

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 107**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2004** **PCT/US2004/026422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2005** **WO05023834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2004** **E 04781153 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 1675606**

54 Título: **Péptidos y compuestos que se unen al receptor de trombopoyetina**

30 Prioridad:

28.08.2003 US 498740 P

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

24.07.2017

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 08560, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 626 107 T3

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

DESCRIPCIÓN**Péptidos y compuestos que se unen al receptor de trombopoyetina****CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona compuestos peptídicos que se unen y activan el receptor de trombopoyetina (c-mpl o TPO-R) o de otro modo actuar como un agonista de TPO. La invención tiene aplicación en los campos de la bioquímica y la química medicinal y particularmente proporciona agonistas de TPO para uso en el tratamiento de la enfermedad humana.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los megacariocitos son células derivadas de médula ósea, que son responsables para la producción de plaquetas sanguíneas en circulación. Aunque comprenden <0,25% de las células de médula ósea en la mayoría de las especies, tienen >10 veces el volumen de células típicas de la médula. Véase Kuter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 11104-11108 (1994). Los megacariocitos sufren un proceso conocido como endomitosis por la que replican sus núcleos pero fracasan al sufrir división celular y con ello dan lugar a células poliploides. En respuesta a una disminución del recuento de plaquetas, aumenta la velocidad de endomitosis, se forman megacariocitos de ploidia superiores y el número de megacariocitos puede aumentar hasta 3 posiciones. Véase Harker, J. Clin. Invest., 47: 458 465 (1968). En contraste, en respuesta a un recuento de plaqueta elevado, la tasa endomitótica se disminuye, se forman megacariocitos de ploidia inferiores y el número de megacariocitos puede disminuir en un 50%.

El mecanismo de retroalimentación fisiológico exacto por el cual la masa de plaquetas circulantes regula la tasa endomitótica y el número de megacariocitos de médula ósea no se conoce. Ahora se piensa que el factor trombopoyético circulante implicado en la mediación de este bucle de realimentación es trombopoyetina (TPO). Más específicamente, la TPO ha mostrado ser el principal regulador humoral en situaciones que implican trombocitopenia. Véase, por ejemplo, Metcalf, Nature, 369: 519 520 (1994). TPO se ha demostrado en varios estudios para aumentar el recuento de plaquetas, aumenta el tamaño de las plaquetas y aumenta la incorporación de isótopos en plaquetas de animales receptores. Específicamente, se piensa que la TPO afecta la megacariocitopoyesis de varias formas: (1) produce aumentos en el tamaño de megacariocitos y número; (2) produce un aumento en el contenido de ADN, en forma de poliploidía, en megacariocitos; (3) aumenta la endomitosis de los megacariocitos; (4) produce mayor maduración de los megacariocitos; y (5) produce un aumento en el porcentaje de células precursoras, en la forma de pequeñas células positivas en acetilcolinesterasa, en la médula ósea.

Las plaquetas (trombocitos) son necesarias para la coagulación de la sangre. Cuando su número sea muy bajo, un paciente está en grave riesgo de muerte por hemorragia catastrófica. por lo tanto, la TPO tiene aplicación útil potencial tanto en el diagnóstico como el tratamiento de diversos trastornos hematológicos, por ejemplo, enfermedades primariamente debidas a los defectos plaquetarios. Ensayos clínicos en curso con TPO han indicado que TPO puede administrarse de forma segura a los pacientes. Además, estudios recientes han proporcionado una base para la proyección de la eficacia de la terapia de TPO en el tratamiento de trombocitopenia y particularmente la trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia de radiación o trasplante de médula ósea como tratamiento para el cáncer o linfoma. Véase, por ejemplo, McDonald, Am. J. Ped. Hematology/Oncology 14: 821-(1992).

El gen que codifica TPO ha sido clonado y caracterizado. Véase Kuter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91: 11104-11108 (1994); Cebada, et al., Cell 77: 11171124 (1994); Kaushansky et al., Nature 369: 568 571-(1994); Wendling, et al., Nature, 369: 571 574 (1994); y Sauvage et al., Nature 369: 533-538 (1994). La trombopoyetina es una glicoproteína con al menos dos formas, con masas moleculares aparentes de 25 kDa y 31 kDa, con una secuencia de aminoácidos N-terminal común. Véase, Bartley, et al., Cell, 77: 11171124 (1994). Trombopoyetina parece tener dos regiones distintas separadas por un sitio de escisión potencial Arg-Arg. La región aminoterminal está altamente conservada en el hombre y el ratón, y tiene alguna homología con eritropoyetina y interferon-a y interferon-b. La región carboxiterminal muestra amplia divergencia entre especies.

Las secuencias de ADN y secuencias de péptido codificado para TPO-R humano (también conocido como c-mpl) se han descrito. Véase Vigon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89: 5640-5644 (1992). TPO-R es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de hematopoyetina, una familia caracterizada por un diseño estructural común del dominio extracelular, incluyendo cuatro residuos C conservados en la porción N-terminal y un motivo WSXWS (SEQ ID NO: 1) cerca de la región transmembrana. Véase Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 6934-6938 (1990). La evidencia de que este receptor juega un papel funcional en la hematopoyesis incluye observaciones de que su expresión se restringe a bazo, médula ósea o hígado fetal en ratones (véase Souyri, et al., Cell 63: 11371147 (1990)) y a megacariocitos, plaquetas y células CD34+ en humanos (véase Methia, et al., Blood 82: 13951401-(1993)). Además, la exposición de células CD34+ a oligonucleótidos sintéticos antisentido para mpl ARN inhibe significativamente la aparición de colonias megacariocíticas sin afectar eritroide o la formación de colonias mieloides. Algunos trabajadores postulan que el receptor funciona como un homodímero, similar a la situación con los receptores para G-CSF y eritropoyetina.

La disponibilidad de los genes clonados para TPO-R facilita la búsqueda de agonistas de este importante receptor. La disponibilidad de la proteína del receptor recombinante permite el estudio de la interacción de receptor-ligando en una variedad de sistemas de generación de diversidad peptídica aleatoria y semialeatoria. Estos sistemas se describen en la Patente de Estados Unidos N^{os} 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. Sci. EE.UU. 87: 63786382 (1990).

De Serres *et al.*, Stem Cells (1999) 17: 316 326 discute la farmacocinética y los efectos hematológicos de la GW395058 mimético péptido de trombopoyetina PEGilado en ratas y monos después de la administración intravenosa o subcutánea.

La recuperación lenta de los niveles de plaquetas en pacientes que sufren de trombocitopenia es un problema grave, y ha hecho urgente la búsqueda de un agonista del factor de crecimiento sanguíneo capaz de acelerar la regeneración de plaquetas. La presente invención proporciona tal agonista.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a compuestos de bajo peso molecular definidos de péptidos de peso que tienen fuertes propiedades de unión a la TPO-R, puede activar el TPO-R, y, potencialmente, permitir efectos secundarios reducidos en comparación con los agonistas de TPO conocidos. Por consiguiente, los compuestos peptídicos pueden ser útiles para fines terapéuticos en el tratamiento de condiciones mediadas por la TPO (por ejemplo, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de médula ósea), así como con fines de diagnóstico en el estudio del mecanismo de la hematopoyesis y para el *in vitro* expansión de megakarocytes y células progenitoras comprometidas.

Los compuestos peptídicos adecuados para fines terapéuticos y/o diagnósticos tienen un Cl_{50} de aproximadamente 2 mM o menos, determinada por, por ejemplo, el ensayo de afinidad de unión expuesto en el Ejemplo 3 de la Patente de EE.UU. N^o 5.869.451, en la que un menor Cl_{50} se correlaciona con una más fuerte afinidad de unión a TPO-R. El ensayo en la Patente de Estados Unidos N^o 5.869.451 es el siguiente: Las afinidades de unión de compuestos peptídicos se miden en un ensayo de unión competitiva. Los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con 1 mg estreptavidina, se bloquearon con PBS/BSA al 1%, seguido de 50 ng de anticuerpo inmovilizante de antirreceptor biotinilado (Ab179). Los pocillos se tratan entonces con una dilución 1:10 de la cosecha TPO-R soluble. Varias concentraciones de compuesto peptídico se mezclan con una cantidad constante de una forma truncada de TPO que consiste en los residuos 1156 fusionados al C-termino de la proteína de unión a maltosa (MBPTPO₁₅₆). Las mezclas de péptido MBPTPO₁₅₆ se añadieron a los pocillos recubiertos de TPO-R, se incubaron durante 2 horas a 4°C y después se lavaron con PBS. La cantidad de MBPTPO₁₅₆ que está enlazado en el equilibrio se mide por la adición de un antisuero de conejo dirigido contra MBP, seguido por IgG anti-conejo de cabra conjugada por fosfatasa alcalina. La cantidad de fosfatasa alcalina en cada pocillo se determina entonces utilizando métodos estándar. El ensayo se realizó en un intervalo de concentraciones del compuesto de péptidos y los resultados se representan gráficamente de tal manera que el eje Y representa la cantidad de límite MBPTPO₁₅₆ y el eje X representa la concentración de compuesto peptídico. Se puede entonces determinar la concentración a la que el compuesto peptídico se reducirá en un 50% (Cl_{50}) la cantidad de MBPTPO₁₅₆ unido a TPO-R inmovilizada. La disociación constante (K_d) para el péptido debe ser similar a la Cl_{50} medida utilizando estas condiciones de ensayo. Para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen preferiblemente un Cl_{50} de no más de aproximadamente 100 pM, más preferiblemente, no más de 500 nM. En una realización preferida, el peso molecular del compuesto de péptido es de aproximadamente 250 a aproximadamente 8.000 daltons. Si los compuestos peptídicos de esta invención se oligomerizan, dimerizan y/o derivan con un polímero hidrófilo como se describe en la presente memoria, los pesos moleculares de dichos compuestos peptídicos serán sustancialmente mayores y pueden variar desde aproximadamente 500 a aproximadamente 120.000 daltons, más preferiblemente desde alrededor de 8.000 a alrededor de 80.000 daltons.

Cuando se utilizan para fines de diagnóstico, los compuestos peptídicos de la presente invención preferiblemente se marcan con un marcador detectable y, en consecuencia, los Compuestos peptídicos sin una etiqueta tal sirven como intermedios en la preparación de compuestos peptídicos marcados.

Un compuesto peptídico que satisfacen los criterios definidos para el peso molecular y afinidad de unión por TPO-R comprende 9 o más aminoácidos en los que los aminoácidos son aminoácidos de origen natural o sintético (no natural).

De acuerdo con ello, los compuestos peptídicos preferidos comprenden un compuesto que tiene:

- (1) un peso molecular de menos de aproximadamente 5000 daltons, y
- (2) una afinidad de unión a TPO-R tal como se expresa por un Cl_{50} de no más de aproximadamente 100 μ M,

en el que de cero a la totalidad de los enlaces $--C(O)NH--$ del compuesto peptídico han sido reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste de un enlace $CH_2OC(O)NR--$; un enlace fosfonato; un enlace

--CH₂S(O)₂NR--; un enlace --CH₂NR--; un enlace --C(O)NR⁶; y un enlace --NHC(O)NH-- donde R es hidrógeno o alquilo inferior y R⁶ es alquilo inferior, además en el que el N-término de dicho compuesto peptídico se selecciona del grupo que consiste en un grupo NRR¹; un grupo --NRC(O)R; un grupo --NRC(O)OR; un grupo --NRS(O)₂R; un grupo --NHC(O)NHR; un grupo succinimida; un grupo benciloxicarbonilo-NH--; y un grupo benciloxicarbonilo-NH-- que tiene de 1 a 3 sustituyentes en el anillo fenilo seleccionado del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro, y bromo, donde R y R¹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior, y aún más en el que el C-término de dicho compuesto peptídico tiene la fórmula C(O)R², donde R² se selecciona del grupo que consiste en hidróxi, alcoxi inferior, y NR₃R₄, donde R³ y R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior y donde el átomo de nitrógeno del grupo -NR³R⁴ puede ser opcionalmente el grupo amina del N-término del péptido a fin de formar un péptido cíclico y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

También se describe aquí un compuesto peptídico marcado que comprende un compuesto de péptido descrito como anteriormente que tiene unido covalentemente al mismo un marcador capaz de detección. En particular, el compuesto de péptido central comprende (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂KNH₂, en la que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o β-alanina, en el que 2-nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto es covalentemente unido a un polímero hidrófilo de acuerdo con las reivindicaciones. Cuando X₁₀ es una sarcosina, el compuesto tiene la siguiente estructura:



\



/



en el que (2-Nal) es β-(2-naftilo)alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ ID NO: 7). Este compuesto peptídico, que también puede ser representado por la siguiente estructura (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAAR(Sar))₂KNH₂ se denomina aquí "Compuesto TPO N° 1".

Polímeros hidrófilos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polialquiléteres como se ejemplifica por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, derivados de celulosa y celulosa, derivados de dextrano y dextrano, etc., como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.451.

Los compuestos peptídicos descritos en el presente documento son útiles para la prevención y tratamiento de enfermedades mediadas por la TPO, y particularmente para el tratamiento de trastornos hematológicos, incluyendo, pero no limitado a, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de médula ósea. Por lo tanto, la presente invención también proporciona compuestos para su uso en un método para el tratamiento en el que un paciente que tiene un trastorno que es susceptible al tratamiento con un agonista de TPO recibe, o se administra, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto peptídico de la presente invención.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos peptídicos descritos en el presente documento y un portador 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 muestra y compara la actividad de Compuesto TPO N° 1 a un compuesto peptídico de la técnica anterior (que en todo el presente documento como "compuesto peptídico de la técnica"). La diferencia entre Compuesto TPO N° 1 y el compuesto peptídico de la técnica anterior es que el compuesto peptídico de la técnica anterior tiene una β-(1-naftilo)alanina (1-Nal) donde (2-Nal) está en Compuesto TPO N° 1.

FIG. 2 muestra y compara la actividad de Compuesto TPO PEGilado N° 1 de compuesto peptídico de la técnica anterior PEGilado.

FIG. 3 muestra y compara el cambio *in vivo* en los recuentos de plaquetas en la rata que demuestra la potencia relativa de Compuesto TPO PEGilado N° 1 de compuesto peptídico de la técnica anterior PEGilado.

FIGs. 4 y 5 muestran y comparan el número y el volumen de plaquetas circulantes de una manera dependiente de la dosis, respectivamente, en el uso de compuesto peptídico de la técnica anterior pegilado y el uso de Compuesto TPO PEGilado N° 1.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

I. Definiciones y parámetros generales

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

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

"Compuesto peptídico" se refiere a una molécula que se hidroliza en aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o sustitutos de aminoácidos.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a que el metal alcalino no tóxico, metal alcalinotérreo, y sales de amonio utilizado comúnmente en la industria farmacéutica incluyendo las sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario, amonio, y sales de zinc de protamina, que se preparan por 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 de esta invención con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales representativas incluyen las sales de clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, napsilato, y similares.

"Sal de adición de ácido aceptable farmacéuticamente" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades de las bases libres biológicas y que no son biológicamente o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Para una descripción de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., *supra*.

"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*, 4ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1992), 393-396 y las referencias citadas en el mismo, y Mark, *et al.*, *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1980).) El componente de alcohol del éster comprenderá generalmente (i) un alcohol alifático C₂-C₁₂ que puede o no puede contener uno o más dobles enlaces y que puede o no puede contener carbonos ramificados o (ii) alcoholes aromáticos o heteroaromáticos C₇-C₁₂. Esta invención también contempla el uso de aquellas composiciones que son tanto ésteres tal como se describe en el presente documento como al mismo tiempo son las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.

"Amida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas amidas que retienen, tras la hidrólisis del enlace amida, la eficacia biológica y las propiedades del ácido carboxílico o amina y no son biológicamente o de otra manera indeseables. Para una descripción de amidas farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, FT., 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 amida se puede lograr a través de técnicas sintéticas convencionales. (Véase, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1992), p. 393 y Mark, *et al.*, *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1980).) Esta invención contempla también el uso de aquellas composiciones que son tanto amidas tal como se describe en el presente documento y al mismo tiempo son las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.

"Portador farmacéuticamente o terapéuticamente aceptable" se refiere a un medio de portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el huésped o

paciente.

"Estereoisómero" se refiere a un compuesto químico que tiene el mismo peso molecular, composición química, y constitución que otro, pero con los átomos agrupados de manera diferente. Es decir, determinados restos químicos idénticos están en orientaciones diferentes en el espacio y, por lo tanto, cuando puras, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica que es tan leve que es indetectable con la instrumentación actual. Los compuestos 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.

"Cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente efectiva" tal 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, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado implicará típicamente una disminución en las respuestas inmunológicas y/o inflamatorias a la infección o lesión tisular.

Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian del siguiente modo: 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, t-Buo es terc-butiloxi, Bzl es bencilo, CHA es ciclohexilamina, Ac es acetilo, Me es metilo, Pen es penicilamina, Aib es ácido aminoisobutírico, Nva es norvalina, Abu es ácido aminobutírico, Thi es tienilalanina, OBn es O-bencilo y hyp es hidroxiprolina.

Los análogos peptídicos de arco utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "peptidomiméticos" o "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos" (Luthman, *et al.*, A Textbook of Drug Design and Development, 14: 386 406, segunda Ed, Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante, Angew Chem. Int. Ed. Engl., 33: 1699-1720 (1994); Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber y Freidinger TINS, p. 392 (1985); y Evans, *et al.*, J. Med. Chem. 30: 1229 (1987) Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos útiles se pueden usar terapéuticamente para producir un efecto equivalente o mejorado terapéutico o profiláctico. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como en estado natural polipéptido receptorbinding, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace alternativo tal como $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, etc. por métodos conocidos en la técnica y además se describen 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, AF, Vega Data (marzo de 1983), vol. 1, Issue 3, modificaciones del esqueleto peptídico (revisión general); Morley, Trends Pharm. Sci. pp 463 468 (1980), (revisión general); Hudson, *et al.*, Int. J. Pept. Prot. Res., 14: 177 185 (1979); Spatola, *et al.*, Life Sci., 38: 12431249 (1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 307314 (1982); Almquist, *et al.*, J. Med. Chem., 23: 13921398, (1980); JenningsWhite, *et al.*, Tetrahedron Lett. 23: 2533 (1982); Szelke, *et al.*, Appin Europea. EP 45665 (1982); Holladay, *et al.*, Tetrahedron Lett., 24: 44014404 (1983); y Hruby, Life Sci, 31: 189-199 (1982). Un enlace no peptídico particularmente preferido es $-\text{CH}_2\text{NH}-$. Tales miméticos de péptidos pueden tener ventajas significativas sobre realizaciones de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo: producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros. El etiquetado de los peptidomiméticos usualmente implica la unión covalente de una o más etiquetas, directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a la posición en el peptidomimético que se predice por datos de actividad de estructura cuantitativa y/o modelado molecular que no interfiere. Tales posiciones no interferentes en general son posiciones que no forman contactos directos con las macromoléculas (por ejemplo, moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas) a la que el peptidomimético se une 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 receptor se unen al receptor con alta afinidad y poseen una actividad biológica detectable (es decir, son agonistas o antagonistas a uno o más cambios fenotípicos mediados por receptor).

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

"Marcador detectable" se refiere a materiales, que cuando se unen covalentemente a los compuestos peptídicos de esta invención, permiten la detección de los compuestos de péptidos *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 con la cantidad de marcador para ser empleado, así como la toxicidad de la etiqueta en la cantidad de marcador empleada. La selección de la etiqueta en relación con dichos factores está bien dentro de la experiencia de la técnica.

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

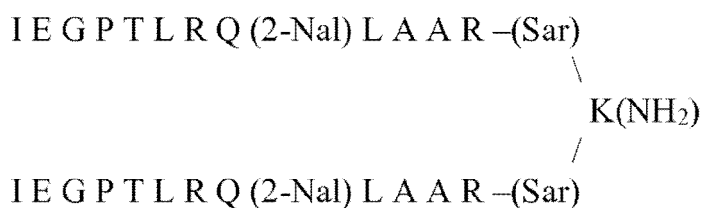
II. Visión de conjunto

La presente invención proporciona compuestos peptídicos que se unen a y activan el TPO-R o de otra forma se comportan como un agonista de TPO de acuerdo con las reivindicaciones. Estos compuestos peptídicos incluyen compuestos peptídicos "principales" y "derivados" construidos de manera que tenga la misma o similar estructura molecular o forma que los compuestos peptídicos principales pero que difieren de los compuestos peptídicos principales, ya sea con respecto a la susceptibilidad a la hidrólisis o proteólisis y/o con respecto a otras propiedades biológicas, tales como aumento de la afinidad por el receptor. La presente invención también proporciona composiciones, de acuerdo con las reivindicaciones, que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto peptídico, y más particularmente un compuesto peptídico, que es útil para el tratamiento de trastornos hematológicos y, particularmente, la trombocitopenia asociada con quimioterapia, radioterapia o transfusiones de médula ósea.

Se encontró que el compuesto peptídico central puede comprender una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2): X₉ X₈ G X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇, donde X₆ puede ser β-(2-naftilo)alanina y donde X₉ es A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T, o V; y X₈ es A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T, o V. Más preferentemente, X₉ es A o I; y X₈ es D, E, o K. Además X₁ es C, L, M, P, Q, V; X₂ es F, K, L, N, Q, R, S, T o V; X₃ es C, F, I, L, M, R, S, V, o W; X₄ es cualquiera de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente; X₅ es A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V o Y; y X₇ es C, G, I, K, L, M, N, R o V.

Sin embargo, como se describe adicionalmente en este documento, se ha encontrado que mediante la sustitución de X₆ con β-(2-naftilo)alanina, el compuesto proporciona propiedades diferentes de compuesto que contiene β-(1-naftilo)alanina. En consecuencia, un péptido particularmente preferido incluye la secuencia de aminoácidos (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂K-NH₂, en el que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o β-alanina, en el que 2-Nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto se une covalentemente a un polímero hidrófilo.

Un compuesto peptídico preferido es de la siguiente manera:



en el que (2-Nal) es β -(2-naftilo)alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ ID NO: 7). Este compuesto peptídico se denomina aquí como "Compuesto TPO N° 1".

Compuestos peptídicos que tienen una CI_{50} de más de aproximadamente 100 mM carecen de unión suficiente para permitir el uso en cualquiera de los aspectos de diagnóstico o terapéuticos de esta invención. Preferiblemente, para fines de diagnóstico, los compuestos peptídicos tienen un CI_{50} de aproximadamente 2 mM o menos y, para fines farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen una CI_{50} de aproximadamente 100 μ M o menos.

FIG. 1 compara la actividad de tres diferentes lotes de Compuesto TPO N° 1 con un lote de compuesto peptídico de la técnica anterior utilizando técnicas de ensayo de unidades luminiscentes relativas estándar. El ensayo emplea células murinas de ingeniería genética para expresar de forma estable el receptor de TPO humano y un constructo indicador de luciferasa dirigido por el promotor fos. La diferencia entre el Compuesto TPO N° 1 y el compuesto peptídico de la técnica anterior es que el compuesto peptídico de la técnica anterior tiene un β -(1-naftilo)alanina (1 Nal) donde el (2-Nal) está en Compuesto TPO N° 1. El Compuesto TPO N° 1 se refiere como 2-Nal y el compuesto peptídico de la técnica anterior se conoce como 1-Nal (técnica anterior) en la FIG. 1. Como se muestra en la FIG. 1, la actividad es similar para cada compuesto.

FIG. 2 compara la actividad de varios lotes diferentes de Compuesto TPO PEGilado N° 1 (pegilación de los compuestos de la presente invención se describe con más detalle a continuación) para varios lotes de compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior. Ambos lotes del compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior de alta actividad previa con esencialmente el mismo nivel de actividad que el compuesto peptídico de la técnica anterior no PEGilado. Las líneas restantes ilustran la actividad de diferentes lotes de Compuesto TPO PEGilado N° 1. Como se muestra en la FIG. 2, en este modelo, los últimos tienen menos actividad en relación con los compuestos peptídicos PEGilados de la técnica anterior. Compuesto TPO PEGilado N° 1 se conoce como compuesto peptídico de la técnica anterior PEG-2-Nal y PEGilada se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en la FIG. 2.

FIG. 3 demuestra la potencia relativa de compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior y Compuesto TPO PEGilado N° 1. A través de un modelo de rata, la FIG. 3 muestra el cambio *in vivo* en los recuentos de plaquetas después de la administración de compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior y Compuesto TPO PEGilado N° 1. Como se muestra en la FIG. 3, la dosis más alta del compuesto TPO PEGilado N° 1 tiene la misma actividad que la dosis más baja del compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior. Un compuesto menos potente puede proporcionar un estímulo menos drástico a la célula diana, lo que podría reducir el riesgo de efectos secundarios causados por sobreestimulación de la célula diana, tales como trombocitopenia exacerbada tras subsiguiente ciclo de quimioterapia. El Compuesto TPO PEGilado N° 1 se conoce como compuesto peptídico de la técnica anterior PEG2-Nal y PEGilada se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en la FIG. 3.

FIGs. 4 y 5 muestran los resultados de un estudio de respuesta a la dosis cara a cara de un compuesto peptídico PEGilado de la técnica anterior y Compuesto TPO PEGilado N° 1 en ratones normales. El Compuesto TPO PEGilado N° 1 se conoce como compuesto peptídico de la técnica anterior PEG2-Nal y PEGilada se conoce como PEG-1-Nal (técnica anterior) en las FIGs. 4 y 5. FIG. 4 muestra los aumentos en los niveles de plaquetas y la FIG. 5 muestra volumen medio de plaquetas seis (6) días después del tratamiento. El intervalo de dosis era de 10 a 3000ug/kg. Ambos compuestos peptídicos aumentaron el número de plaquetas circulantes de una manera dependiente de la dosis con incrementos relativos al grupo de control observado a dosis tan bajas como 30ug/kg para ambos compuestos. En la respuesta máxima, estos compuestos peptídicos elevaron recuentos de plaquetas a niveles que eran hasta 4 posiciones mayores que los valores de control. Las curvas de dosis-respuesta para estos compuestos peptídicos fueron muy similares, indicando que en este modelo no hubo esencialmente ninguna diferencia entre los dos artículos de prueba sobre la base de estos criterios de valoración.

IV. Preparación de compuestos peptídicos

A. Síntesis en fase sólida

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

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

Los grupos protectores alfaamino son los conocidos por ser útiles en la técnica de la síntesis por etapas de péptidos. Grupos incluidos son protectores de tipo acilo (por ejemplo, formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos aromáticos protectores de tipo uretano (por ejemplo, benciloxicarboilo (Cbz) y Cbz sustituido), grupos de uretano alifáticos protectores (por ejemplo, t-butiloxicarbonilo (Boc), isopropiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, bencilo, trifenilmetilo). Boc y Fmoc son grupos protectores preferidos. El grupo protector de cadena lateral permanece intacto durante el acoplamiento y no se separa durante la desprotección del protector de amino-término o durante el acoplamiento. El grupo protector de cadena lateral debe ser extraíble a la finalización de la síntesis del péptido final y bajo condiciones de reacción que no alterarán el péptido objetivo.

La cadena lateral de los grupos protectores para Tyr incluyen tetrahidropiraniolo, terc-butilo, trilito, bencilo, Cbz, Z--br--CBZ, y 2,5-diclorobencilo. La cadena lateral de los grupos protectores para Asp incluyen bencilo, 2,6-

diclorobencilo, metilo, etilo y ciclohexilo. La cadena lateral de los grupos protectores para Thr y Ser incluyen acetilo, benzoilo, tritilo, tetrahidropiraniilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, y Cbz. El grupo protector de cadena lateral para Thr y Ser es bencilo. La cadena lateral de los grupos protectores para Arg incluyen nitro, tosilo (Tos), Cbz, adamantiloxicarbonilo mesitoilsulfonilo (Mts) o Boc. La cadena lateral de los grupos protectores para Lys incluyen Cbz, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-BrCbz), Tos, o Boc.

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

Después de la secuencia de aminoácidos deseada ha sido completada, el péptido deseado es desacoplado del soporte de resina mediante tratamiento con un reactivo tal como ácido trifluoroacético o fluoruro de hidrógeno (FH), que no sólo escinde el péptido de la resina, sino que también escinde todos los grupos protectores restantes de la cadena lateral. Cuando se usa la resina clorometilada, los resultados del tratamiento de fluoruro de hidrógeno en la formación de los ácidos peptídicos libres. Cuando se usa la resina de benzhidrilamina, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno resulta directamente en el amida de péptido libre. Alternativamente, cuando se emplea la resina clorometilada, el péptido protegido de cadena lateral puede ser desacoplado por tratamiento de la resina peptídica con amoníaco para dar la amida protegida de cadena lateral deseada o con una alquilamina para dar una alquilamida o dialcilamida protegida por cadena lateral. La protección de la cadena lateral se elimina a continuación de la forma habitual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para dar las amidas libres, alquilamidadas, o dialquilamidadas.

Estos procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen en más detalle por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Peptide Syntheses* (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

B. Aminoácidos sintéticos

Estos procedimientos también se pueden utilizar para sintetizar péptidos en los que los aminoácidos distintos de los 20 de origen natural, aminoácidos codificados genéticamente están sustituidos en una, dos o más posiciones de cualquiera de los compuestos de la invención. Uno puede sustituir las cadenas de origen natural laterales de los 20 aminoácidos codificados genéticamente (o aminoácidos D) con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos tales como alquilo, alquilo inferior, alquilo cíclico de 4, 5, 6, a 7 miembros, amida, amida de alquilo inferior, diamida (alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi y los derivados de éster inferior del mismo, y con 4, 5, 6, a 7 miembros heterocíclicos. En particular, análogos de prolina en los que el tamaño del anillo del residuo de prolina se cambia de 5 miembros a 4, 6, o 7 miembros se pueden emplear. Los grupos cíclicos pueden ser saturados o insaturados, y si están insaturados, pueden ser aromáticos o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos contienen preferentemente uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de tales grupos incluyen los grupos frirazanilo, trilo, imidazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (por ejemplo morfolino), oxazolilo, piperacinilo (por ejemplo 1-piperazinilo), piperidilo (por ejemplo 1-piperidilo, piperidino), piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (por ejemplo, 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tiomorfolinilo (por ejemplo tiomorfolino) y triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Cuando está sustituido un grupo, el sustituyente puede ser alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno o fenilo sustituido o no sustituido.

También se puede modificar fácilmente los péptidos de la presente invención por fosforilación (véase, por ejemplo, W. Bannwarth, *et al.*, *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6(17): 2141-2146 (1996)), y otros métodos para hacer derivados de péptidos de los compuestos de la presente invención se describen en Hruby, *et al.*, *Biochem. J.*, 268 (2): 249262 (1990). Por lo tanto, los compuestos peptídicos de la invención también sirven como base para preparar miméticos peptídicos con actividad biológica similar.

C. Modificaciones terminales

Los expertos en la técnica reconocen que una variedad de técnicas están disponibles para la construcción de compuestos peptídicos con la misma o similar actividad biológica deseada que el compuesto peptídico correspondiente pero con actividad más favorable que el compuesto peptídico con respecto a la solubilidad, estabilidad y susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis. Véase, por ejemplo, Morgan, *et al.*, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24: 243 252 (1989). A continuación se describen métodos para la preparación de compuestos peptídicos modificados en el grupo amino N-terminal, el grupo carboxilo C-terminal, y/o cambiar uno o más de los enlaces amido en el péptido a un enlace nonamido. Se ha de entender que dos o más de tales modificaciones pueden ser acopladas en una estructura de compuesto peptídico (por ejemplo, la modificación en el grupo carboxilo C-terminal e inclusión de un enlace carbamato $-\text{CH}_2$ entre dos aminoácidos en el compuesto peptídico).

1. Modificaciones N-terminales

Los compuestos peptídicos típicamente se sintetizan como el ácido libre pero, como se señaló anteriormente, se podrían preparar fácilmente como la amida o éster. También se puede modificar el amino y/o término carboxi de los compuestos peptídicos de la invención para producir otros compuestos de la invención. Modificaciones de término amino incluyen la metilación, acetilación, añadiendo un grupo benciloxicarbonilo, o el bloqueo del término amino con cualquier grupo bloqueante que contiene una funcionalidad de carboxilato definida por RCOO^- , En donde R se selecciona del grupo que consiste en naftilo, acridinilo, esteroídilo, y grupos similares. Modificaciones carboxi terminal incluyen el reemplazo del ácido libre con un grupo carboxamida o la formación de una lactama cíclica en el término carboxi para introducir restricciones estructurales.

Modificaciones de término amino tienen los significados definidos anteriormente e incluyen alquilación, acetilación, añadiendo un grupo carbobenzoilo, formando un grupo succinimida, etc. (Véase, por ejemplo, Murray, *et al.*, Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, quinta ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed, John Wiley and Sons, Inc. (1995)) Específicamente, el grupo amino N-terminal se puede hacer reaccionar de la siguiente manera:

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

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

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

(d) para formar un grupo sulfonamida por reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de $\text{R--S(O)}_2\text{Cl}$ en un diluyente inerte adecuado (diclorometano) para convertir la amina terminal en una sulfonamida en la que R es como se define anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un exceso de amina terciaria (por ejemplo, diez equivalentes) tal como diisopropiletilamina, para depurar el ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son de otra manera convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos);

(e) para formar un grupo de carbamato por reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de R--OC(O)Cl o $\text{R--OC(O)OC}_6\text{H}_4\text{p-NO}_2$ en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) para convertir la amina terminal en un carbamato, donde R es como se define anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un exceso (por ejemplo, aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina, para depurar cualquier ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son por lo demás convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos); y

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

2. Modificaciones C-terminales

En la preparación de compuestos peptídicos en los que el grupo carboxilo C-terminal se sustituye por un éster (es decir, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ en el que R es como se ha definido anteriormente), se emplean las resinas utilizadas para preparar los ácidos peptídicos y el péptido de cadena lateral protegido se escinde con la base y el alcohol apropiado, por ejemplo, metanol. Grupos protectores de cadena lateral se retiran entonces de la forma habitual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para obtener el éster deseado.

En la preparación de compuestos peptídicos en los que el grupo carboxilo C-terminal se sustituye por la amida $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^4$, una resina de benzhidrilamina se utiliza como soporte sólido para la síntesis de péptidos. Al completarse la síntesis, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno para liberar el péptido a partir de los resultados de apoyo directamente en la amida de péptido libre (es decir, el C-término es $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$). Alternativamente, el uso de la resina clorometilada durante la síntesis peptídica acoplada con reacción con amoniaco para escindir el péptido protegido de cadena lateral del soporte produce la amida de péptido libre y la reacción con una alquilamina o una dialquilamina produce una alquilamida o dialquilamida de cadena lateral protegida (es decir, el C-término es $-\text{C}(\text{O})\text{NRR}^1$ donde R y R^1 son como se define arriba). Protección de la cadena lateral se elimina a continuación de la forma habitual por tratamiento con fluoruro de hidrógeno para producir las amidas libres, alquilamidas o dialquilamidas.

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

Además de las modificaciones N-terminal y C-terminales anteriores, los compuestos peptídicos de la invención, incluyendo peptidomiméticos, ventajosamente se pueden modificar con o covalentemente acoplarse a una o más de una variedad de polímeros hidrófilos. Se ha encontrado que cuando los compuestos peptídicos son derivatizados con un polímero hidrófilo, su solubilidad y vidas medias de circulación se aumentan y su inmunogenicidad se enmascara. Lo anterior se puede lograr con poca, o ninguna disminución en su actividad de unión. Polímeros no proteicos adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a polialquiléteres como se ejemplifica por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextrano y derivados de dextrano, etc. Generalmente, tales polímeros hidrófilos tienen un peso molecular medio que varía de aproximadamente 500 a aproximadamente 100.000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 40.000 daltons y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 daltons. En realizaciones preferidas, tales polímeros hidrófilos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 daltons, 10.000 daltons y 20.000 daltons.

Los compuestos peptídicos de la invención se pueden derivatizar con o acoplarse 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: 6269 (1995); Patente de Estados Unidos. N° 4.640.835; Patente de Estados Unidos. N° 4.496.689; Patente de Estados Unidos. N° 4.301.144; Patente de Estados Unidos. N° 4.670.417; Patente de Estados Unidos. N° 4.791.192; Patente de Estados Unidos. N° 4.179.337 o WO 95/34326.

En una realización actualmente preferida, los compuestos peptídicos de la presente invención se derivatizan con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal, soluble en agua de unidades de repetición de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. PEG se clasifican por sus pesos moleculares que típicamente varían desde aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 40.000 daltons. En una realización actualmente preferida, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5.000 daltons a aproximadamente 20.000 daltons. PEG acoplado a los compuestos peptídicos de la presente invención puede ser o bien ramificado o no ramificado. (Véase, por ejemplo, Monfardini, C., *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 6: 6269 (1995)). Los PEG están disponibles comercialmente de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.) (ahora parte de Nektar Therapeutics (San Carlo, CA), Sigma Chemical Co. y otras empresas. Tales PEG incluyen, pero no se limitan a, monometoxipolietilenglicol (MePEGOH), glycolsuccinate monometoxipolietileno (MePEGS), monometoxipolietileno glicolsuccinimidilo succinato (MePEGS-NHS), glicolamina monometoxipolietileno (MePEGNH₂), monometoxipolietileno glicoltresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietileno glicolimidazolilcarbonilo (MePEG-IM).

Brevemente, en una realización, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, tiene un tope preferiblemente en un extremo por un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. A partir de entonces, el polímero se activa en el otro extremo mediante reacción con un agente de activación adecuado, tal como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro cianúrico, bromuro o fluoruro), diimadozle, un reactivo de anhídrido (por ejemplo, un anhídrido dihalosuccínico, tales como anhídrido dibromosuccínico), acilo azida, p-diazoiumbencilo éter, 3-(p-diazoniufenoxi)-2-hidroxipropileter) 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, un grupo funcional en los compuestos peptídicos de la invención puede ser activado para la reacción con el polímero, o los dos grupos se pueden unir en una reacción de acoplamiento concertado utilizando

los métodos de acoplamiento conocidos. Se apreciará fácilmente que los compuestos peptídicos de la invención se pueden derivatizar con PEG utilizando un gran número de otros esquemas de reacción conocidos y usados por los expertos en la técnica.

5 Cuando los compuestos peptídicos son derivatizados con un polímero hidrofílico, su solubilidad y vidas medias de circulación se aumentan y su inmunogenicidad se reduce. Lo anterior se puede lograr con poca, o ninguna, pérdida en la actividad biológica. En realizaciones preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es de 0,1 a 0,01 veces de los péptidos no modificados. En realizaciones más preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es de 0,1 a 1 veces de los péptidos no modificados. En formas de realización aún más preferidas, los péptidos derivatizados tienen una actividad que es mayor que los péptidos no modificados.

D. Modificaciones de la columna

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

25 Los reactivos adecuados incluyen, por ejemplo, los análogos de aminoácidos en el que el grupo carboxilo del aminoácido ha sido reemplazado con un resto adecuado para formar uno de los enlaces anteriores. Del mismo modo, la sustitución de un enlace amido en el péptido con un enlace fosfonato se puede conseguir de la manera expuesta en la Patente de EE.UU. N^{os} 5.359.115 y 5.420.328.

E. Formación de enlace de disulfuro

30 Los compuestos de la presente invención pueden existir en una forma ciclada con un enlace de disulfuro intramolecular entre los grupos tiol de las cisteínas incorporadas, si está presente. Como alternativa, un enlace de disulfuro intermolecular entre los grupos tiol de las cisteínas puede producirse para producir un compuesto dimérico (u oligomérico superior). Uno o más de los residuos de cisteína también pueden estar sustituidos con una homocisteína.

V. Utilidad

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

45 Los compuestos peptídicos también son útiles como ligantes competitivos en ensayos para pantalla para nuevos agonistas del receptor de TPO. En tales ensayos, los compuestos peptídicos de la invención se pueden usar sin modificación o se pueden modificar en una variedad de maneras; por ejemplo, mediante el etiquetado, tal como unir covalentemente o no covalentemente un resto que proporciona directa o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, los materiales de la misma se pueden marcar directa o indirectamente. Las posibilidades para el marcaje directo incluyen grupos de marcadores tales como: radiomarcadores tales como ¹²⁵I, enzimas (Patente de Estados Unidos N° 3.645.090) tal como peroxidasa y fosfatasa de alcalina (Patente de Estados Unidos N° 3.940.475), y marcadores fluorescentes capaces de monitorizar el cambio en la intensidad de fluorescencia, cambio de longitud de onda, o polarización de fluorescencia. Las posibilidades para el marcaje indirecto incluyen biotilación de un constituyente seguida de unión a avidina acoplada a uno de los grupos marcadores anteriores. Los compuestos peptídicos pueden incluir también espaciadores o enlazadores en los casos en que los compuestos peptídicos han de ser unidos a un soporte sólido.

60 Además, basándose en su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden utilizar como reactivos para detectar receptores de TPO en células vivas, células fijas, en fluidos biológicos, en homogeneizados de tejido, en materiales purificados, biológicos naturales, etc. Por ejemplo, mediante el etiquetado de dichos compuestos peptídicos, se puede identificar células que tienen TPO-R en sus superficies. Además, en base a su capacidad para unir el receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención pueden utilizarse en tinción *in situ*, FACS (clasificación de células activada por fluorescencia), transferencia de Western, ELISA, etc. Además, en base a su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden utilizar en la purificación del receptor, o en la purificación

de células que expresan receptores de TPO en la superficie celular (o dentro de células permeabilizadas).

Los compuestos peptídicos de la presente invención también pueden utilizarse como reactivos comerciales para diversos usos de investigación médica y de diagnóstico. Tales usos incluyen, pero no se limitan a: (1) uso como un estándar de calibración para cuantificar las actividades de los candidatos agonistas de TPO en una diversidad de ensayos funcionales; (2) uso para mantener la proliferación y el crecimiento de líneas celulares dependientes de TPO; (3) uso en el análisis estructural del receptor TPO a través de cocrystalización; (4) uso para investigar el mecanismo de activación de transducción/receptor de señal TPO; y (5) otras aplicaciones de investigación y de diagnóstico donde el receptor TPO se activa preferiblemente o dicha activación es convenientemente calibrada frente a una cantidad conocida de un agonista de TPO, y similares.

Los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden utilizar para la expansión *in vitro* de megacariocitos y sus progenitores comprometidos, tanto en conjunción con citocinas adicionales como por su cuenta. Véase, por ejemplo, DiGiusto, *et al.*, Publicación PCT N° 95/05843. Las terapias de quimioterapia y de radiación causan trombocitopenia mediante la eliminación de la población de megacariocitos más madura que se divide rápidamente. Sin embargo, estos tratamientos terapéuticos pueden reducir también el número y la viabilidad de las células precursoras de megacariocitos inmaduras, menos mitóticamente activas. Por lo tanto, la mejora de la trombocitopenia por la TPO o los compuestos peptídicos de la presente invención pueden acelerarse mediante la infusión de los pacientes tras quimioterapia o terapia de radiación con una población de sus propias células enriquecidas para megacariocitos y precursores inmaduros por cultivo *in vitro*.

Los compuestos peptídicos de la invención también se pueden administrar a animales de sangre caliente, incluyendo seres humanos, para activar el TPO-R *in vivo*. Así, la presente invención abarca el uso de los compuestos reivindicados en métodos para el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados con TPO que comprenden la administración de un compuesto peptídico de la invención en cantidades suficientes para imitar el efecto de TPO en TPO-R *in vivo*. Por ejemplo, los compuestos peptídicos de la invención se pueden administrar para tratar una variedad de trastornos hematológicos, incluyendo pero no limitados a trastornos de las plaquetas y la trombocitopenia, particularmente cuando se asocian con transfusiones de médula ósea, radioterapia, y quimioterapia.

Antagonistas de TPO se pueden administrar primero a pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia, seguido por la administración de los agonistas de TPO de la invención.

La actividad de los compuestos peptídicos de la presente invención se puede evaluar, ya sea *in vitro* o *in vivo* en uno de los numerosos modelos descritos en McDonald, Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14:8-21 (1992).

De acuerdo con una realización, las composiciones de la presente invención son útiles para tratar la trombocitopenia asociada con transfusiones de la médula ósea, radioterapia o quimioterapia. Los compuestos peptídicos típicamente serán administrados profilácticamente antes de la quimioterapia, radioterapia o trasplante de médula ósea o después de tal exposición.

De acuerdo con ello, 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 portador o diluyente farmacéutico. Los compuestos peptídicos de esta invención se pueden administrar por vía oral, pulmonar, parental (intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (a través de una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal, o sublingual de administración y puede formularse en formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. Véase, por ejemplo, Bernstein, *et al.*, Publicación de Patente PCT N° WO 93/25221; Pitt, *et al.*, Publicación de Patente PCT N° WO 94/17784.; y Pitt, *et al.*, Solicitud de Patente Europea 613.683.

Formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto peptídico activo se mezcla con al menos un portador farmacéuticamente aceptable inerte tal 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 tales como estearato de magnesio lubricante. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y píldoras pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos entéricos.

Formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones farmacéuticamente aceptables, soluciones, suspensiones, jarabes, con los elixires que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y edulcorantes, aromatizantes y agentes perfumantes.

Las composiciones según esta invención para administración parental incluyen soluciones estériles acuosas

o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Ejemplos de disolventes o portadores no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Tales formas de dosificación también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y agentes dispersantes. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención, mediante la incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones bacterianas, o calentando las composiciones. También se pueden fabricar utilizando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes tales como manteca de cacao o una cera de supositorio. Las composiciones para administración nasal o sublingual también se preparan con excipientes estándar bien conocidos en la técnica.

Las composiciones que contienen los compuestos peptídicos 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.

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), pp. 315-339).

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

Las cantidades de compuesto peptídico 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, las dosis de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y eficacia. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. Las pruebas en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación predictiva adicional de la dosificación humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman, *et al.* (eds), Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8ª ed., Pergamon Press (1990); y Remington's Pharmaceutical Sciences, 7ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985).

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

EJEMPLO 1

Síntesis de péptidos de fase sólida

Los compuestos peptídicos de la invención se pueden sintetizar, por ejemplo, utilizando las técnicas de síntesis en fase sólida de Merrifield (véase Steward y Young, *síntesis de péptidos en fase sólida*, 2ª edición, Pierce Chemical, Rockford, Ill., (1984) y MelTifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963)) o un Applied Biosystems Inc. Sintetizador de péptidos de Modelo 431A o 433A. Los compuestos peptídicos pueden ser ensamblados utilizando protocolos estándar de Applied Biosystems Inc. Synth Assist™ 1.0.0 o Synth Assist™ 2.0.2. Cada acoplamiento se puede realizar para 2x30 mm. con HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-hexafluorofosfato de tetrametiluronio) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol).

La resina utilizada puede ser de resina HMP (p-hidroximetilo fenoximetilo) resina de poliestireno o PAL (Milligen/Biosearch), que es una resina de poliestireno reticulado con 5-(4'-Fmoc-aminometilo-3,5'-dimetioxifenoxi) ácido valérico como enlazador. El uso de resina PAL resulta en una funcionalidad de amida terminal de carboxilo tras la escisión del péptido de la resina. Tras la escisión, la resina de HMP produce un resto de ácido carboxílico en el C-término del producto final. La mayoría de los reactivos, resinas y aminoácidos protegidos (libres o en la resina) se pueden comprar de Millipore o Applied Biosystems Inc.

El grupo Fmoc se puede utilizar para la protección de amino durante el procedimiento de acoplamiento.

protección amina primaria en los aminoácidos se puede lograr con los grupos de protección Fmoc y la cadena lateral, tales como t-butilo para serina, tirosina, ácido glutámico, y treonina; tritilo para glutamina; Pme (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo) para arginina; Nt-butiloxicarbonilo para triptófano; N-tritilo para histidina y S-tritilo para cisteína.

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

Los compuestos peptídicos de esta invención se dimerizan utilizando procedimientos sintéticos estándar conocidos y utilizados por los expertos en la técnica. Después de estos esquemas sintéticos, los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente compuestos de péptidos diméricos de acuerdo con la presente invención. Además, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que las subunidades diméricas fácilmente se pueden ligar utilizando metodologías y enlazadores conocidos.

EJEMPLO 2

La pegilación de los compuestos peptídicos

La pegilación de un compuesto peptídico de la presente invención puede llevarse a cabo por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un compuesto peptídico de la invención se puede disolver en 100 mM de bicina pH 8,0 a una concentración de 10 mg/ml, se añadió a un exceso molar 1,25 veces de PEG2 pulverizado (comercialmente disponible de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.)) y se agitó a temperatura ambiente hasta completarse la reacción, típicamente 12 horas. La reacción se controló por HPLC de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo 40-65% con una columna YMC ODS AQ. Cuando la reacción es completa, se añade la solución a un segundo exceso molar de 1,25 de polvo PEG2 y el proceso se repite 4 veces utilizando un total de 5 moles de PEG2 para cada mol de polipéptido. La solución se diluye 2 veces con PBS para reducir la viscosidad y se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia), previamente equilibrada y se eluyó con PBS. Las fracciones de la columna de exclusión de tamaño se pueden analizar por HPLC de fase inversa. Las fracciones que contenían compuesto di-PEG-peptídico que se eluye antes de cualquier compuesto mono-PEG-peptídico puede combinarse y almacenarse a 5° C o liofilizarse.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL INC.

<120> PEPTIDOS Y COMPUESTOS QUE UNEN A UN RECEPTOR

<130> P043113EP

<140> EP 04781153.4

<141> 2004-08-13

<150> US 60/498,740

<151> 2003-08-28

<160> 7

<170> PatentIn ver. 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Motivo de péptido sintético

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 3
 <223> Xaa = cualquier amino ácido

10
 <400> 1
 Trp Ser Xaa Trp Ser
 1 5

15
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> Xaa = Ala, Cys, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Gln, Ser, Thr, or Val

25
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 2
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Lys, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr, or Val

30
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 4
 <223> Xaa = Cys, Leu, Met, Pro, Gln, or Val

35
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 5
 <223> Xaa = Phe, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, or Val

40
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 6
 <223> Xaa = Cys, Phe, Ile, Leu, Met, Arg, Ser, Val, or Trp

45
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 7
 <223> Xaa = cualquier amino ácido

50
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 8
 <223> Xaa = Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, or Tyr

55
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 9
 <223> Xaa = b-(2-naftilo)alanina

60
 <220>
 <221> Misc_feature
 <222> 10
 <223> Xaa = Cys, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Arg, or Val

<400> 2

Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

5

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

15

<220>
<221> Misc_feature
<222> 9
<223> Xaa = b-(2-naftilo)alanina

20

<400> 3

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

25

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Péptido sintético

35

<220>
<221> Misc_feature
<222> 9
<223> Xaa = b-(2-naftilo)alanina

40

<220>
<221> Misc_feature
<222> 15
<223> Xaa = sarcosina o beta-alanina

<400> 4

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

45

<210> 5
<211> 13
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

55

<220>
<221> Misc_feature
<222> 9

60

<223> Xaa = b-(2-naftilo)alanina

<400> 5

	Ile	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Arg	Gln	Xaa	Leu	Ala	Ala	Arg
	1				5					10			
5	<210> 6 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia Artificial												
10	<220> <223> Péptido sintético												
15	<220> <221> Misc_feature <222> 9 <223> Xaa = b-(1-naftilo)alanina <400> 6												
20	Ile	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Arg	Gln	Xaa	Leu	Ala	Ala	Arg
	1				5					10			
25	<210> 7 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia Artificial												
30	<220> <221> Misc_feature <222> 9 <223> Xaa = b-(2-naftilo)alanina												
35	<220> <221> Misc_feature <222> 14 <223> Xaa = sarcosina o beta-alanina												
40	<400> 7												
45	Ile	Glu	Gly	Pro	Thr	Leu	Arg	Gln	Xaa	Leu	Ala	Ala	Arg
	1				5					10			
50													
55													
60													

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que se une a un receptor de trombopoyetina (TPO), en el que dicho compuesto comprende (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂KNH₂, en el que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o β-alanina, en el que 2-Nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto se une covalentemente a un polímero hidrófilo.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X₁₀ es sarcosina.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho polímero hidrófilo tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons.
4. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho polímero hidrófilo tiene un peso molecular medio de entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 daltons.
5. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho polímero se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.
6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que dicho compuesto se une covalentemente a polietilenglicol.
7. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que cada una de las subunidades diméricas de dicho compuesto se une covalentemente a un polímero hidrófilo.
8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
9. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre de un trastorno que es susceptible al tratamiento con un agonista de la trombopoyetina, que comprende la administración al paciente de una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1.
10. Una composición de polipéptido soluble en agua sustancialmente no inmunogénica fisiológicamente activa, que comprende un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y en el que dicho polímero se selecciona de entre el grupo que consiste en polietilenglicol y polipropilenglicol, y en el que dicho polímero está insustituido o sustituido con grupos alcoxi o alquilo, dicho alcoxi o grupos alquilo que poseen menos de 5 átomos de carbono.
11. La composición de polipéptido según la reivindicación 10, en el que dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 750 a aproximadamente 15.000 daltons.
12. La composición de polipéptido según la reivindicación 10, en el que dicho polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000 daltons.
13. La composición de polipéptido según la reivindicación 11, en el que dicho polímero es polietilenglicol.
14. Una composición de polipéptido soluble en agua sustancialmente no inmunogénica que comprende la composición de la reivindicación 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
15. Un compuesto para uso en la activación de un receptor de trombopoyetina (TPO) en una célula, en el que dicho compuesto comprende (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂KNH₂, en el que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o β-alanina, en el que 2-Nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto se une covalentemente a un polímero hidrófilo.
16. El compuesto para uso según la reivindicación 15, en el que X₁₀ es sarcosina.
17. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde dichas células comprenden megacariocitos humanos, plaquetas o células CD34⁺.
18. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde dichas células comprenden células dependientes de TPO.
19. El compuesto de la reivindicación 1 o 2 para uso en un método de tratamiento de la trombocitopenia en un sujeto, comprendiendo el método:
 - (a) obtener una población de dichas células del sujeto que comprende células precursoras de megacariocitos;
 - (b) poner en contacto dichas células con el compuesto para activar los receptores de trombopoyetina en las células; y
 - (c) administrar dichas células puestas en contacto a dicho sujeto, para aumentar el número de

megacariocitos presentes en dicho sujeto en comparación con la que se produciría sin tal tratamiento.

20. El compuesto para uso según la reivindicación 19 en el que dicha trombocitopenia es debido a la quimioterapia.

5 21. El compuesto para uso según la reivindicación 20, donde dicha población de células es obtenido antes de dicha quimioterapia.

22. El compuesto para uso según la reivindicación 19 en el que dicha trombocitopenia se debe a la terapia de radiación.

10 23. El compuesto para uso según la reivindicación 22, donde dicha población de células es obtenida antes de dicha terapia de radiación.

15 24. Un compuesto para uso en el tratamiento de un paciente que sufre de thromboeytopenia, que comprende la administración a dicho paciente de una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂KNH₂, en el que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o β-alanina, en el que 2-Nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto es covalentemente unido a un polímero hidrófilo.

20 25. El compuesto para uso según la reivindicación 24, en el que X₁₀ es sarcosina.

26. El compuesto para uso según la reivindicación 24 o 25 en el que dicha trombocitopenia es debida a la quimioterapia o terapia de radiación.

25 27. El compuesto para uso según la reivindicación 24 o 25, en donde un antagonista de TPO se administra a dicho paciente antes de dicha terapia de quimioterapia o radiación.

28. El compuesto para uso según la reivindicación 24 o 25 en el que dicha trombocitopenia es debida a la transfusión de médula ósea.

30 29. Un compuesto para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente en riesgo de trombocitopenia, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto que comprende (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂KNH₂, en el que X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en sarcosina o 1β-alanina, en el que 2-Nal es β-(2-naftilo)alanina, y en el que dicho compuesto se une covalentemente a un polímero hidrófilo.

35 30. El compuesto para uso según la reivindicación 29, en el que X₁₀ es sarcosina.

31. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 29 o 30 en el que dicho compuesto es administrado antes del trasplante de médula ósea, quimioterapia o terapia de radiación.

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

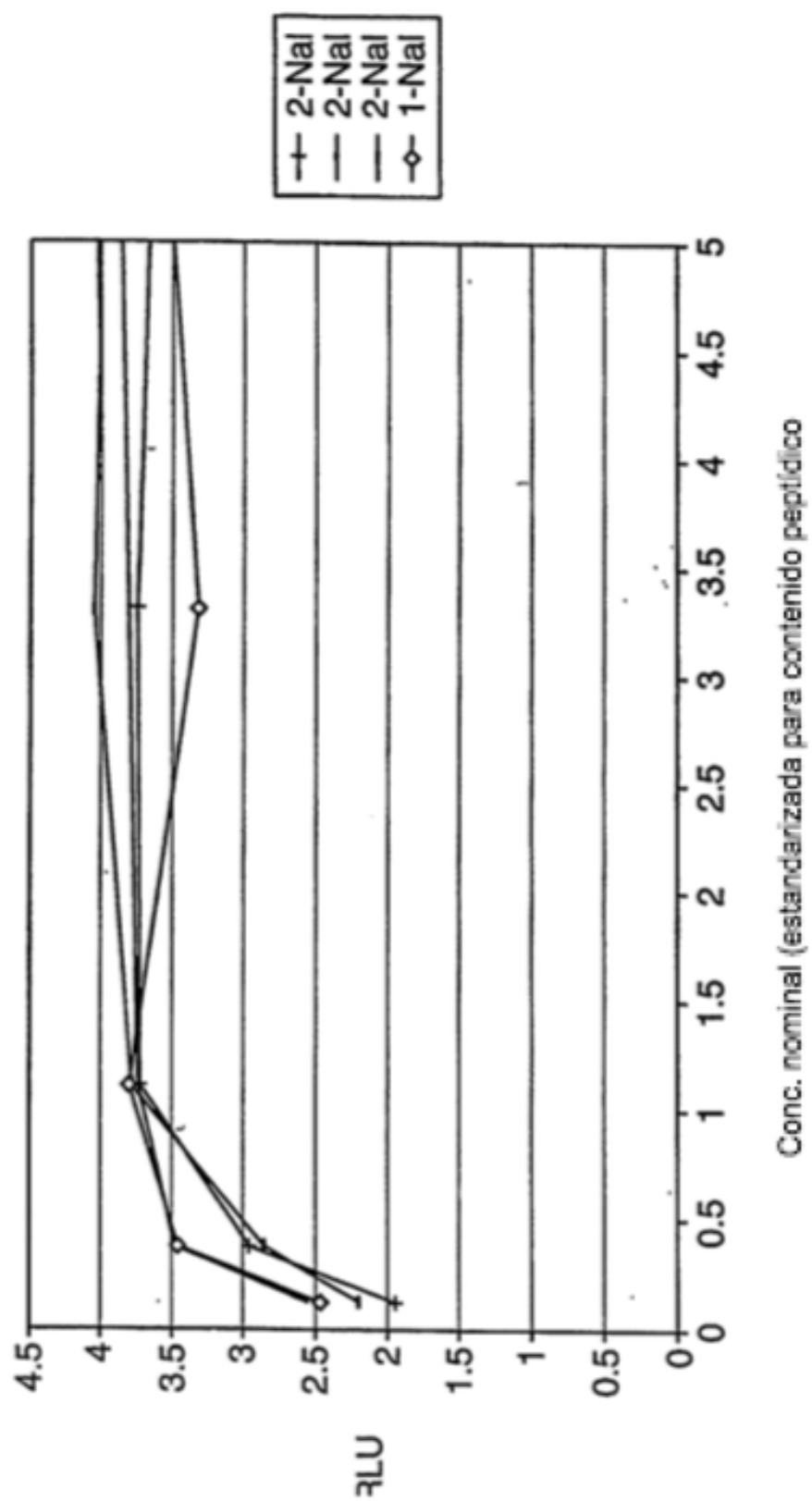


FIG. 3

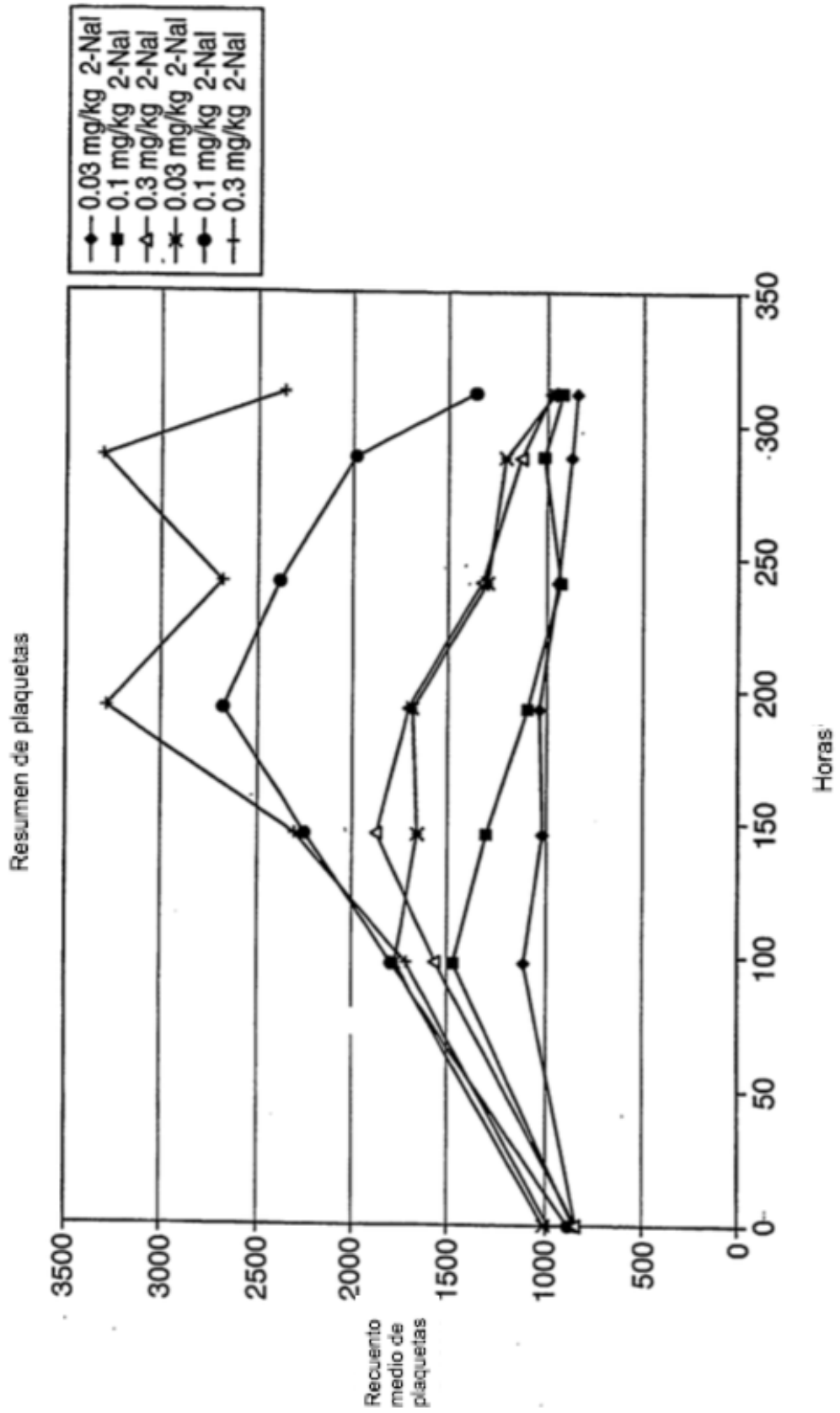


FIG. 3

Resumen de plaquetas

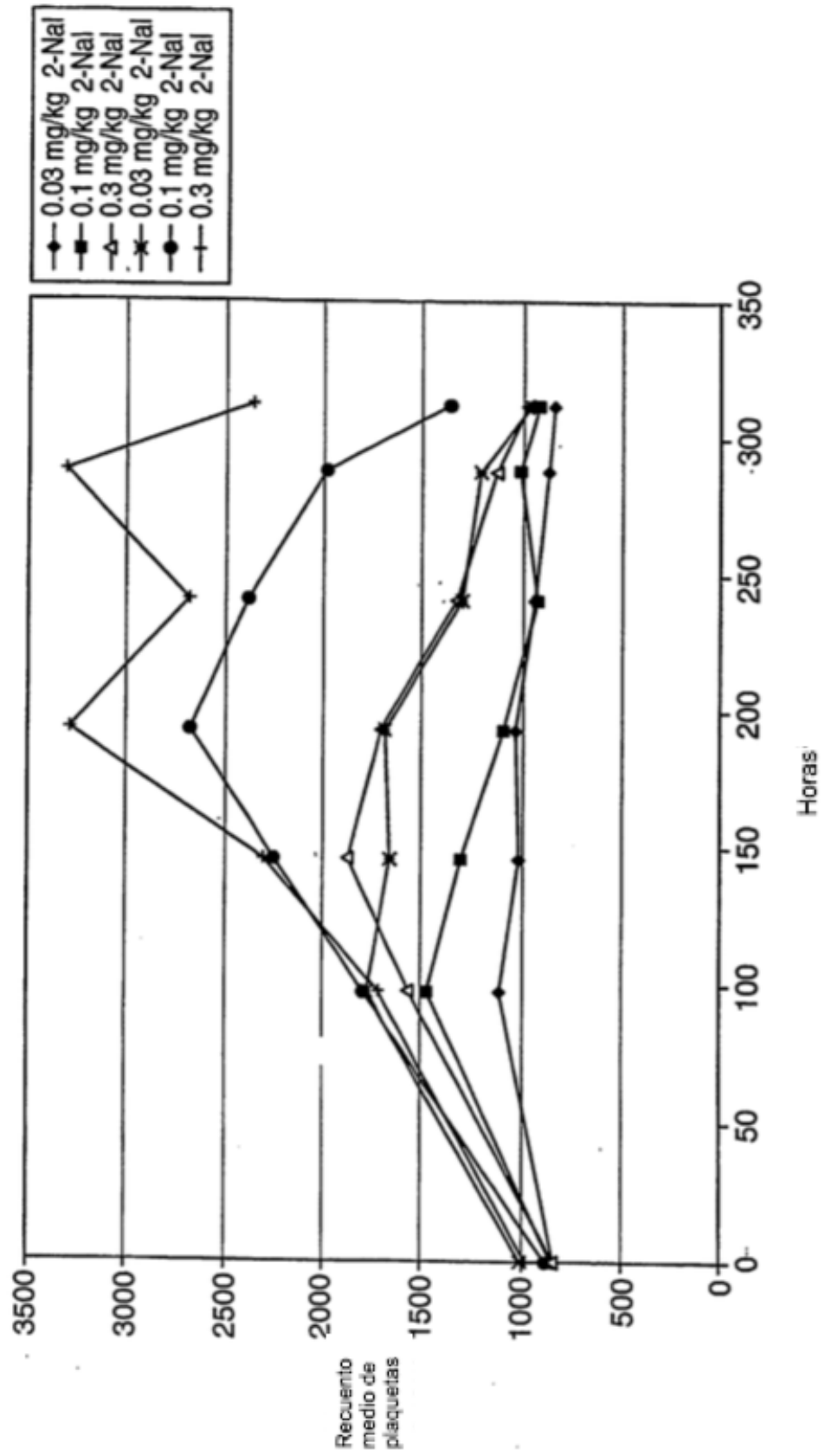


FIG. 4

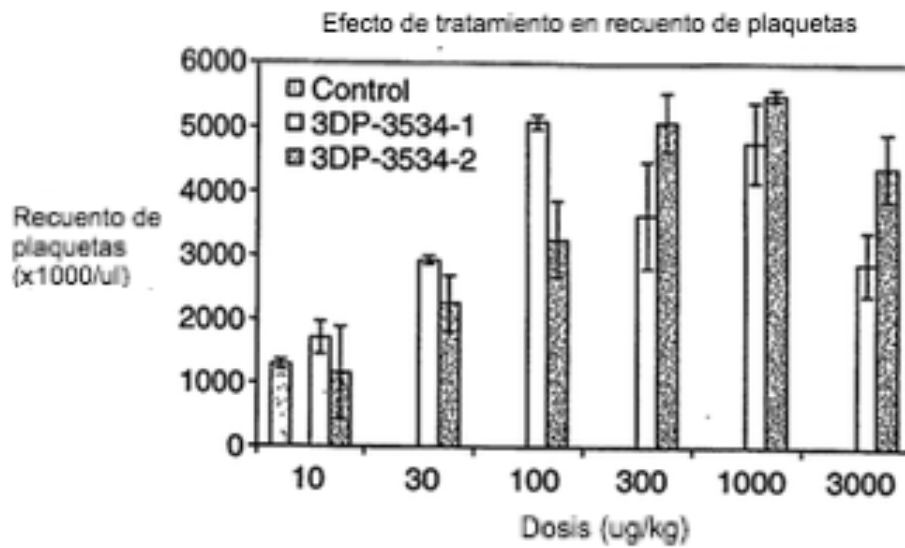


FIG. 5

