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

K(NH₂)

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)



donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

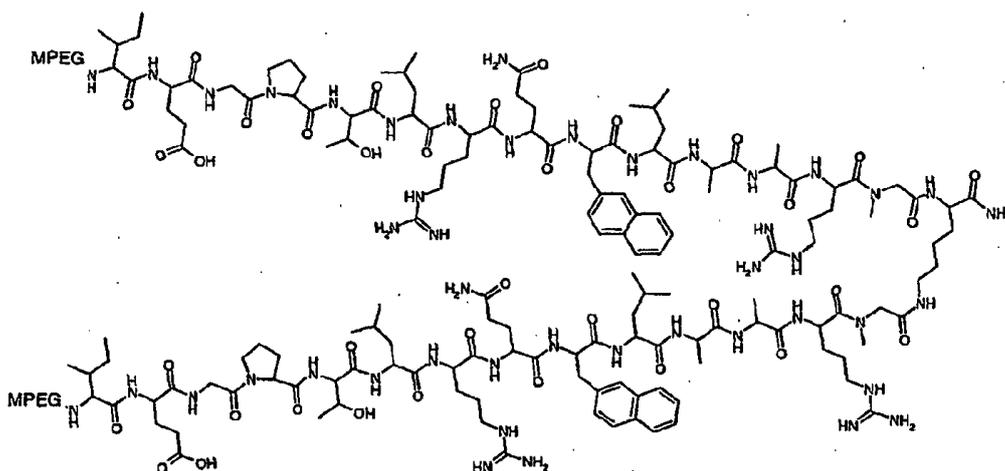
17. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la anemia, que comprende un compuesto peptídico de TPO en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho compuesto peptídico de TPO comprende:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5);

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

K(NH₂)

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

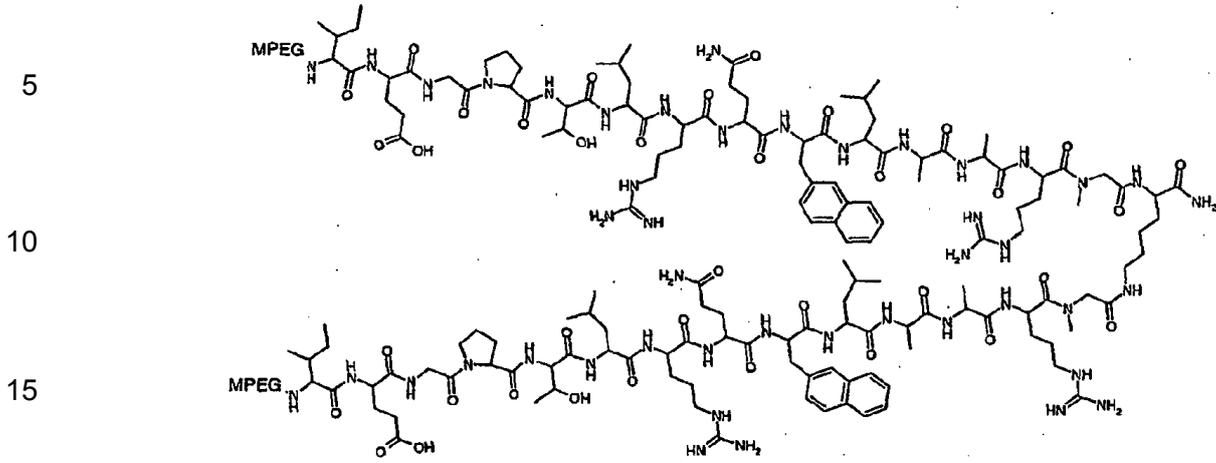


donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

18. Un compuesto peptídico de TPO o una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:

IEGPTLRQ (2 - Nal) LAAR (Sar) (SEC ID N°: 5).

19. Un compuesto peptídico de TPO o una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:



donde MPEG es metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de 20.000 Daltons.

20

20. Un compuesto peptídico de TPO o una composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, dicho compuesto peptídico de TPO comprende la siguiente estructura:

25

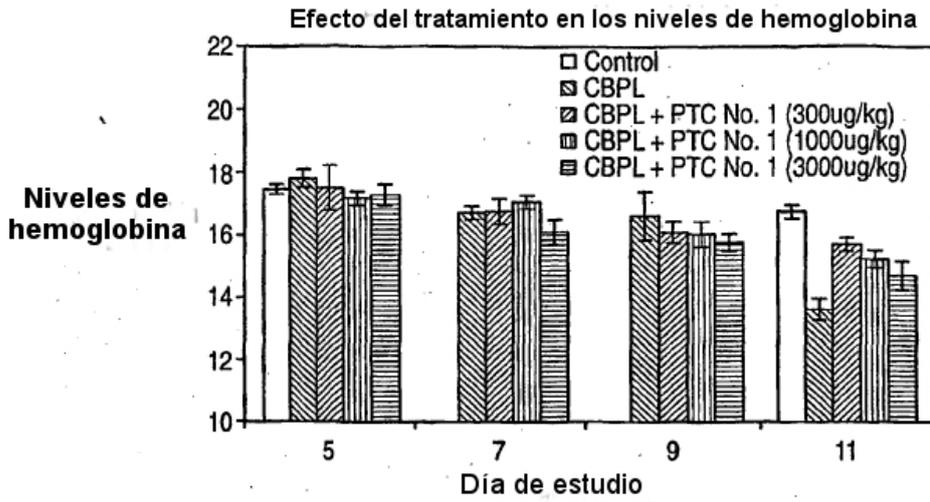
IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

30

K(NH₂)

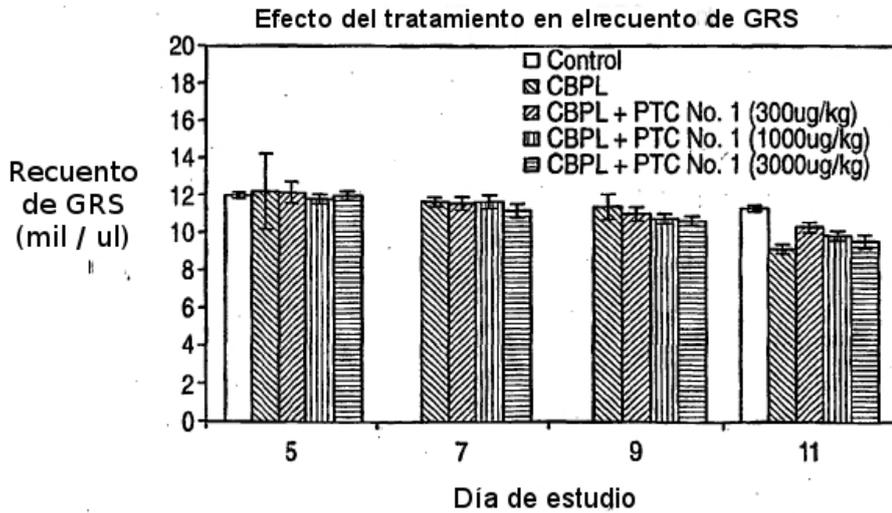
IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR (Sar)

FIG. 1



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

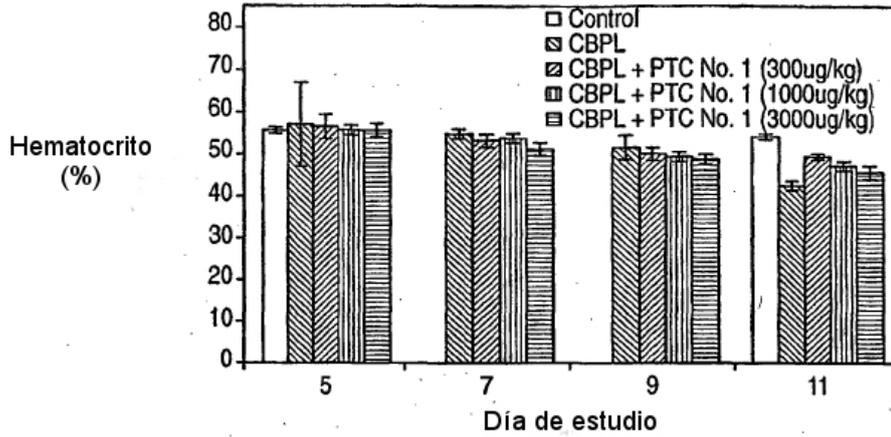
FIG. 2



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 3

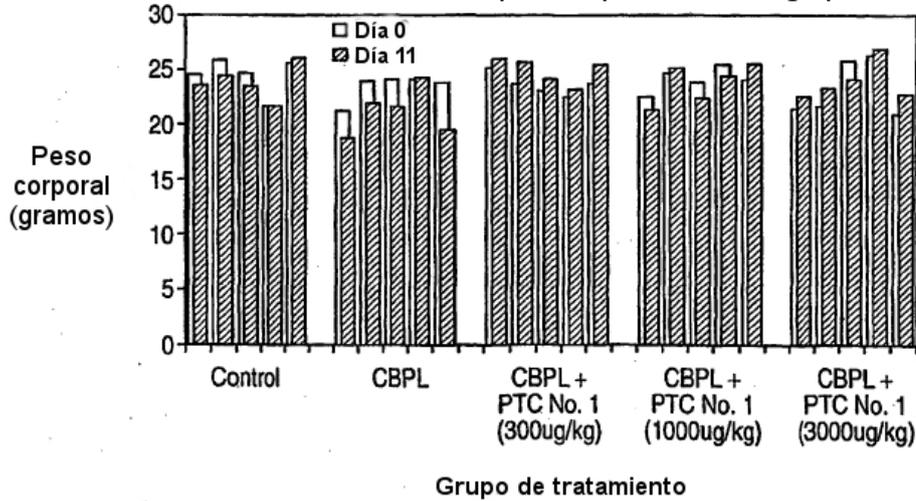
Efecto de tratamiento en el hematocrito



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

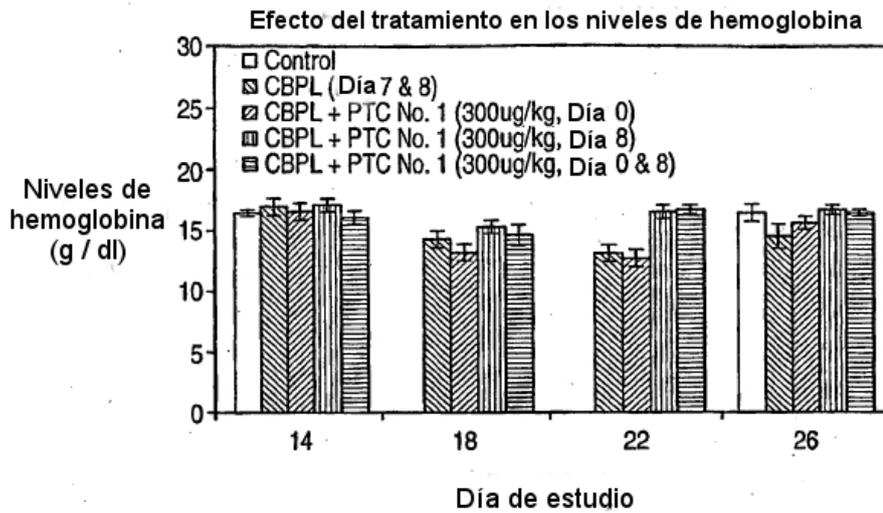
FIG. 4

Efecto del tratamiento en el peso corporal de un subgrupo de ratones



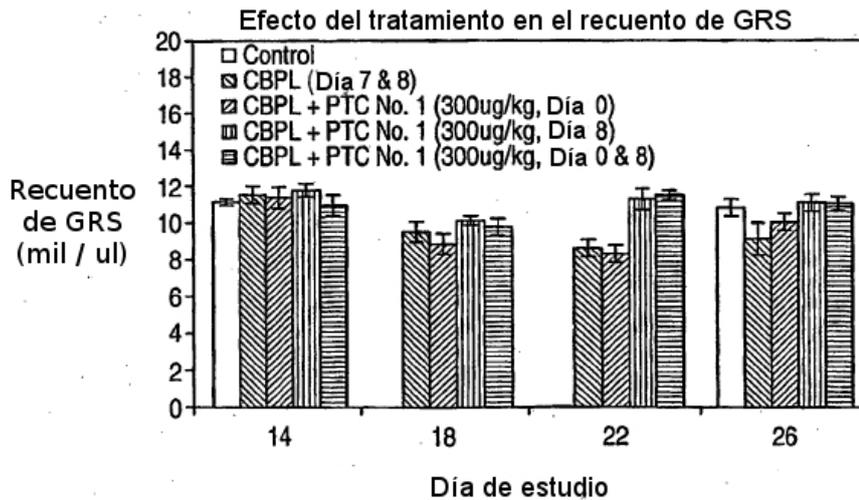
Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 5



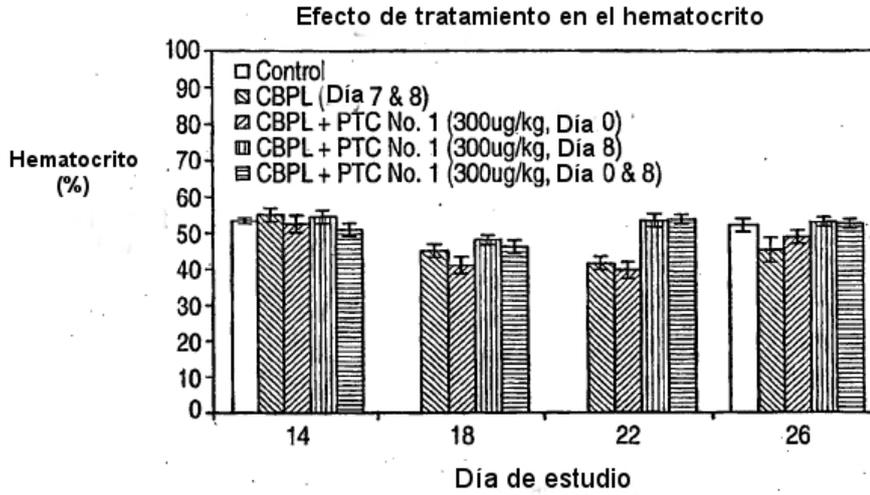
Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 = PTC Nº 1

FIG. 6



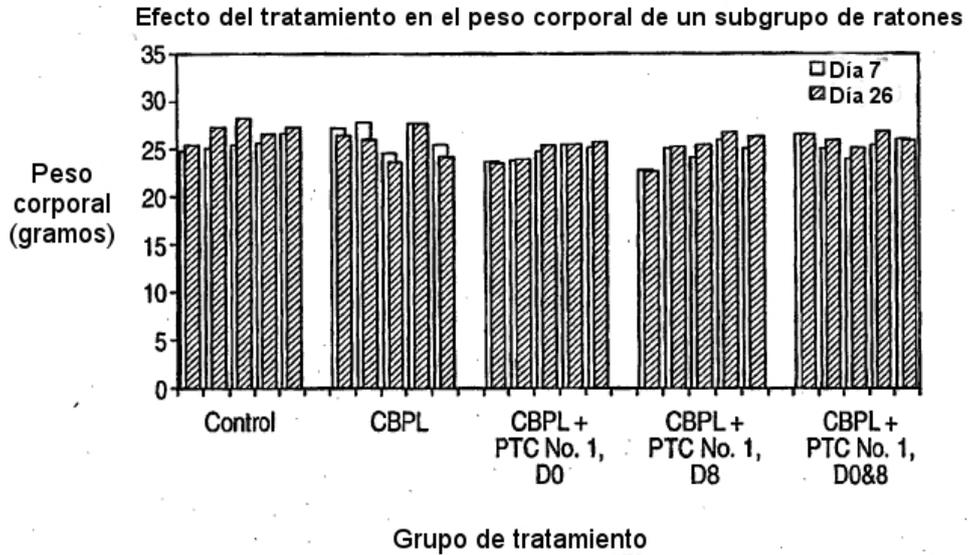
Compuesto de TPO PEGilado Nº 1 = PTC Nº 1

FIG. 7



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

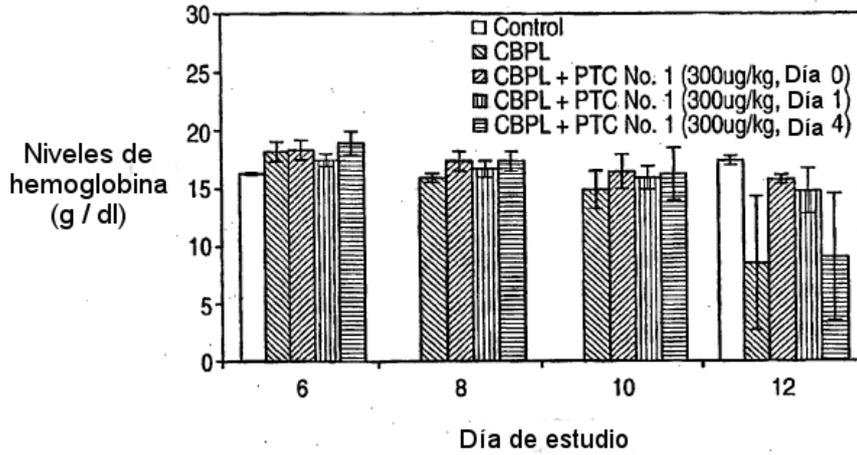
FIG. 8



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 9

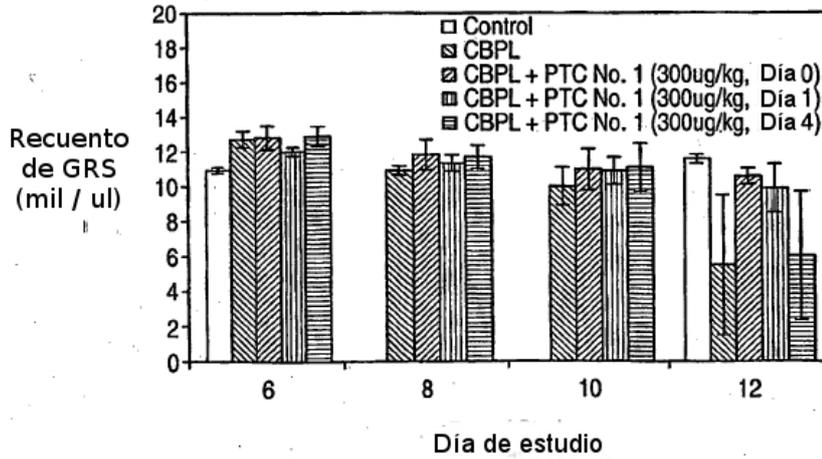
Efecto del tratamiento en los niveles de hemoglobina



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

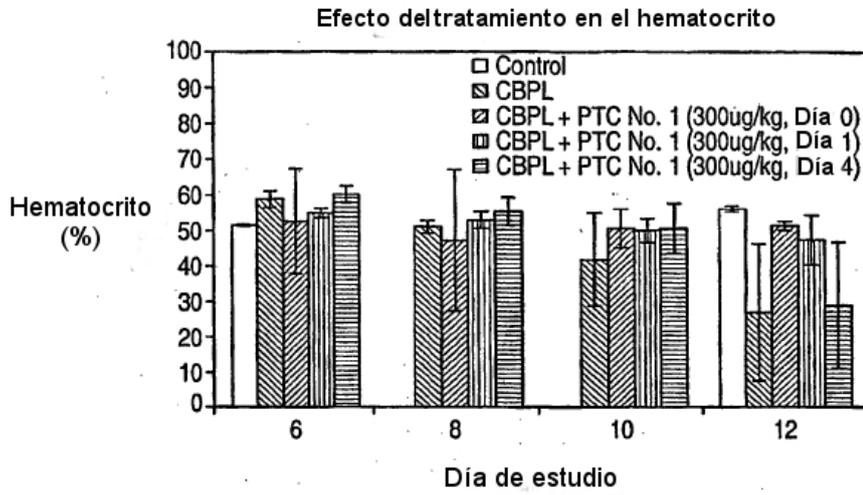
FIG. 10

Efecto del tratamiento en el recuento de GRS



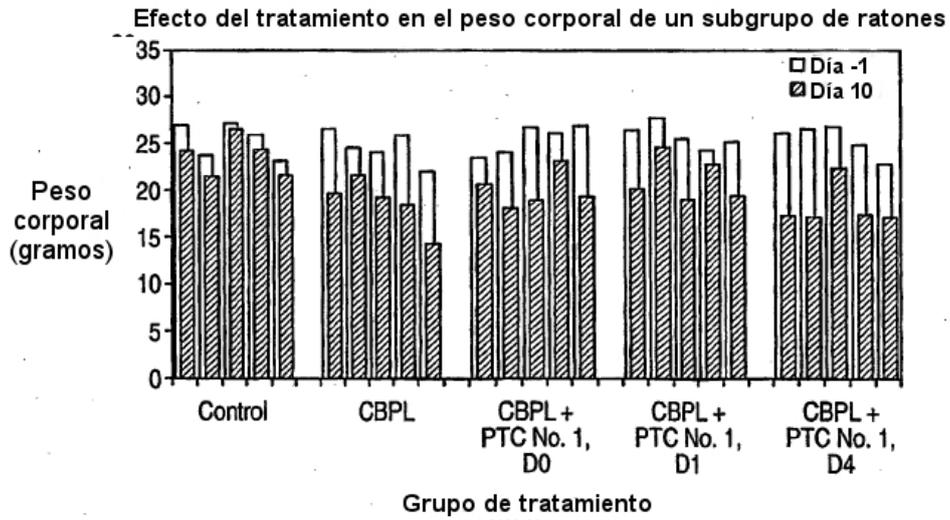
Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 11



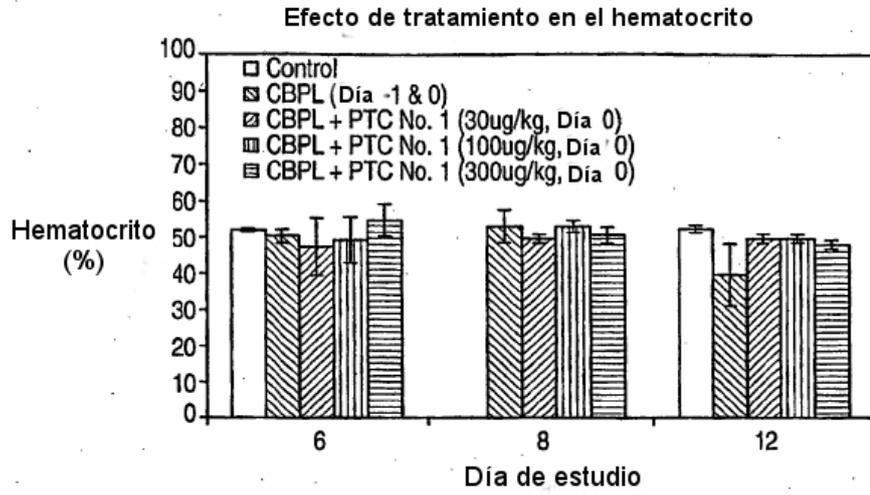
Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 12



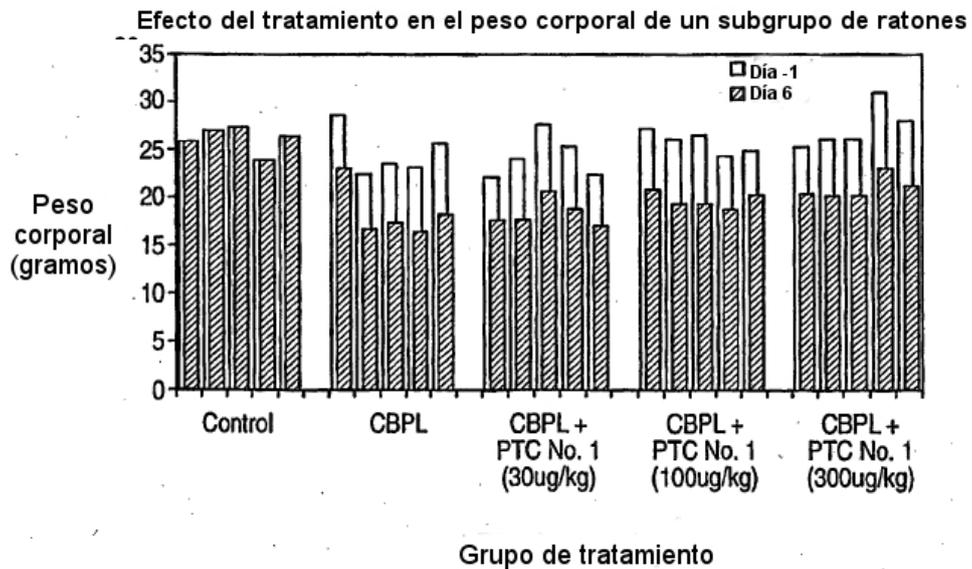
Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 13



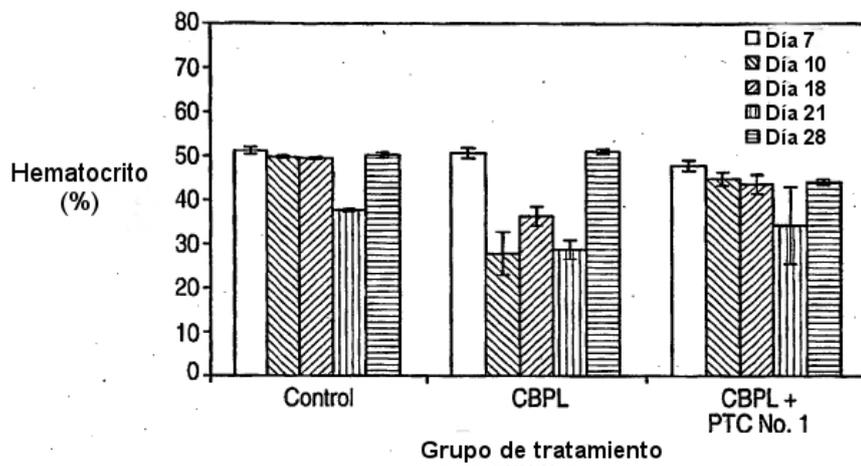
Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 14



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 15



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 16

PEG - TPO - mp: Efectos propuestos MOA / AntiAIQ

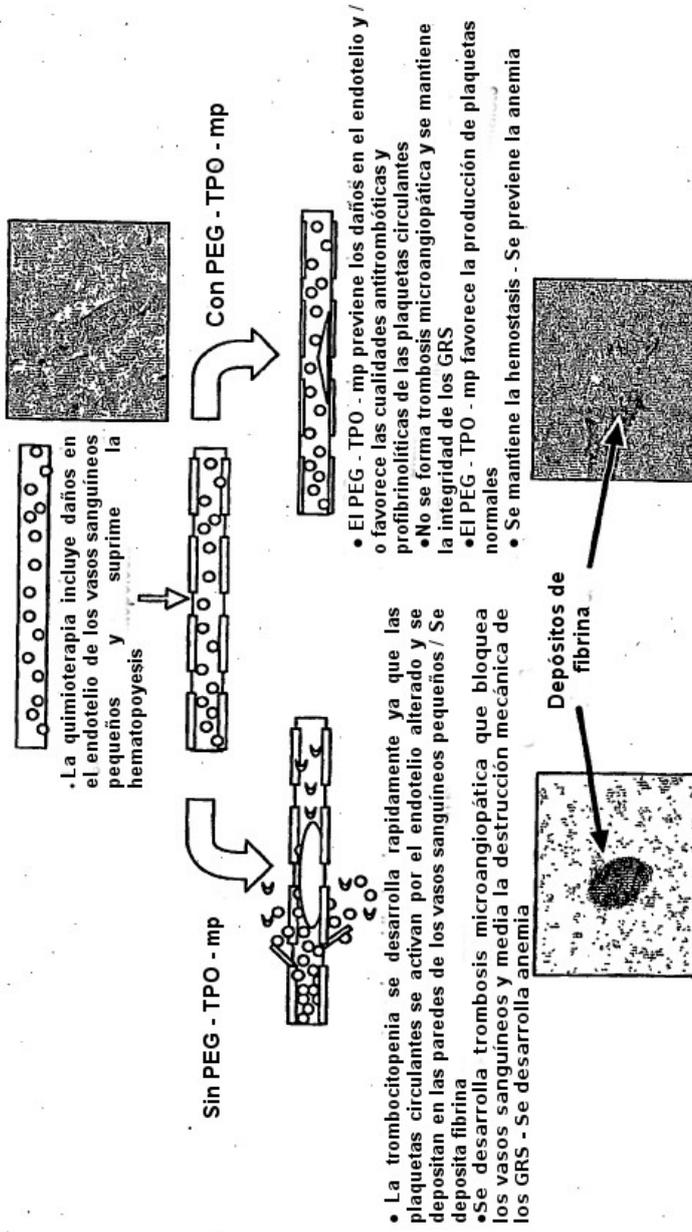


FIG. 17

Agonistas de TPO: Efectos multilineaje en células hematopoyéticas

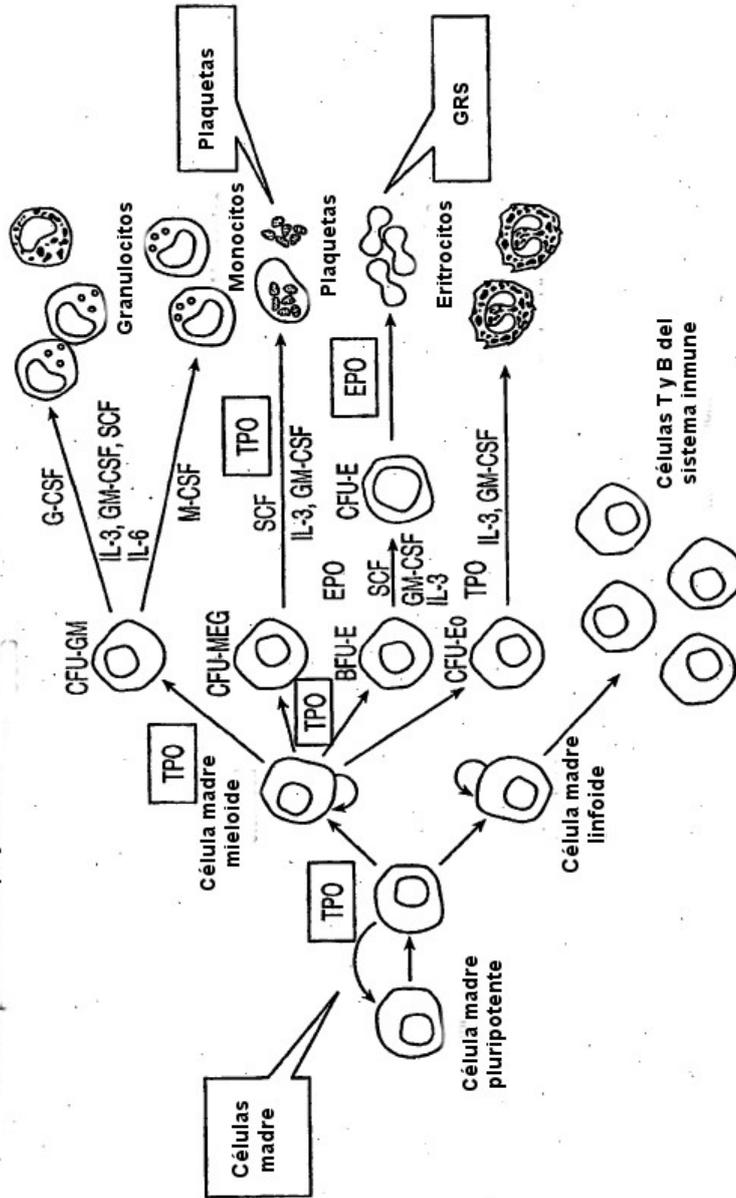
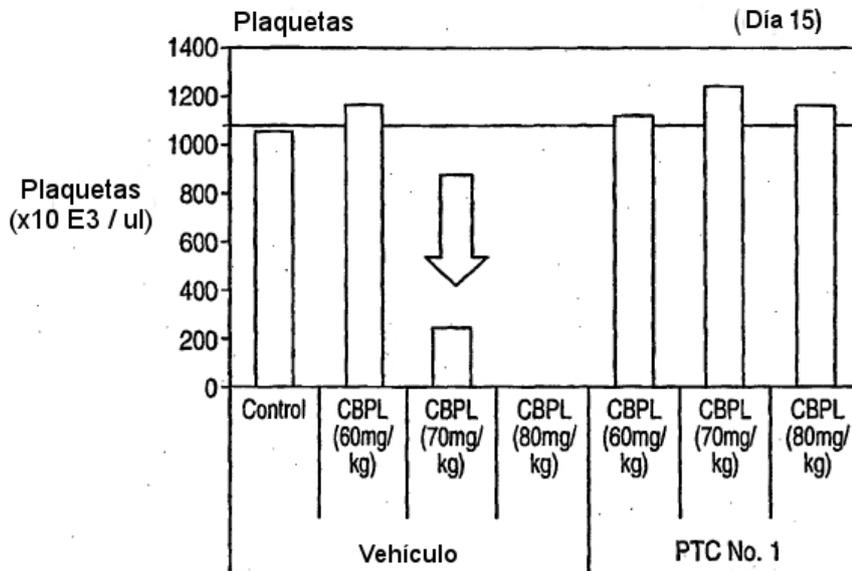


FIG. 18A

PTC No. 1 Prevención de AIQ y TIQ en ratones - Estudio mecánico

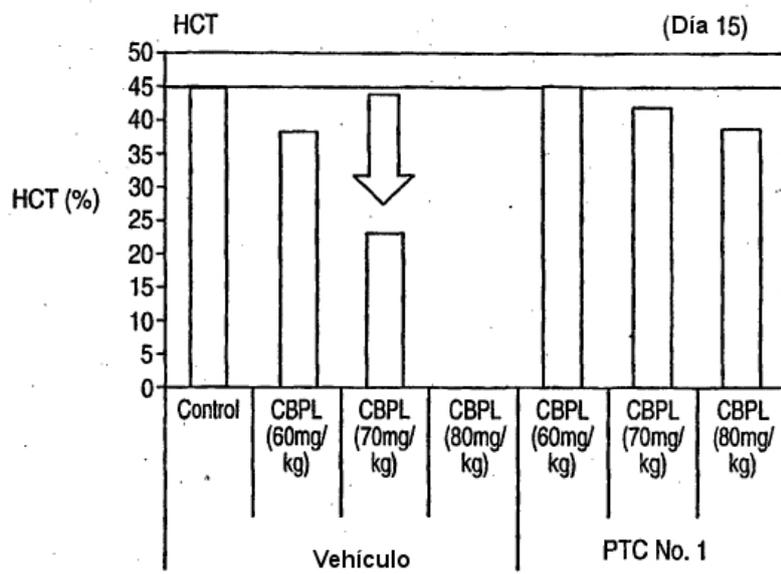


• IHC realizada en corazón, cerebro y riñones para fibrinógeno

Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 18B

PTC No. 1 Prevención de AIQ y TIQ en ratones - Estudio mecanístico

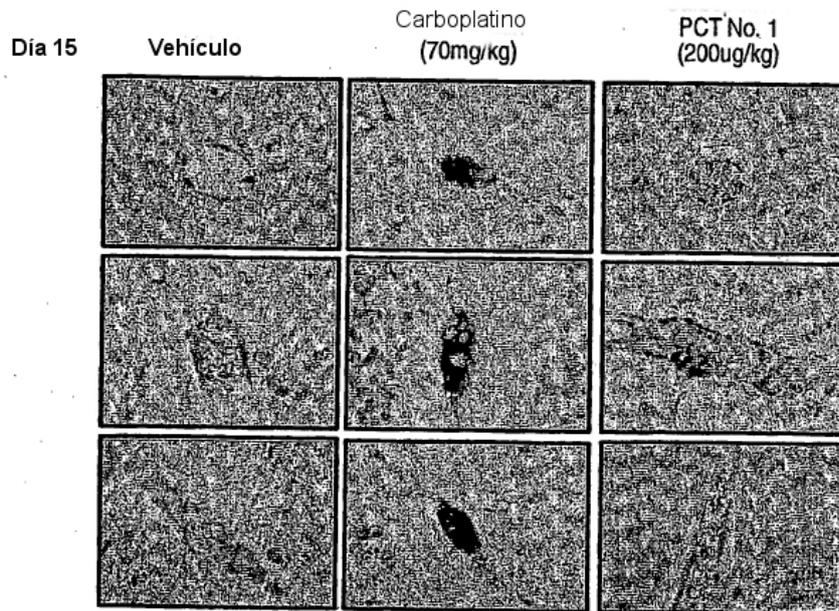


• IHC realizada en corazón, cerebro y riñones para fibrinógeno

Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 19

Deposición de fibrinógeno reducida y coágulos sanguíneos en secciones de cerebro de ratones tratados con CBP



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1

FIG. 20

Efecto del Compuesto de TPO PEGilado N° 1 (PTC N° 1)
en la activación del receptor de TPO en células Baf / 3

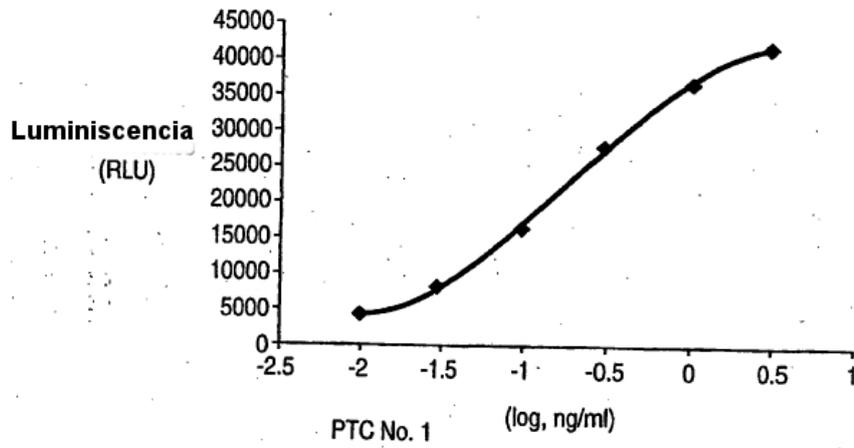
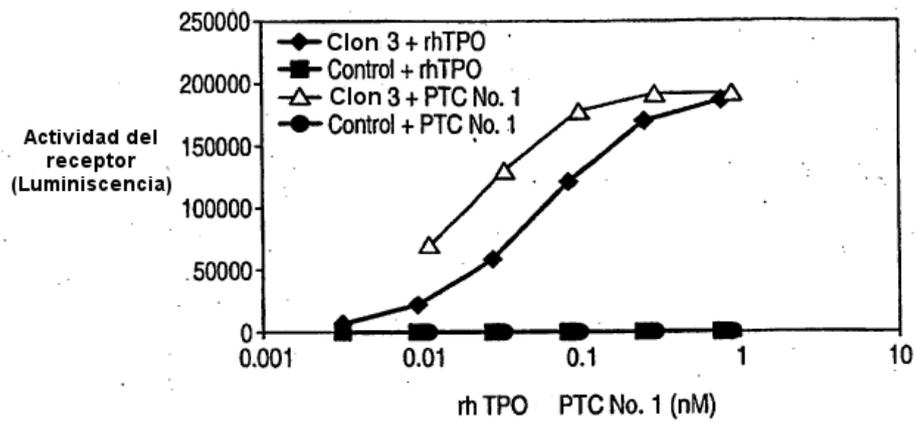


FIG. 21



Compuesto de TPO PEGilado N° 1 = PTC N° 1