



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización
Digitalización

OL
EST

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

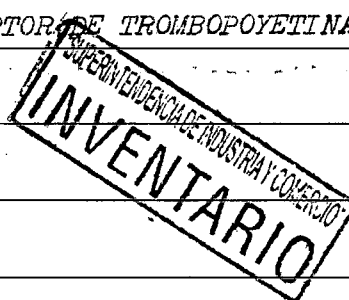
PATENTE DE INVENCION

08-13270

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

USO DE PEPTIDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA.



5. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C07K 2/08

71. SOLICITANTE

JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.

DOMICILIO

BEERSE, BELGICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,



No. 08-013270- -00000-0000

Fecha: 2008-02-11 15:27:51 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

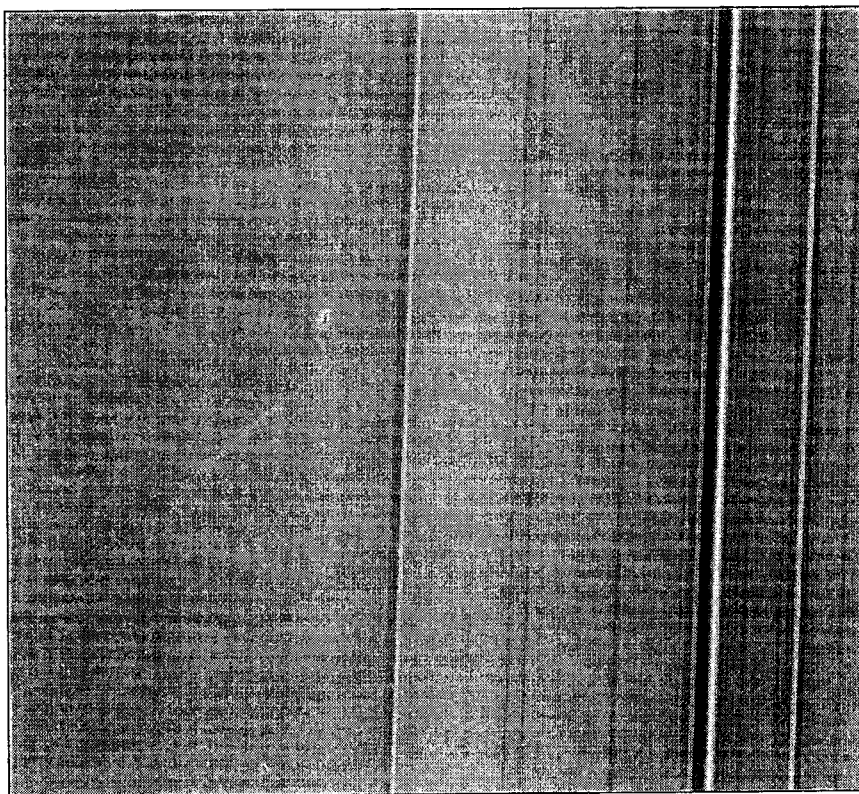
**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

9 Marzo 2008

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I		☐ Capítulo II	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. Dirección: Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Bélgica. Nacionalidad o Domicilio: Beerse, Bélgica. Lugar de Constitución: Bélgica Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número
REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6 Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889 E-mail: Jiescobar@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 39.779.452T.P 68228
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER ANEXOS Dirección: Nacionalidad o domicilio:		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2006/030359</u> Fecha <u>3 de agosto de 2006</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2007/021572 A3</u> Fecha <u>22 de febrero de 2007</u>			
6 TÍTULO (54) <u>USO DE PEPTIDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA.</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>C07K 7/08</u>			
8 Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen <u>Estados Unidos de América</u>	(32) Fecha <u>9 de agosto de 2005</u>	(31) Número de Solicitud <u>11/200.416</u>
9 Comprobante de pago No. <u>08 - 5.807</u> Fecha <u>22 de enero de 2008</u>			

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona 17.154
- ☒ Poderes si fuere el caso * Protocolo No. 17.154
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: 

C.G. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 3111/PCT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 5,807
FECHA : ENERO 22 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-013270- -00000-0000

Fecha: 2008-02-11 15:27:51 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	83221	22/01/2008	38,815,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXOS

INVENTORES

1.)

MACDONALD, Brian, R.

(19 Paper Mill Road, Newtown Square, Pennsylvania 19073, Estados Unidos de América);

2.)

WEIS, Jeffrey, Kenneth

(106 South Honeyman Road, Whitehouse Station, New Jersey 08889, Estados Unidos de América);

3.)

YURKOW, Edward, John

(123 Woods Road, Hillsborough, New Jersey 08844, Estados Unidos de América).

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen compuestos peptídicos que se unen y activan el receptor de trombopoyetina (c-mpl o TPO-R) o actúan de otra forma como un
5 agonista de TPO.

10

15

20

JQ

P08-151F

USO DE PEPTIDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE
TROMBOPOYETINA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Esta solicitud que es una continuación en parte de la solicitud de E.U.A. No. de serie 10/918,561, presentada el 13 de agosto de 2004, reclama prioridad a la solicitud de E.U.A. No. de serie 10/918,561 y 60/498,740, cuyos contenidos íntegros se incorporan en la presente para referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención provee compuestos peptídicos que se unen y activan el receptor de trombopoyetina (c-mpl o TPO-R) o que actúan de otra forma como un agonista de TPO. La invención tiene aplicación en los campos de la bioquímica y la química medicinal y particularmente provee agonistas de TPO para usarse en el tratamiento de una enfermedad humana.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los megacariocitos son células derivadas de la médula ósea, las cuales son responsables de la producción de plaquetas sanguíneas de circulación. Aunque comprenden < 0.25% de las células de la médula ósea en

la mayoría de las especies, tienen > 10 veces el volumen de las células de la médula ósea típicas. Véase Kuter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:11104-11108 (1994). Los megacariocitos experimentan un proceso conocido como $\square$ isternasubs con la cual replican sus núcleos pero no experimentan división

5 celular y proporcionan de este modo el surgimiento de células poliploide. En respuesta a un conteo de plaquetas disminuido, la proporción endomitótica se incrementa, se forman megacariocitos ploidie superiores, y el número de megacariocitos se puede incrementar hasta 3 veces. Ver $\square$ ister, J. Clin. Invest., 47:458-465 (1968). Por el contrario, en respuesta a un conteo elevado

10 de plaquetas, la proporción endomitótica disminuye, se forman megacariocitos ploidie inferiores, y el número de megacariocitos puede disminuir un 50%.

El mecanismo de retro-alimentación fisiológica exacto por el cual la masa de las plaquetas de circulación regula la proporción endomitótica y el número de megacariocitos de la médula ósea no se conoce. Ahora se piensa

15 que el factor trombopoyético de circulación involucrado en la mediación de este bucle de retro-alimentación es trombopoyetina (TPO). Más específicamente, TPO ha mostrado que es un regulador humoral principal en situaciones que involucran trombocitopenia. Véase, por ejemplo, Metcalf, Nature, 369:519-520 (1994). TPO ha mostrado en varios estudios que

20 incrementa los conteos de plaquetas, incrementa el tamaño de plaqueta, e incrementa la incorporación de isótopos en plaquetas de animales receptores. Específicamente, TPO se piensa que afecta la megacariocitopóyesis de varias maneras: (1) produce incrementos en el tamaño y número de megacariocitos;

(2) produce un incremento en el contenido de ADN, en la forma de poliploide, en megacariocitos; (3) incrementa la α -glucuronidasa de megacariocitos; (4) produce maduración incrementada de megacariocitos; y (5) produce un incremento en el porcentaje de células precursoras, en la forma de células acetilcolinesterasa-positivas pequeñas, en la médula ósea.

Las plaquetas son necesarias (trombocitos) para la coagulación de la sangre. Cuando sus números son muy bajos un paciente se encuentra en riesgo serio de morir por hemorragia catastrófica. TPO por lo tanto tiene aplicación útil potencial en ambos el diagnóstico y tratamiento de varios trastornos hematológicos, por ejemplo, enfermedades primariamente debido a defectos de las plaquetas. Las pruebas clínicas actuales con TPO han indicado que TPO se puede administrar de manera segura a los pacientes. Además, estudios recientes han proporcionado una base para la proyección de eficacia de la terapia TPO en el tratamiento de trombocitopenia, y particularmente trombocitopenia que resulta de la quimioterapia, terapia de radiación, o trasplante de médula ósea como tratamiento del cáncer o linfoma. Véase, por ejemplo, McDonald, Am. J. Ped. Hematology/Oncology, 14:8-21 (1992).

La TPO de codificación génica se ha clonado y caracterizado. Véase 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); y Sauvage et al., Nature 369:533-538 (1994). La trombopoyetina es un glicoproteína con al menos dos

7

formas, con masas moleculares aparentes de 25kDa y 31 kDa, con una secuencia de aminoácidos N-terminal común. Ver, Bartley, et al., Cell, 77:1117-1124 (1994). Parece que la trombopoyetina tiene dos regiones distintas separadas por un sitio de escisión potencial Arg-Arg. La región amino-terminal es altamente conservada en el hombre y ratón, y tiene algo de homología con eritropoyetina e interferón-a e interferón-b. La región carboxi-terminal muestra amplia divergencia de especies.

Las secuencias de ADN y secuencias peptídicas codificadas para TPO-R de humano (también se conoce como c-mpl) se han descrito. Véase Vigon, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5640-5644 (1992). El TPO-R es un miembro de la familia del receptor 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 trans-membrana. Ver, Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6934-6938 (1990). Evidencia de que este receptor juega un papel funcional en la hematopoyesis incluye observaciones de que esta expresión se restringe a bazo, médula ósea, o hígado fetal en ratones (ver, 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)). Además, la exposición de células CD34+ a oligonucleótidos sintéticos anti-sentido a ARN mpl inhibe de manera significativa la aparición de colonias de megacariocitos sin afectar la formación de colonia eritroide o mieloide. Algunos trabajadores postulan que

las funciones del receptor como un homodímero, similar a la situación con los receptores para G-CSF y eritropoyetina.

La disponibilidad de genes clonados para TPO-R facilita la búsqueda de agonistas de este receptor importante. La disponibilidad de la proteína de receptor recombinante permite el estudio de interacción receptor-ligando en una variedad de sistemas de generación de diversidad $\square$ isterna $\square$ aleatoria y semi-aleatoria. Estos sistemas se describen en la patente de E.U.A. Nos. 6,251,864, 6,083,913, 6,121,238, 5,932,546, 5,869,451, 5,506,362, y 6,465,430 y en Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990); cada una de las solicitudes y publicaciones de patente anteriores se incorpora en la presente para referencia.

La recuperación lenta de los niveles de plaqueta en pacientes que padecen de trombocitopenia es un problema serio, y tiene urgencia lenta a la búsqueda de un agonista del factor de crecimiento de sangre capaz de acelerar la regeneración de plaqueta. La presente invención provee dicho agonista.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a compuestos peptídicos de peso molecular bajo definidos que tienen propiedades de unión fuerte al TPO-R, pueden activar el TPO-R y permiten potencialmente efectos secundarios reducidos en comparación a agonistas de TPO conocidos. En consecuencia,

los compuestos peptídicos pueden ser útiles para propósitos terapéuticos en el tratamiento de condiciones mediadas por TPO (por ejemplo, trombocitopenia que resulta de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de médula ósea) así como para propósitos de diagnóstico en el estudio del mecanismo de hematopoyesis y para la expansión *in vitro* de megacariocitos y células progenitoras depositadas.

Los compuestos peptídicos adecuados para propósitos terapéuticos y/o diagnóstico tienen una IC_{50} de aproximadamente 2 Mm o menos, según como se determina, por ejemplo, por medio de ensayo de afinidad de unión expuesto en los ejemplos 3 de la patente de E.U.A. No. 5,869,451, en donde una IC_{50} más baja se correlaciona a una afinidad de unión más fuerte a TPO-R. El ensayo en la patente de E.U.A. No. 5,869,451 es como sigue: afinidades de unión de compuestos peptídicos se miden en un ensayo de unión de competición. Los pozos de una placa de microvaloración se recubren con estreptavidina 1 mg, bloqueada con PBS/BSA al 1%, seguido por 50 ng de anticuerpo de inmovilización del anti-receptor biotinilado (Ab179). Los pozos entonces se tratan con una dilución 1:10 de recolección de TPO-R soluble. Varias concentraciones de compuesto peptídico se mezclan con una cantidad constante de una forma truncada de TPO que consta de residuos 1-156 fusionados al C-terminal de proteína de unión a maltosa (MBP-TPO₁₅₆). Las mezclas MBP-TPO₁₅₆ peptídicas se añaden a los pozos recubiertos con TPO-R, se incuban durante 2 horas a 4°C y después se lavan con PBS. La cantidad de MBP-TPO que se une en equilibrio se mide al añadir anti-sueros

de conejo dirigidos contra MBP, seguido por IgG anti-conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. La cantidad de fosfatasa alcalina en cada pozo entonces se determina usando métodos estándar. El ensayo se conduce por un intervalo de concentraciones de compuesto peptídico y los resultados se grafican de modo tal que el eje y representa la cantidad de MBP-TPO unido y el eje x representa la concentración de compuesto peptídico. Uno puede determinar entonces la concentración a la cual el compuesto peptídico se reducirá en un 50% (IC_{50}) la cantidad de MBP-TPO unida a TPO-R inmovilizada. La constante de disociación (K_d) para el péptido debe ser similar a la IC_{50} medida usando estas condiciones de ensayo. Para propósitos farmacéuticos, los compuestos peptídicos preferiblemente tienen una IC_{50} de no más de aproximadamente 100 μM , más preferiblemente, no más de 500 Nm. En una modalidad preferida, el peso molecular de los compuestos peptídicos es de aproximadamente 250 a aproximadamente 8000 daltons. Si el compuesto peptídico de esta invención es oligomerizado, dimerizado y/o derivado con un polímero hidrófilo como se describe en la presente, los pesos moleculares de dichos compuestos peptídicos serán sustancialmente mayores y pueden variar en cualquier parte de aproximadamente 500 a 120,000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 8,000 a aproximadamente 80,000 daltons.

Cuando se usa para propósitos de diagnóstico, los compuestos peptídicos de la presente invención preferiblemente se etiquetan con etiqueta detectable y, en consecuencia, los compuestos peptídicos sin dicha etiqueta

11

sirven como intermedio en la preparación de compuestos peptídicos etiquetados.

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

En consecuencia, 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 como se expresa por un IC_{50} de no más de aproximadamente 100 μM ,

en donde de cero a todos los enlaces $-C(O)NH-$ del compuesto peptídico se han reemplazado por un enlace seleccionado del grupo que consiste en un enlace $-CH_2OC(O)NR-$; un enlace de fosfonato; un enlace $-CH_2S(O)_2NR-$; un enlace $:CH_2NR-$ y un enlace $-C(O)NR^6$; y un enlace $-NHC(O)NH-$ donde R es hidrógeno o alquilo inferior y R^6 es alquilo inferior.

además en donde la N-terminal de dicho compuesto peptídico se selecciona del grupo que consiste en un grupo $-NRR^1$; 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 benciloxicarbonil-NH-; y un grupo benciloxicarbonil-NH- que tiene de 1 a 3 sustituyentes en el anillo fenilo seleccionados del grupo que consiste en alquilo inferior, alcoxi inferior, cloro, y bromo, donde R y R^1 se

seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior,

y aún además en donde la C-terminal de dicho compuesto peptídico tiene la fórmula $-C(O)R^2$ donde R^2 se selecciona del grupo que
 5 consiste en hidroxí, alcoxi inferior, y $-NR^3R^4$ donde R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que cosiste de hidrógeno y alquilo inferior y donde el átomo de nitrógeno del grupo $-NR^3R^4$ opcionalmente puede ser el grupo amino de N-terminal del péptido para formar un péptido cíclico,

y sus sales aceptables fisiológicamente.

10 En una modalidad relacionada, la invención esta dirigida a un compuesto peptídico etiquetado que comprende un compuesto peptídico descrito como antes teniendo unido covalentemente a este una etiqueta capaz de detección.

En una modalidad, el compuesto peptídico del núcleo comprende
 15 una secuencia de aminoácidos: (SEQ ID NO: 2).

$X_9 X_8 G X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$

en donde X_9 es A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T o V; y X_8 es A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T, o V; y X_6 es un residuo β -(2-naftil)alanina (referido aquí como "2-Nal"). Más preferiblemente, X_9 es A o I; y X_8 es D, E, o K.
 20 Además X_1 es C, L, M, P, Q, V, X_2 es F, K, L, N, Q, R, S, T o V; X_3 es C, F, I, L, M, R, S, V o W; X_4 es cualquiera de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente, X_5 es A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V o Y; y X_7 es C, G, I, K, L, M, N, R, o V.

$$\begin{array}{c} \text{IEGPTLRQ (2-Nal) L A A R X}_{10} \\ \backslash \\ \text{K(NH}_2\text{)} \\ / \\ \text{IEGPTLRQ (2-Nal) L A A R X}_{10} \end{array}$$

La estructura anterior también se puede representar por la siguiente estructura

(H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)₂K-NH₂.

IEGPTLRQ (2-Nal) LAAR-(Sar)

$$\frac{K(NH_2)}{/}$$

en donde (2-Nal) es β -(2-naftil)alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ ID NO:7). Este compuesto peptídico, que también se puede representar por la

siguiente estructura (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAAR(Sar))₂K-NH₂ esta referido aquí como "Compuesto TPO No. 1".

En aún una modalidad adicional, compuestos peptídicos preferidos para uso en esta invención incluyen compuestos peptídicos que
5 están covalentemente unidos a uno o más de una variedad de polímeros hidrófilos. Polímeros hidrófilos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polialquiléteres como se ejemplifica por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextran y derivados de
10 dextran, etc., como se describe en la patente de E.U.A. No. 5,869,451, el contenido completo de la cual se incorpora para referencia.

Los compuestos peptídicos descritos aquí son útiles para la prevención y tratamiento de enfermedades mediadas por TPO, y particularmente para el tratamiento de trastornos hematológicos, incluyendo
15 pero sin limitarse a, trombocitopenia resultando de quimioterapia, terapia de radiación, o transfusión de medula ósea. Así, la presente invención también provee un método para el tratamiento en donde un paciente que tiene un trastorno que es susceptible al tratamiento con un agonista TPO recibe, o se le administra, una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva de un
20 compuesto peptídico de la presente invención.

La invención también se provee para composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los compuestos peptídicos descritos aquí y un portador fisiológicamente aceptable. Estas composiciones

15

farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas incluyendo formas de dosificación oral, así como polvos y soluciones inhalables y soluciones inyectables e infusibles.

5

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra y compara la actividad del compuesto TPO No. 1 con un compuesto peptídico de la técnica previa (referido a través de esta como "compuesto peptídico de la técnica previa"). La diferencia entre el
10 compuesto TPO No. 1 y el compuesto peptídico de la técnica previa es que el compuesto peptídico de la técnica previa tiene una β -(1-naftil)alanina (1-Nal) donde (2-Nal) está en el compuesto TPO No. 1.

La figura 2 muestra y compara la actividad del compuesto TPO No. 1 PEGilado con el compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado.

15 La figura 3 muestra y compara el cambio *in vivo* en conteos de plaquetas en rata demostrando la potencia relativa del compuesto TPO No. 1 PEGilado con el compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado.

Las figuras 4 y 5 muestran y comparan el número y volumen de plaquetas de circulación en una manera dependiente de dosis,
20 respectivamente en el uso de compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado y el uso de compuesto TPO No. 1 PEGilado.

La figura 6 muestra que las dosis intravenosas sencillas de compuesto TPO No. 1 PEGilado (30, 100 o 300 $\mu\text{g/kg}$) resultan en un conteo

16

de plaquetas periférico incrementado en ratas Wistar machos normales.

La figura 7 muestra el PK, perfiles concentración-tiempo de compuesto TPO No. 1 PEGilado en voluntarios machos saludables: cuadro relleno-Compuesto TPO No. 1 PEGilado, 0.75 $\mu\text{g/kg}$ i.v.; diamante abierto -
 5 Compuesto TPO No. 1 PEGilado, 1.5 $\mu\text{g/kg}$ i.v.; triangulo relleno hacia arriba -
 Compuesto TPO No. 1 PEGilado, 2.25 $\mu\text{g/kg}$ i.v.; triangulo hacia abajo abierto
 - Compuesto TPO No. 1 PEGilado, 3 $\mu\text{g/kg}$ i.v.

La figura 8 muestra que los conteos de plaqueta se incrementan dependientemente con la dosis en voluntarios machos saludables post
 10 administración de compuesto TPO No. 1 PEGilado.

La figura 9 muestra que los niveles de TPO endógenos se incrementan dependientemente con la dosis en voluntarios machos saludables post administración de compuesto TPO No. 1 PEGilado.

15 DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

1. Definiciones y parámetros generales

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de varios términos usados para describir la invención
 20 aquí.

“Agonista” se refiere a un ligando activo biológicamente que se une a su receptor activo biológicamente complementario y activa el último para causar una respuesta biológica en el receptor o para aumentar la

actividad biológica pre-existente del receptor.

“Compuesto péptido” se refiere a una molécula que hidroliza en aminoácidos y/o derivados de aminoácidos y/o sustitutos de aminoácidos.

“Sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a metales
5 alcalinos no-tóxicos, metales alcalinotérreos, y sales de amonio comúnmente usadas en la industria farmacéutica incluyendo sales de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, bario, amonio, y zinc protamina, que se preparan por métodos bien conocidos en la técnica. El término también incluye sales de
10 adición ácida no-tóxicas, que generalmente se preparan al hacer reaccionar los compuestos de esta invención con ácido orgánico o inorgánico adecuado. Sales representativas incluyen clorhidrato, bromhidrato, sulfato, bisulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, napsilato, y lo similar.

“Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable” se refiere a
15 aquellas sales que retienen la efectividad biológica y propiedades de las bases libres y que no son biológicamente o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y lo similar, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido
20 pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toleunosulfónico, ácido salicílico y lo similar. Para una descripción de sales

de adición ácida farmacéuticamente aceptables como profármacos, véase Bundgaard, H., supra.

“Ester farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos ésteres que retienen, en hidrólisis de enlace éster, la efectividad biológica y 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 Publisher, Ámsterdam (1985). Estos ésteres usualmente se forman a partir del ácido carboxílico correspondiente y un alcohol.

10 Generalmente, la formación de éster se puede realizar vía las técnicas sintéticas convencionales (Véase, por ejemplo, March, Advanced Organic Chemistry, 4th ed., John Wiley & Sons, New York (1992), 393-396 y referencias citadas aquí, y Mark, et al., Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, New York (1980). El componente de alcohol del éster

15 generalmente comprende (i) un alcohol alifático de C_2-C_{12} que puede o no puede contener uno o más enlaces dobles y pueden o no pueden contener carbonos ramificados o (ii) alcoholes aromáticos o heteroaromáticos de C_7-C_{12} . Esta invención también contempla el uso de aquellas composiciones que son ambas esteres como se describen aquí y al mismo tiempo son sus sales

20 de adición ácida farmacéuticamente aceptables.

“Amida farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas amidas que retienen, en la hidrólisis del enlace de amida, la efectividad biológica y 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, Ámsterdam (1985). Estas amidas son usualmente formadas a partir del ácido carboxílico correspondiente y una amina. Generalmente, la formación de amida se puede realizar vía técnicas sintéticas convencionales (Véase, por ejemplo March, Advanced Organic Chemistry, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, (1992), p.393 y Mark, et al. Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, New York (1980). Esta invención también contempla el uso de aquellas composiciones las cuales son ambas amidas como se describe aquí y al mismo tiempo sus sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables.

“Portador farmacéuticamente 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.

“Estereoisómero” se refiere a un compuesto químico que tiene el mismo peso molecular, composición química, y constitución como el otro, pero con los átomos agrupados diferentemente. Esto es, ciertos radicales químicos idénticos están en orientaciones diferentes en espacio y, por lo tanto, cuando son puros, tienen la habilidad de girar el plano de luz polarizado. Sin embargo, algunos estereoisómeros puros pueden tener una rotación óptica que es de un modo ligera, indetectables con la instrumentación presente. Los compuestos de la presente invención pueden tener uno o más átomos de carbono

20

asimétricos y por lo tanto incluyen varios estereoisómeros. Todos los estereoisómeros se incluyen dentro del alcance de la invención.

“Cantidad terapéuticamente o farmacéuticamente efectiva” como se aplica para las composiciones de la presente invención se refiere a la
5 cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Este resultado puede ser el alivio los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado usualmente involucra una disminución en la respuesta inmunológica y/o inflamatoria a la infección o lesión de tejido.

10 Residuos de aminoácidos en 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 A; 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; aspargina es Asn o N; lisina es Lys o K; ácido aspártico es Asp o
15 D; ácido glutámico es Glu o E; cisteina es Cys o C; triptofan es Trp o W; arginina es Arg o R; y glicina es Gly o G. De manera adicional t-Buo es terc-butiloxi, Bzi es bencilo, CHA es ciclohexilamina. Ac es acetilo, Me es metilo, Pen es penicilina, Aib es ácido aminobutírico, Nva es norvalina, Abu es ácido aminobutírico, Thi es tienilalanina, OBn es O-bencilo, e hyp es hidroxiprolina.

20 Análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no-peptídicos con propiedades análogas a aquellos del péptido templado. Estos tipos de compuestos no-peptídicos se denominan “peptidemiméticos” o “miméticos peptídicos” o “peptidomiméticos”



(Luthman, et al., A Textbook of drug Design and Development, 14: 386-406, 2a ed., Harwood Academia Publishers (1996); Joachim Grante, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33: 1699-1720 (1994); Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS, p. 392 (1985); y Evans, et al., J. Med. Chem, 30:1229 (1987), que se incorporan aquí para referencia). Miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos útiles terapéuticamente se pueden usar para producir un efecto equivalente o terapéutico aumentado o profiláctico. Generalmente, peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica), tal como polipéptido de unión al receptor de origen natural, pero tienen uno o más enlaces de péptido opcionalmente reemplazados por un enlace alternativo tal como $-CH_2NH-$; $-CH_2S-$, etc, por métodos conocidos en la técnica y descritos adicionalmente en las siguientes referencias: Spatola, A. F. en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. R, Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463-468 (1980), (revisión general); Hudson, et al., Int. J. Pept. Prot. Res., 14:177-185 (1979); Spatola, et al, Life Sci., 38:1243-1249 (1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314 (1982); Almquist, et al., J. Med. Chem., 23:1392-1398, (1980); Jennings-White, et al., Tetrahedron Lett. 23:2533 (1982); Szelke, et al., European Appln. EP 45665 (1982); Holladay, et al., Tetrahedron Lett., 24:4401-4404 (1983); and Hruby, Life Sci., 31:189-199

(1982); cada uno de los cuales se incorpora aquí para referencia. Un enlace no peptídico preferido particularmente es $-\text{CH}_2\text{NH}-$. Dichos miméticos peptídicos pueden tener ventajas significantes sobre modalidades de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, producción más económica, estabilidad química mayor, propiedades farmacológicas aumentadas (vida media, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un espectro amplio de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otros. Etiquetado de peptidomiméticos usualmente involucra la unión covalente de una o más etiquetas, directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), a posición(es) de no interferencia en el peptidomimético que se predice mediante datos de estructura-actividad cuantitativa y/o modelación molecular. Dichas posiciones de no interferencia generalmente son posiciones que no forman contactos directos con la(s) macromolécula(s) (por ejemplo, moléculas de la superfamilia inmunoglobulina) a las cuales las uniones de peptidomimético producen el efecto terapéutico. La derivación (por ejemplo, etiquetamiento) de peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético. Generalmente, los peptidomiméticos de péptidos de unión al receptor unen al receptor con alta afinidad y poseen actividad biológica detectable (es decir, son agonísticos o antagonísticos a uno o más cambios fenotípicos mediados por el receptor).

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-

lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica se pueden generar por métodos conocidos en la técnica (Rizo, et al., Ann. Rev. Biochem., 61:387
5 (1992), incorporado aquí para referencia), por ejemplo, mediante la adición de residuos de cisteína interna capaz de la formación de puentes de disulfuro intramolecular, que ciclizan el péptido.

“Etiqueta detectable” se refiere a materiales, que cuando se unen covalentemente a los compuestos peptídicos de esta invención, permite la
10 detección de compuestos peptídicos *in vivo* en el paciente a quién el compuesto peptídico se ha administrado. Etiquetas detectables adecuadas son bien conocidas en la técnica e incluyen, a manera de ejemplo, radioisótopos, etiquetas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína), y lo similar. La etiqueta detectable particular empleada no es crítica y se selecciona
15 relativa a la cantidad de etiqueta a ser empleada así como la toxicidad de la etiqueta en la cantidad de etiqueta empleada. La selección de la etiqueta relativa a dichos factores es bien conocida para una persona con experiencia en la técnica.

Uniones covalentes de la etiqueta detectable al compuesto
20 peptídico se realizan mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el radioisótopo ^{125}I se emplea como la etiqueta detectable, la unión covalente de ^{125}I al compuesto peptídico se puede alcanzar mediante la incorporación de la tirosina de aminoácido en el

25

compuesto peptídico y después la yodinación del compuesto peptídico (véase, por ejemplo Weaner, et al, Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp 137-140 (1994)). La incorporación de tirosina a la terminal N o C del compuesto peptídico se puede alcanzar mediante química bien conocida. De manera similar, ^{32}P se puede incorporar en el compuesto peptídico como un radical fosfato a través de, por ejemplo, un grupo hidroxilo en el compuesto peptídico usando química convencional.

II. Compendio

10 La presente invención provee compuestos peptídicos que unen a y activan el TPO-R o de otra manera se comportan como un agonista de TPO. Estos compuestos peptídicos incluyen compuestos peptídicos "guía" y compuestos peptídicos "derivados" contruidos para tener la misma o similar estructura o forma molecular como los compuestos peptídicos guía, pero que difieren de los compuestos peptídicos guía ambos con respecto a la 15 susceptibilidad para la hidrólisis o proteólisis y/o con respecto a otras propiedades biológicas, tales como afinidad incrementada para el receptor. La presente invención también provee composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto peptídico, y más particularmente un 20 compuesto peptídico, que es útil para el tratamiento de trastornos hematológicos, y particularmente, trombocitopenia asociada con quimioterapia, terapia de radiación, o transfusiones de medula ósea.

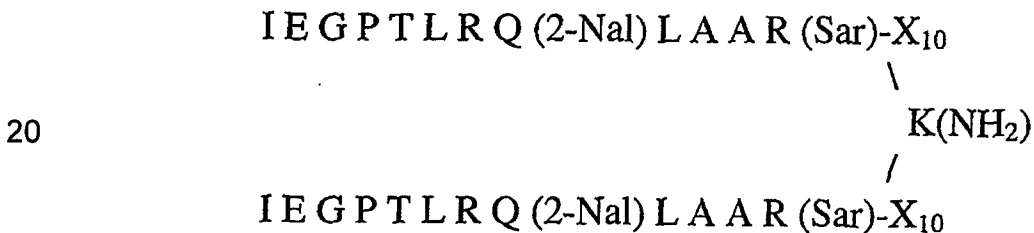
Se encuentra que el compuesto peptídico de núcleo puede



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-naftil)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 preferiblemente, X₉ es A o I; y X₈ es D, E, o K. X₁ adicional 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 aquí, se ha encontrado que al reemplazar X₆ con β-(2-naftil)alanina, el compuesto provee diferentes propiedades sobre el compuesto que contiene β-(1-naftil)alanina. En consecuencia, un compuesto peptídico particularmente preferido incluye la secuencia de aminoácido (SEQ ID NO:7): I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R (Sar).

En otra modalidad, los compuestos peptídicos de la presente
15 invención son preferiblemente dimerizados u oligomerizados para incrementar la afinidad y/o actividad de los compuestos. Un ejemplo de un compuesto peptídico dimerizado preferido incluye, pero no se limita a, lo siguiente:



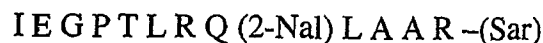
donde X₁₀ es una sarcosina o residuo β-alanina (SEQ ID NO:7).

Se debe notar que un residuo X_{10} puede ser sarcosina y el otro residuo puede

26

ser β -alanina. La estructura anterior también se puede representar por lo siguiente: (H-IEGPTLRQ(2-Nal)LAAR₁₀)₂K-NH₂.

Un compuesto peptídico preferido es como sigue:

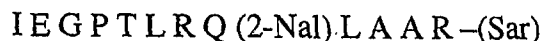


5

\

K(NH₂)

/



en donde (2-Nal) es β -(2-naftil)alanina y (Sar) es sarcosina (SEQ

10 ID NO: 7). Este compuesto peptídico se refiere aquí como "Compuesto TPO No. 1".

Compuestos peptídicos que tienen un IC₅₀ de más de aproximadamente 100 mM carece de suficiente unión para permitir el uso en ambos aspectos de diagnóstico o terapéuticos de esta invención.

15 Preferiblemente, para propósitos de diagnóstico, los compuestos peptídicos tienen un IC₅₀ de aproximadamente 2 nM o menos y, para propósitos farmacéuticos, los compuestos peptídicos tienen un IC₅₀ de aproximadamente 100 μ m o menos.

La figura 1 compara la actividad de tres diferentes lotes de
20 compuesto TPO No. 1 con un lote de compuesto peptídico de la técnica previa usando técnicas de ensayo de unidades luminiscentes relativas estándar. El ensayo emplea células de murina diseñadas para expresar establemente el receptor TPO humano y un constructor reportero de luciferasa manejado por

27

el promotor fos. La diferencia entre el compuesto TPO No. 1 y el compuesto peptídico de la técnica previa es que el compuesto peptídico de la técnica previa tiene una β -(1-naftil)alanina (1-Nal) donde el (2-Nal) está en el compuesto TPO No. 1. El compuesto TPO No. 1 se refiere a como 2-Nal y el
5 compuesto peptídico de la técnica previa se prefiere como 1-Nal (Técnica previa) en la figura 1. Como se muestra en la figura 1, la actividad es similar para cada compuesto.

La figura 2 compara la actividad de varios lotes diferentes de compuesto TPO No. 1 PEGilado (pegilación de los compuestos de la presente
10 invención se describe en más detalle posteriormente). Ambos lotes de compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado muestra alta actividad con esencialmente el mismo nivel de actividad como el compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado. Las líneas restantes ilustran la actividad de diferentes lotes de compuesto TPO No. 1 PEGilado. Como se muestra por la
15 figura 2, en este modelo, el último tiene menos actividad relativa a los compuestos peptídicos de la técnica previa PEGilados, el compuesto TPO No. 1 PEGilado esta referido como PEG-2-Nal y compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado se refiere como PEG-1-Nal (Técnica previa) en la figura 2.

20 La figura 3 demuestra la potencia relativa de compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado y compuesto TPO No. 1 PEGilado. A través de un modelo de rata, la figura 3 muestra el cambio *in vivo* en conteos de plaquetas después de la administración de compuesto peptídico de la

técnica previa PEGilado y compuesto TPO No. 1 PEGilado. Como se muestra por la figura 3, la dosis más alta del compuesto TPO No. 1 PEGilado tiene la misma actividad como la dosis más baja del compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado. Un compuesto menos potente puede proveer un estímulo
5 menos drástico a la célula objetivo, que podría reducir el riesgo de efectos secundarios causados por la sobreestimulación de la célula objetivo, tal como trombocitopenia exacerbada siguiendo el ciclo consecutivo de quimioterapia. El compuesto TPO No. 1 PEGilado es referido como PEG-2-Nal y el compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado es referido como PEG-1-
10 Nal (Técnica previa) en la figura 3.

Las figuras 4 y 5 muestran los resultados de un estudio de respuesta de dosis de comparación directa (head-to-head) de un compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado y compuesto TPO No.1 PEGilado en ratones normales. El compuesto TPO No. 1 PEGilado es referido como PEG-
15 2-Nal y el compuesto peptídico de la técnica previa PEGilado es referido como PEG-1-Nal (Técnica previa) en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra incrementos en niveles de plaquetas y la figura 5 muestra seis días (6) de volumen de plaqueta medio después del tratamiento. El intervalo de dosis es de 10 a 3000 ug/Kg. Ambos compuestos peptídicos incrementan el número de
20 plaquetas d circulación en una manera dependiente de dosis con incrementos relativos con el grupo de control observado en dosis tan bajas como 30 ug/kg de ambos compuestos. En la respuesta máxima, estos conteos de plaquetas elevados de compuestos peptídicos son hasta 4 veces más grandes que los

29

valores de control. Las curvas de dosis-respuesta para estos compuestos peptídicos son muy similares indicando que en este modelo no existe esencialmente diferencia entre dos artículos de prueba basados en estos puntos finales.

5

IV. Preparación de compuestos peptídicos

A. Síntesis de fase sólida

Los compuestos peptídicos de la invención se pueden preparar por métodos clásicos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando técnicas de fase sólida estándar. Los métodos estándar incluyen síntesis de fase sólida exclusiva, métodos de síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmento, síntesis de solución clásica, y aún mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963), incorporado aquí para referencia. En la fase sólida, la síntesis se comienza usualmente a partir del extremo C-terminal del péptido usando una resina protegida alfa-amino. Un material de inicio adecuado se puede preparar, por ejemplo, mediante la unión del alfa-aminoácido requerida para una resina clorometilada, una resina de hidroximetilo, o una resina benzhidrilamina. Una resina clorometilada se comercializa bajo la marca registrada BIO-DEADS SX-1 por Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, y la preparación de la resina de hidroximetilo se describe por Bodonszky, et al., Chem. Ind. (Londres), 38:1597 (1966). La resina benzhidrilamina (BHA) se ha

30

descrito por Pietta and Marshall, Chem. Comm. 650 (1970) y esta disponible comercialmente por Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Calif., en la forma de clorhidrato.

Así, los compuestos peptídicos de la invención se pueden
5 preparar mediante el acoplamiento de aminoácido protegido con alfa-amino para la resina clorometilada con la ayuda de, por ejemplo, catalizador de bicarbonato de cesio, de acuerdo con el método descrito por Gisin, Helv. Chim. Acta., 56:1467 (1973). Después del acoplamiento inicial, el grupo protector alfa-amino se remueve por una elección de reactivos incluyendo
10 ácido trifluoroacético (TFA) o soluciones de ácido clorhídrico (HCl) en solventes orgánicos a temperatura ambiente.

Los grupos protectores alfa-amino son aquellos conocidos por ser útiles en la técnica de síntesis en etapas de péptidos. Se incluyen grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos
15 protectores de tipo uretano aromático (por ejemplo, benciloxycarbonilo (Cbz) y CbZ sustituido), grupos protectores de uretano alifático (por ejemplo, t-butiloxycarbonilo (Boc), isopropiloxycarbonilo, ciclohexiloxycarbonilo) y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, bencilo, trifenilmetilo). Boc y Fmoc son grupos protectores preferidos. El grupo protector de cadena lateral queda
20 intacto durante el acoplamiento y no se divide durante la desprotección del grupo protector amino-terminal o durante el acoplamiento. El grupo protector de cadena lateral se debe remover en la terminación de la síntesis del péptido final y bajo condiciones de reacción que no alteran el péptido objetivo.

31

Los grupos protectores de cadena lateral para Tyr incluyen tetrahidropiraniolo, terc-butilo, tritilo, bencilo, Cbz, Z-Br-Cbz, y 2,5-diclorobencilo. Los grupos protectores de cadena lateral para Asp incluyen bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y ciclohexilo. Los grupos protectores de cadena lateral para Thr y Ser incluyen acetilo, benzoilo, tritilo, tetrahidropiraniolo, bencilo, 2,6-diclorobencilo y Cbz. El grupo protector de cadena lateral para Thr y Ser es bencilo. Los grupos protectores de cadena lateral para Arg incluyen nitro, tosilo (Tos), Cbz, mesitoilsulfonilo de adamantiloxicarbonilo (Mts), o Boc. Los grupos protectores de cadena lateral para Lys incluyen Cbz, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-BrCbz). Tos, o Boc.

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

Después de que la secuencia de aminoácido deseada se ha completado, el péptido deseado se desacopla del soporte de resina mediante tratamiento por un reactivo tal como ácido trifluoroacético o fluoruro de hidrógeno (HF), que no solamente escinde el péptido de la resina, sino también escinde todos los grupos protectores de cadena lateral restantes. Cuando se usa la resina clorometilada, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno

32

(HF) resulta en la formación de ácidos de péptido libres. Cuando se usa la resina benzhidrilamina, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno resulta directamente en la amida de péptido libre. De manera alternativa, cuando se emplea la resina clorometilada, el péptido protegido de cadena lateral se puede desacoplar mediante el tratamiento de la resina peptídica con amoníaco para proporcionar la amida protegida de cadena lateral deseada o con una alquilamina para proporcionar una alquilamida o dialquilamida protegida de cadena lateral. Dicha protección de cadena después se remueve en la manera usual por el tratamiento con fluoruro de hidrógeno para proporcionar las amidas, alquilamidas o dialquilamidas libres.

Estos procedimientos de síntesis de péptido de fase sólida son bien conocidos en la técnica y además se describen por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd ed. Pierce Chemical Company, 1984).

B. Aminoácidos sintéticos

Estos procedimientos también se pueden usar para sintetizar péptidos en los cuales los aminoácidos diferentes de los 20 de origen natural, que codifican genéticamente aminoácidos se sustituyen en uno, dos o más posiciones de cualquiera de los compuestos de la invención.

Se pueden reemplazar las cadenas laterales de origen natural de los 20 aminoácidos codificados genéticamente (o aminoácidos D) con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos tales como alquilo, alquilo inferior,

33

alquilo de 4-, 5-, 6- o 7 miembros cíclico, amida, alquilo inferior de amida, di(alquilo inferior) de amida, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, y sus derivados de éster inferior, y con heterocíclicos de 4-, 5-, 6-, o 7 miembros. En particular, se emplean análogos de prolina en los cuales el tamaño del anillo del residuo

5 prolina se cambia de 5 miembros a 4, 6, o 7 miembros. Grupos cíclicos pueden ser saturados o insaturados, y si son insaturados, pueden ser aromáticos o no aromáticos. Grupos heterocíclicos preferiblemente contienen uno o más heteroátomos de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Ejemplos de dichos grupos incluyen el furazanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo,

10 isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (por ejemplo, morfolino), oxazolilo, piperazinilo (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

15 triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden ser sustituidos o no sustituidos. Donde un grupo es sustituido, 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 mediante la fosforilación (véase, por ejemplo, W. Bannwarth, et al., Biorganic and Medicinal Chemistry Letters, 6(17): 2141-2146 (1996), y otros métodos para la fabricación de derivados peptídicos de compuestos de la presente invención como se describe en Hruby, et al., Biochem. J., 268(2): 249-262 (1990). Así, los compuestos peptídicos de la

20

74

invención también sirven como una base para preparar peptidomiméticos con actividad biológica similar.

C. Modificaciones terminales

5 Aquellos de experiencia 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 como el
compuesto peptídico correspondiente pero con más actividad favorable que el
compuesto peptídico con respecto a la solubilidad, estabilidad, y
10 susceptibilidad para la hidrólisis y proteólisis. Véase, por ejemplo, Morgan et
al., Ann. Rep. Med. Chem, 24:243-252 (1989). Lo siguiente describe métodos
para la preparación de compuestos peptídicos modificados en el grupo amino
N-terminal, el grupo carboxilo C-terminal, y/o cargando uno o más de los
enlaces amido en el péptido a un enlace no amido. Se entiende que dos o
15 más dichas modificaciones se pueden acoplar en una estructura de
compuesto peptídico (por ejemplo, la modificación en el grupo carboxilo C-
terminal y la inclusión de un enlace -CH₂-carbamato entre dos aminoácidos en
el compuesto peptídico).

20 1. Modificación N-terminal

Los compuestos peptídicos usualmente se sintetizan como el
ácido libre pero, como se nota anteriormente, se pueden preparar como la
amida o éster. También se puede modificar la amino y/o carboxi terminal del



compuesto peptídico de la invención para producir otros compuestos de la invención. Las modificaciones amino terminal incluyen metilación, acetilación, adición de un grupo benciloxycarbonilo, o bloqueo de amino terminal con cualquier grupo de bloqueo que contiene funcionalidad carboxilato definida por RCOO⁻, donde R se selecciona del grupo que consiste en naftilo, acridinilo, esteroídilo, y grupos similares. Modificaciones de carboxi terminal incluyen reemplazar el ácido libre con un grupo carboxamida o la formación de una lactama cíclica en la carboxi terminal para introducir limitaciones estructurales.

Modificaciones amino terminal son como se describen anteriormente e incluyen alquilación, acetilación, adición de un grupo carbobenzoilo, formación de un grupo succinimida, etc, (Véase, por ejemplo, Murray, et al., Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th ed., Vol. 1 Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc. (1995)). Específicamente, el grupo amino N-terminal después se puede hacer reaccionar como sigue:

(a) para formar un grupo amida de la fórmula RC(O)NH- donde R es como se define anteriormente mediante la reacción con un haluro ácido o anhídrido simétrico. Usualmente, la reacción se puede conducir mediante el contacto aproximado de cantidades equimolares o en exceso (por ejemplo aproximadamente 5 equivalentes) de un haluro ácido al péptido en un diluyente inerte (por ejemplo, diclorometano) preferiblemente conteniendo un exceso (por ejemplo, aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina, o escindir el ácido generado durante la reacción. Las condiciones de reacción de otra manera son convencionales

(por ejemplo, temperatura ambiente durante 30 minutos). La alquilación de terminal amino se provee para una N-sustitución de alquilo inferior seguida por la reacción con un haluro ácido como se describe anteriormente, se provee para el grupo amida N-alquilo de la fórmula $RC(O)NR-$;

5 (b) para formar un grupo succinimida mediante la reacción con anhídrido succínico. Como anteriormente, una cantidad equimolar aproximadamente o un exceso de anhídrido succínico (por ejemplo aproximadamente 5 equivalentes) se puede emplear y el grupo amino se convierte a la succinimida por métodos bien conocidos en la técnica que
10 incluyen el uso de un exceso (por ejemplo, diez equivalentes) de una amina terciaria tal como diisopropiletilamina en un solvente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano). Véase, por ejemplo, Wollenberg et al., Patente de E.U.A. No. 4,612,132 que se incorpora aquí para referencia en su totalidad. Se entiende que el grupo succínico se puede sustituir con, por ejemplo, alquilo
15 o sustituyentes -SR que se preparan de una manera convencional para proveer succinimida sustituida en la N-terminal del péptido. Dichos sustituyentes alquilo se preparan mediante la reacción de una olefina inferior con anhídrido maléico en la manera descrita por Wollenberg, et al., supra y sustituyentes -SR se preparan mediante la reacción de RSH con anhídrido
20 maléico donde R es como se define anteriormente;

 (c) para formar un grupo benciloxycarbonil-NH- o benciloxycarbonil-NH- sustituido mediante la reacción con aproximadamente una cantidad equivalente o un exceso de CBZ-Cl (es decir, cloruro de

37

benciloxycarbonilo) o CBZ-Cl sustituido en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) preferiblemente conteniendo una amina terciaria para escindir el ácido generado durante la reacción;

(d) para formar un grupo sulfonamida mediante la reacción con
5 una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de R-S(O)₂ Cl en un diluyente inerte adecuado (diclorometano) para convertir la terminal amina en una sulfonamida donde R es como se define anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene amina terciaria en exceso (por ejemplo, diez equivalentes) tal como diisopropiletilamina, para escindir el
10 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 carbamato mediante la reacción con una cantidad equivalente o un exceso (por ejemplo, 5 equivalentes) de R-
15 OC(O)Cl o R-OC(O)OC₆H₄-p-NO₂ en un diluyente inerte adecuado (por ejemplo, diclorometano) para convertir la terminal amina 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 escindir cualquier ácido
20 generado durante la reacción. Las condiciones de reacción son convencionales de otra manera (por ejemplo temperatura ambiente durante 30 minutos), y

(f) para formar un grupo urea mediante la reacción con una

38

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 terminal amina en un grupo urea (es decir, $RNHC(O)NH-$) donde R es como se define anteriormente. Preferiblemente, el diluyente inerte contiene un
5 exceso (por ejemplo aproximadamente 10 equivalentes) de una amina terciaria, tal como diisopropiletilamina. Condiciones de reacción son de otra manera convencionales (por ejemplo, temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos).

10 2. Modificaciones C-terminal

En la preparación de compuestos peptídicos en donde el grupo carboxilo C-terminal se reemplaza por un éster (es decir, $-C(O)OR$ donde R es como se define anteriormente), se emplean las resinas usadas para preparar los ácidos peptídicos, y el péptido protegido de cadena lateral se escinde con
15 una base y el alcohol apropiado, por ejemplo, metanol. Grupos protectores de cadena lateral después se remueven en la manera usual mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno para obtener el éster deseado.

En la preparación de compuestos peptídicos en donde el grupo carboxilo C-terminal se reemplaza por la amida $-C(O)NR^3R^4$, una resina de
20 benzhidrilamina se usa como el soporte sólido para la síntesis de péptido. En la terminación de la síntesis, el tratamiento de fluoruro de hidrógeno para liberar el péptido del soporte resulta directamente en la amida peptídica libre (es decir, la C-terminal es $-C(O)NH_2$). De manera alternativa, el uso de resina

clorometilada durante la síntesis de péptido acoplada con la reacción con amoniaco para escindir el péptido protegido de cadena lateral del soporte produce la amida peptídica libre y la reacción con una alquilamina o una dialquilamina produce una alquilamida o dialquilamida protegida de cadena lateral (es decir, la C-terminal es $-C(O)NRR^1$ donde R y R^1 son como se definen anteriormente). La protección de cadena lateral después se remueve en al manera usual mediante el tratamiento con fluoruro de hidrógeno para proporcionar las amidas, alquilamidas, o dialquilamidas libres.

También se puede ciclizar los compuestos peptídicos de la invención, o incorporar un residuo desamino o descarboxi en los límites del compuesto peptídico, entonces no existe terminal amino o grupo carboxilo, para disminuir la susceptibilidad para proteasas o para restringir la conformación del compuesto peptídico. Grupos funcionales C-terminal de compuesto peptídicos de la presente invención incluyen amida, alquilo inferior de amida, di(alquilo inferior) de amida, alcoxi inferior, hidroxilo, y carboxi, y sus derivados de éster inferior, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Además de las modificaciones N-terminal y C-terminal anteriores, los compuestos peptídicos de la invención, incluyendo peptidomiméticos, se pueden modificar ventajosamente con o acoplar covalentemente con uno o más de una variedad de polímeros hidrófilos. Se ha encontrado que cuando los compuestos peptídicos se derivan con un polímero hidrófilo, su solubilidad y vidas medias de circulación se incrementan y su inmunogenicidad se cubre. Lo anterior se puede realizar con poca, si la hay,

40

disminución en su actividad de unión. Polímeros no proteináceos adecuados para el uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polialquileteres como se ejemplifica por polietilenglicol y polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxoalquilenos, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, celulosa, y derivados de celulosa, dextran y derivados de dextran, etc. Generalmente, tales polímeros hidrófilos tienen un peso molecular promedio que varía de aproximadamente 500 a aproximadamente 100,000 daltons, más preferiblemente de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 40,000 daltons y aún más preferiblemente, de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 20,000 daltons. En modalidades preferidas, dichos 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 derivar con o acoplar a dichos polímeros usando cualquiera de los métodos expuestos en Zallipsky, S., Bioconjugate Chem., 6:150-165(1995); Monfardini, C et al., Bioconjugate Chem., 6:62-69 (1995); Pat. de E.U.A. No. 4,640,835; Pat. de E.U.A. No. 4,496,689; Pat. de E.U.A. No. 4,301,144; Pat. de E.U.A. No. 4,670,417; Pat. de E.U.A. No. 4,791,192; Pat. de E.U.A. No. 4,179,337 o WO 95/34326, todos de los cuales se incorporan aquí para referencia en su totalidad.

En una modalidad preferida presentemente, los compuestos peptídicos de la presente invención se derivan de polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero soluble en agua, lineal, de óxido de etileno repitiendo unidades

41

con dos grupos hidroxilo terminal. PEG se clasifican por sus pesos moleculares que usualmente varían de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 40,000 daltons. En una modalidad preferida presentemente, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5,000 daltons a aproximadamente 20,000 daltons. PEG acoplado a compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser ambos ramificados o no ramificados. (Véase, por ejemplo, Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem., 6:62-69 (1995)). PEG son comercialmente disponibles de Sheawater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala) (ahora parte de Nektar Therapeutics (San Carlo, CA), Sigma Chemical Co. y otras compañías. Dichos PEG incluyen, pero no se limitan a, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

Brevemente, en una modalidad, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, es preferiblemente bloqueado en un extremo por un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. Por lo tanto, el polímero se activa en el otro extremo mediante la reacción con un agente de activación adecuado, tal como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro, bromuro o fluoruro cianúrico), diimidazol, un reactivo anhídrido (por ejemplo, anhídrido dihalosuccínico, tal como anhídrido dibromosuccínico), azida de acilo, p-diazoniobenciléter, 3-(p-diazoniufenoxi)-2-hidroxipropiléter y lo similar.

42

El polímero activado después se hace reaccionar con un compuesto peptídico de la presente invención para producir un compuesto peptídico derivado con un polímero. De manera alternativa, un grupo funcional en los compuestos peptídicos de la invención se puede activar para la reacción con el polímero, o
5 los dos grupos se pueden unir en una reacción de acoplamiento concertada usando métodos de acoplamiento conocidos. Se apreciará que los compuestos peptídicos de la invención se pueden derivar con PEG usando una cantidad innumerable de otros esquemas de reacción conocidos y usados por aquellos con experiencia en la técnica.

10 Cuando los compuestos peptídicos se derivan con un polímero hidrófilo, su vida media de solubilidad y circulación se incrementan y su inmunogenicidad se disminuye. Lo anterior se puede realizar con poca, si la hay, pérdida en la actividad biológica. En modalidades preferidas, los péptidos derivados tienen una actividad que es 0.1 a 0.01 veces aquella de los péptidos
15 no modificados. En modalidades más preferidas, los péptidos derivados tienen una actividad que es 0.1 a 1 vez aquella de los péptidos no modificados. En aún modalidades más preferidas, los péptidos derivados tienen una actividad que es mayor a aquella de los péptidos no modificados.

20

D. Modificaciones de cadena primaria

Otros métodos para elaborar derivados peptídicos de los compuestos de la presente invención se describen en Hruby, et al., Biochem J., 268(2):249-262 (1990), incorporada para referencia aquí. De este modo,

43

los compuestos peptídicos de la invención también sirven como modelos estructurales para compuestos no peptídicos con actividad biológica similar. Aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que una variedad de técnicas están disponibles para la construcción de compuestos con la misma

5 o similar actividad biológica deseada que el compuesto peptídico guía pero con más actividad favorable que el guía con respecto a solubilidad, estabilidad, y susceptibilidad a hidrólisis y proteólisis. Ver Morgan, et al., Ann. Rep. Med. Chem., 24:243-252 (1989), incorporada en la presente para referencia. Estas técnicas incluyen el reemplazo de la cadena primaria

10 peptídico con una cadena primaria compuesta de fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminas secundarias, y ácidos N-metilamino.

Reactivos adecuados incluyen, por ejemplo, análogos de aminoácidos en donde el grupo carboxilo del aminoácido se ha reemplazado con un radical adecuado para la formación de uno de los enlaces anteriores.

15 De manera similar, el reemplazo de un enlace amido en el péptido con un enlace fosfonato se puede lograr de la manera expuesta en la patente de E.U.A. Nos. 5,359,115 y 5,420,328, cuyas descripciones se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

20 E. Formación de enlace disulfuro

Los compuestos de la presente invención pueden existir en una forma ciclizada con un enlace disulfuro intra-molecular entre los grupos tiol de

□isterna□ incorporadas, si están presentes. Alternativamente, un enlace

44

□ister-molecular disulfuro entre los grupos tiol de las □isterna□ se puede producir para dar como resultado un compuesto dimérico (u oligomérico superior). Uno o más de los residuos de □isterna también se pueden sustituir con una homocisteína.

5

V. Utilidad

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

Los compuestos peptídicos también son útiles como aglutinantes competitivos en ensayos para clasificar los nuevos agonistas del receptor TPO. En dichas modalidades de ensayo, los compuestos peptídicos de la invención se pueden usar sin modificación o se pueden modificar en una variedad de formas; por ejemplo, por etiquetado, tal como unión de manera covalente o no covalente de un radical que provee de manera directa o indirecta una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, los materiales para estos se pueden etiquetar ya sea de manera directa o indirecta. Posibilidades para el etiquetado directo incluyen grupos de etiquetado tales

45

como: radioetiquetas tales como ^{125}I , enzimas (patente de E.U.A. No. 3,645,090) tal como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y etiquetas fluorescentes (patente de E.U.A. No. 3,940,475) capaces de monitorear el cambio en la intensidad fluorescente, desplazamiento de longitud de onda, o polarización por fluorescencia. Posibilidades para etiquetado indirecto incluyen biotinylation de un constituyente seguido por la unión a α -lacton acoplada a uno de los grupos de etiquetado anteriores. Los compuestos peptídicos también pueden incluir espaciadores o enlazadores en casos donde los compuestos peptídicos se unen a un soporte sólido.

10 Además, con base en su capacidad para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden usar como reactivos para la detección de receptores TPO en células vivientes, células fijas, en fluidos biológicos, en homogenatos de tejido, en materiales purificados, naturales biológicos, etc. Por ejemplo, mediante el etiquetado de

15 dichos compuestos peptídicos, uno puede identificar células que tienen TPO-R en sus superficies. Además, con base en su capacidad para unir el receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden usar en tinción in situ, FACS (clasificación celular activada por fluorescencia), procedimiento Western blot, ELISA, etc. Además, con base en su capacidad

20 para unirse al receptor de TPO, los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden usar en la purificación del receptor, o en la purificación de receptores de TPO que expresan células sobre la superficie celular (células permeabilizadas internas).

46

Los compuestos peptídicos de la presente invención también se pueden utilizar como reactivos comerciales para varios usos de investigación y de diagnóstico médicos. Dichos usos incluyen pero no se limitan a: (1) uso como un estándar de calibración para cuantificar las actividades de agonistas de TPO candidatos en una variedad de ensayos funcionales; (2) uso para mantener la proliferación y crecimiento de líneas celulares dependientes de TPO; (3) uso en el análisis estructural de la co-cristalización a través del receptor de TPO; (4) uso para investigar el mecanismo de la transducción de señal de TPO/activación del receptor; y (5) otras aplicaciones de investigación y diagnóstico en donde el receptor de TPO preferiblemente se activa o dicha activación se calibra de manera conveniente contra una cantidad conocida de un agonista de TPO, y lo similar.

Los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden usar para la expansión *in vitro* de megacariocitos y sus progenitores presentados, ambos junto con citocinas adicionales o en sí. Ver, por ejemplo, DiGiusto, et al., publicación PCT No. 95/05843, que se incorpora en la presente para referencia. Quimioterapia y terapias de radiación causan trombocitopenia al asesinar la población de megacariocitos más maduros y que se dividen rápidamente. No obstante, estos tratamientos terapéuticos también pueden reducir el número y viabilidad de las células precursoras de megacariocitos mitóticamente menos activas e inmaduras. De este modo, la mejora de la trombocitopenia por TPO o los compuestos de la presente invención se puede acelerar por infusión de los pacientes con terapia post

quimioterapia o 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 los seres humanos, para activar el TPO-R *in vivo*. De este modo, la presente invención incluye métodos para el tratamiento terapéutico de trastornos relacionados a 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 sin limitarse a trastornos de plaqueta y trombocitopenia, particularmente cuando se asocia con transfusiones de médula ósea, terapia de radiación, y quimioterapia.

En algunas modalidades de la invención, los antagonistas de TPO preferiblemente se administran primero a pacientes que experimentan la quimioterapia o terapia de radiación, 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) que se incorpora en la presente para referencia.

De acuerdo a una modalidad, las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de trombocitopenia asociada con

48

transfusiones de médula ósea, terapia de radiación, o quimioterapia. Los compuestos peptídicos normalmente se administrarán de manera profiláctica antes de la quimioterapia, terapia de radiación, o trasplante de médula ósea o después de dicha exposición.

5 En consecuencia, la presente invención también provee composiciones farmacéuticas que comprenden, como un 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 medio de rutas oral, pulmonar, parental
10 (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), inhalación (vía una formulación en polvo fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal o sublingual de administración y se puede formular en formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración. Véase, por ejemplo, Bernstein, et al., publicación de patente No. WO 93/25221; Pitt, et al.,
15 publicación de patente PCT No. WO 94/17784; y Pitt, et al., solicitud de patente europea 613,683 cada una de las cuales se incorpora aquí para referencia.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de
20 dosificación sólida, el compuesto peptídico activo se mezcla con al menos un portador farmacéuticamente aceptable inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es normal en la práctica, sustancias adicionales diferentes de diluyentes inertes,

por ejemplo, agentes de lubricación tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de regulación de Ph. Las tabletas y píldoras adicionalmente se pueden preparar con recubrimientos entéricos.

- 5 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, jarabes farmacéuticamente aceptables con elixires que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tal como agua. Además dichos diluyentes inertes, composiciones pueden también incluir adyuvantes, tales como agentes de humectación, agentes de emulsionamiento y de suspensión, y agentes edulcorantes, saborizantes y de perfume.
- 10

- Preparaciones de acuerdo a esta invención para administración parental incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones. Ejemplos de solventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de olivo y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Dichas formas de dosificación también pueden contener adyuvantes tales como agentes de conservación, de humectación, emulsionamiento y de dispersión. Se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias mediante la incorporación de agentes de esterilización en las composiciones, al irradiar las composiciones, o por calentamiento de las composiciones. También se pueden elaborar usando agua estéril, o parte de otros medios inyectables estériles, inmediatamente antes de usarse.
- 15
- 20

Las composiciones para la administración rectal o vaginal preferiblemente son supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes tales como manteca de cacao o una cera para supositorio. Composiciones para administración nasal o sublingual también se
5 pueden preparar 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 de una enfermedad, como se describió anteriormente, en una
10 cantidad suficiente para curar o al menos suprimir parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para realizar esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la enfermedad y el peso y estado general del paciente.

15 Las composiciones de la invención también se pueden microencapsular, por ejemplo, por el método de Tice y bibi (en *Treatise on controlled drug delivery*, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, New York (1992), pp. 315-339).

En aplicaciones profilácticas, composiciones que contienen los
20 compuestos peptídicos de la invención se administran a un paciente susceptible o que está en riesgo de otra forma de una enfermedad particular. Tal cantidad se define por ser una "dosis profilácticamente efectiva". En este uso, las cantidades precisas nuevamente dependen del estado de salud del

5

paciente y su peso.

Las cantidades del compuesto peptídico necesarias para la terapia efectiva dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio objetivo, estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. De este modo, las dosificaciones de tratamiento deben ser valoradas para optimizar la seguridad y eficacia. Normalmente, las dosificaciones usadas pueden proveer una guía útil en las cantidades útiles para administración in situ de estos reactivos. La prueba en animales de dosis efectivas para el tratamiento de trastornos particulares proveerá indicación de predicción adicional de dosificación a humanos. Varias consideraciones se describen, por ejemplo, en Gilman, et al. (eds), Goodman and Gilman's; the Pharmacological basis of therapeutics, 8a ed., Pergamon press (1990); y Remington pharmaceutical sciences, 7a ed., Mack publishing Co., Easton, Pa. (1985); cada una de las cuales se incorpora por la presente para referencia.

Los compuestos peptídicos de esta invención son efectivos en el tratamiento de condiciones mediadas por TPO cuando se administran en un intervalo de dosificación de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día. La dosis específica empleada se regula por medio de la condición particular a ser tratada, la ruta de administración así como por la consideración del médico que atiende dependiendo de los factores tales como la severidad de la condición, la edad y condición general del paciente, y lo similar.

52

EJEMPLO 1

Síntesis del compuesto peptídico en fase sólida

Los compuestos peptídicos de la invención se pueden sintetizar, por ejemplo, usando las técnicas de síntesis de fase sólida Merrifield (véase Steward and Young, solid phase peptide synthesis, 2a edición, Pierce Chemical, Rockford, Ill. (1984) y Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)) o un sintetizador peptídico modelo 431A o 433A Applied Biosystems Inc. Los compuestos peptídicos se pueden ensamblar usando protocolos estándar del Applied Biosystems Inc. Synth Assist™ 1.0.0 o Synth Assist™ 2.02. Cada acoplamiento se puede llevar a cabo durante 2 x 30 minutos con HBTU (2-(1Hbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato y HOBt (1-hidroxibenzotriazol).

La resina usada puede ser una resina HMP (p-hidroximetil fenoximetil)poliestireno o PAL (Milligen/Biosearch), que es una resina de poliéstereno entrelazada con ácido 5-(4'-Fmoc-aminometil-3,5'-dimetoxifenoxi)valérico como un enlazador. El uso de resina PAL resulta en una funcionalidad amida terminal carboxilo durante la escisión del péptido de la resina. Durante la escisión, la resina HMP produce un radical ácido carboxílico en el C-terminal del producto final. La mayoría de los reactivos, resinas, y aminoácidos protegidos (libre o en la resina) se pueden adquirir de Millipore o Applied Biosystems Inc.

El grupo Fmoc se puede usar para la protección amino durante

el procedimiento de acoplamiento. La protección amina primaria en aminoácidos se puede lograr con Fmoc y grupos de protección de cadena lateral tales como t-butilo para serina, tirosina, ácido glutámico, y treonina; tritilo para glutamina; Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonyl) para arginina; N-t-butiloxycarbonilo para triptofano; N-tritilo para histidina y S-tritilo para cisteína se puede emplear.

- La remoción de los compuestos peptídicos de la resina y desprotección simultánea de las funciones de cadena lateral se pueden lograr por medio del tratamiento con reactivo K o modificaciones ligeras de este.
- 10 Alternativamente, en la síntesis de aquellos péptidos, con un carboxilo terminal amidado, el péptido ensamblado completamente se puede escindir con una mezcla de ácido trifluoroacético 90%, etanoditiol 5%, y agua 5%, inicialmente a 4°C, e incrementando gradualmente a temperatura ambiente. Los compuestos peptídicos desprotegidos se pueden precipitar con dietil éter.
- 15 Purificación puede ser por cromatografía líquida de alta resolución, fase inversa y preparativa en una columna de gel en sílice aglutinada con C₁₈ con un gradiente de acetonitrilo/agua en ácido trifluoroacético al 0.1%. Los compuestos peptídicos homogéneos se pueden caracterizar por espectrometría de masas o espectrometría de masas por electropulverización
- 20 por bombardeo atómico rápido y análisis de aminoácidos cuando sea aplicable.

En una modalidad preferida, los compuestos peptídicos de esta invención se dimerizan usando procedimientos sintéticos estándar conocidos

y usados por aquellos con experiencia en la técnica. Siguiendo estos esquemas sintéticos, aquellos con experiencia en la técnica pueden preparar fácilmente compuestos peptídicos dímeros de acuerdo con la presente invención. Además, será obvio fácilmente por aquellos con experiencia en la

5 técnica que las subunidades diméricas se pueden enlazar fácilmente usando metodologías y enlazadores conocidos.

EJEMPLO 2

Pegilación de los compuestos peptídicos

10

La pegilación de un compuesto peptídico de la presente invención se puede realizar por medio de técnicas conocidas bien. 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 añade en un

15 exceso molar de 1.25 veces de PEG2 en polvo (comercialmente disponible de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala., ahora Néctar Therapeutics (San Carlo, CA)) y se agita a temperatura ambiente hasta que la reacción se complete, normalmente 1-2 horas. La reacción se monitorea por HPLC de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo 40-65% con una columna

20 YMC ODS AQ. Cuando la reacción se completa, la solución se añade a un segundo exceso 1.25 molar de PEG2 en polvo y el procedimiento se repite 4 veces usando un total de 5 moles de PEG2 para cada mol de polipéptido. La solución se diluye 2 veces con PBS para reducir la viscosidad y se carga en



una columna superdex 200 (Pharmacia), se equilibra previamente y se eluye con PBS. Fracciones de la columna de exclusión de tamaño se puede analizar por HPLC de fase inversa. Las fracciones que contienen di-PEG-polipéptido que eluye antes de que cualquier compuesto peptídico mono-PEG se pueda agrupar y almacenar a 5°C o se liofilizan.

EJEMPLO 3

Estudios animales pre-clínicos en la actividad trombopoyética del compuesto No. 1 PEGilado TPO

10

El compuesto TPO No. 1 no comparte alguna homología de secuencia con TPO endógena, mitigando el riesgo de la formación de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con TPO endógena. El compuesto TPO No. 1 es PEGilado para reducir espacio libre y para reducir además antigenicidad. Este ejemplo describe estudios pre-clínicos en la actividad trombopoyética del compuesto TPO No. 1 PEGilado en un animal.

Ratas Wistar macho normales (fuente) se usan para los estudios. Otros animales, tales como perros, ratones, monos, etc. se pueden usar también para los estudios pre-clínicos. Todos los procedimientos que involucran animales se conducen en una instalación para animales acreditada completamente por la Asociación Americana para Valoración y Acreditación para el Cuidado Animal en Laboratorio (AAALAC) y de acuerdo con La Guía para el cuidado y Uso de animales de laboratorio (NIH).

50

Ratas Wistar macho normales (10 semanas de edad, de 230 a 367 gramos de peso corporal en la dosificación) se tratan con dosis intravenosas de compuesto TPO No. 1 en 30, 100 o 300 $\mu\text{g/kg}$ (40 ratas/grupo). En la predosis, 96, 144, 192, 240, 288 y 312 horas post-dosis, 5 aproximadamente 0.5 ml de sangre se colecta por punción de la vena yugular de ratas no anestesiadas (5 ratas por punto de tiempo, EDTA como anticoagulante) y conteos de plaqueta se valoran usando un sistema de análisis de hematología automatizado. Los animales se mantienen en ayunas durante la noche, con agua disponible, antes de cada colección de muestra.

10 Las dosis intravenosas sencillas de compuesto TPO No. 1 PEGilado (30, 100 o 300 $\mu\text{g/kg}$) resulta en un conteo de plaqueta periférico incrementado en ratas Wistar macho normales por valoración post-dosis al inicio en el día 4 (figura 6). Los conteos de plaqueta se valoran cada 2 días durante la continuación de 2 semanas y se comparan con el conteo de pre- 15 dosis. La dosis de 300 $\mu\text{g/kg}$ induce el incremento más grande en el conteo de plaqueta, que regresa a la línea base en el día 14.

EJEMPLO 4

Estudios clínicos de fase I en la actividad trombopoyética del compuesto

20

TPO No. 1 PEGilado

Los estudios de fase I se conducen para investigar la tolerabilidad, farmacodinámicos y farmacocinéticas de compuesto TPO No. 1

5X

PEGilado. Este ejemplo describe estudios de fase I en el compuesto TPO No. 1 PEGilado después de una inyección intravenosa sencilla en voluntarios masculinos saludables. Los estudios de fase I en el compuesto TPO No. 1 PEGilado y otros compuestos de acuerdo a la invención después de inyección intravenosa múltiple u otros medios de administración y/o a un paciente en necesidad de un tratamiento se puede realizar usando protocolos conocidos por una persona con experiencia en la técnica.

Cuarenta voluntarios se asignan al azar para recibir el compuesto TPO No. 1 PEGilado o placebo como una inyección de bolo i.v. sencilla en una relación de 6:2. Ocho sujetos se asignan al azar en una relación 6:2 para recibir una inyección sencilla de compuesto TPO No. 1 PEGilado o placebo, con un intervalo de dosis de 0.375, 0.75, 1.5, 2.25 o 3 $\mu\text{g/kg}$. La respuesta farmacodinámica del compuesto TPO No. 1 PEGilado se mide como elevación de los conteos de plaqueta. Los niveles de compuesto TPO No. 1 PEGilado se determinan en plasma deficiente de plaquetas usando un ensayo inmuno-absorbente enlazado por enzima validado. Los niveles de TPO endógena, EPO, IL-6 e IL-11 se miden en los puntos del tiempo indicados usando inmuno-ensayos estándar. Un inmuno-ensayo de bio-sensor (BiaCore technology) se usa para medir formación de anticuerpos contra el radical peptídico del compuesto TPO No. 1 PEGilado. El efecto en la función de plaqueta se mide al monitorear agregación de plaqueta inducida por colágeno en 4 horas y 12 días después de la administración del compuesto TPO No. 1 PEGilado.

El análisis PK indica cinéticas relacionadas con la dosis del compuesto TPO No. 1 PEGilado, aunque en dosis de 0.75 $\mu\text{g/kg}$ o menor, concentraciones en plasma de compuesto TPO No. 1 PEGilado generalmente se encuentran debajo del límite de cuantificación de 6.25 ng/ml (figura 7).

- 5 Cuatro sujetos en el grupo de dosis 0.375 $\mu\text{g/kg}$ y un sujeto en el grupo de dosis del compuesto TPO No. 1 PEGilado 3.0 $\mu\text{g/kg}$ no tiene niveles de plasma cuantificables. Valores $C_{\text{máx}}$ medios varían de 10.9 ng/ml en 0.75 $\mu\text{g/kg}$ de compuesto TPO No. 1 PEGilado a 61.7 ng/ml en 3.0 $\mu\text{g/kg}$ de compuesto TPO No. 1 PEGilado (cuadro 1). No se pueden medir datos PK en
- 10 0.375 $\mu\text{g/kg}$ i.v. de compuesto TPO No. 1. La vida media terminal media del compuesto TPO No. 1 PEGilado varía de aproximadamente 18 a 36 horas. La $t_{\text{máx}}$ mediano varía de 0.09 a 2 horas. El incremento en $C_{\text{máx}}$ con el incremento de la dosis es aproximadamente proporcional a la dosis, pero no hay un incremento aparente en el valor normalizado de AUC_{0-24} con un incremento de
- 15 la dosis, sugiriendo un incremento más alto al del incremento proporcional a la dosis.

CUADRO1**Compendio de análisis PK**

	C _{máx} (ng/ml)	T _{1/2} (h)	AUC _∞ (ngh/ml)	AUC ₀₋₂₄ (ngh/ml)
Dosis 0.75 µg/kg				
N	6	1	0	0
Media	10.9	NQ	NQ	NQ
Min-máx	BLQ-18.8	18.6	NQ	NQ
Dosis 1.5 µg/kg				
N	6	2	1	4
Media	20.9	NQ	NQ	311
Min-máx	7.53-28.5	13.1-22.5	475	268-359
Dosis 2.255 µg/kg				
N	6	2	3	4
Media	39.7	NQ	1561	678
Min-máx	13.1-59.1	29.8-48.5	1551-1569	655-694
Dosis 3.0 µg/kg, excluyendo el sujeto 1027 que no tiene concentraciones de cuantificación				
N	6	4	3	5
Media	61.7	36.1	2257	965
Min-máx	53.9-76.0	27.7-51.3	1773-2764	823-1124

La respuesta de plaqueta a la administración de compuesto TPO

- 15 No. 1 PEGilado es similar a los resultados publicados para rhTPO y AMG531. Los conteos de plaqueta se incrementan dependientemente de la dosis alcanzando niveles máximos en el día 10-12, y los conteos retornan a la línea base dentro de 3 a 4 semanas (figura 8). Los conteos de plaqueta máximos medios varían de $315 \times 10^9/l$ en $0.375 \mu g/kg$ i.v. a $685 \times 10^9/l$ en $3 \mu g/kg$ i.v., y
- 20 los conteos de plaqueta máximos medios se incrementan de la línea base varía de 1.4 veces en $0.375 \mu g/kg$ a 3.2 veces en $3.0 \mu g/kg$ (cuadro 2). Al menos 50% de incremento en plaquetas se observa en 4 de 6 sujetos que reciben el compuesto TPO No. 1 PEGilado en una dosis de $0.75 \mu g/kg$,

aunque al menos un incremento del doble en el conteo de plaqueta se observa en aproximadamente 3 de 6 sujetos en una dosis de 1.5 ug/kg, etc. La dosis de 0.75 ug/kg i.v. se ha seleccionado como la dosis de inicio para el estudio clínico fase II.

- 5 Aparte de cambios en conteos de plaqueta, otras células de sangre de circulación maduras diferentes no se afectan (datos no mostrados). Además, la administración del compuesto TPO No. 1 PEGilado no afecta la función de la plaqueta, ni en el momento de administración, ni en los 12 días post-dosis, en el momento de la aparición de plaquetas nuevamente
- 10 producidas.

CUADRO2

Compendio de análisis de conteo de plaquetas

	Compuesto TPO No. 1 PEGilado	0 ($\mu\text{g/kg}$)	0.375 ($\mu\text{g/kg}$)	0.75 ($\mu\text{g/kg}$)	1.5 ($\mu\text{g/kg}$)	2.25 ($\mu\text{g/kg}$)	3.0 ($\mu\text{g/kg}$)
15	N	10	6	6	6	6	6
	n (> 1.5 x)	0	3	3	4	4	5
	n (> 2 x)	0	0	1	3	4	5
	n (> 3 x)	0	0	0	0	0	4
	n (> 4 x)	0	0	0	0	0	1
	Plt_0 ($10^9/\text{l}$) ¹⁾	192/203 (163- 233)	223/205 (159- 304)	212/212 (155- 264)	228/230 (200- 258)	215/203 (193- 261)	208/200 (150- 284)
20	$\text{Plt}_{\text{máx}}$ ($10^9/\text{l}$) ¹⁾	230/225 (189- 271)	315/309 (214- 482)	347/335 (232- 495)	430/458 (238- 597)	454/500 (254- 576)	685/750 (188- 979)
	$\text{Plt}_{\text{máx}}/\text{Plt}_0$ ¹⁾	1.14/1.1 3	1.42/1.4 2	1.63/1.6 3	1.91/2.1 3	2.15/2.3 3	3.21/3.5 0

El efecto de la administración del compuesto TPO No. 1 PEGilado en los factores de crecimiento que se conocen por poseer actividad

61

trombopoyética se valora. Los niveles de TPO endógenos incrementan de una manera dependiente de la dosis, alcanzando niveles máximos en 3 días post-dosis (figura 9). No se observan cambios significativos en los niveles en sangre de IL-6, IL-11 y niveles EPO.

- 5 La función de la plaqueta, valorada como agregación de plaqueta inducida por colágeno en sangre entera, no es diferente entre los tratamientos. Ninguno de los sujetos experimenta un evento adverso serio o toxicidades limitantes de la dosis. Los eventos adversos observados más frecuentemente incluyen dolor de cabeza medio y fatiga y ocurren después del
- 10 tratamiento activo y placebo. No se detectan anticuerpos contra el compuesto TPO No. 1 PEGilado. Estos resultados indican que el compuesto TPO No. 1 PEGilado es bien tolerado en el intervalo de dosis analizado.

- Aunque solo modalidades preferidas de la invención se describen de manera específica como anteriormente, se apreciará que
- 15 modificaciones y variaciones de la invención son posibles sin desviarse de la esencia y alcance propuesto de la invención.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método para el tratamiento de un paciente que padece de un trastorno que es susceptible al tratamiento con un agonista de trombopoyetina, que comprende la administración a un paciente de una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto peptídico que comprende la siguiente secuencia (H-EIGPTLRQ(2-Nal)LAARX₁₀)-K(NH₂)-
10 (X₁₀RAAL(2-Nal)QRLTPGEI)-H, (SEQ ID NO: 7) en donde X₁₀ es sarcosina.

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho compuesto peptídico se administra en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 5 mg/kg.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 1,
15 caracterizado además porque dicho compuesto peptídico se administra en un intervalo de dosis de entre aproximadamente 0.375, 0.75, 1.5, 2.25 o 3 mg/kg, respectivamente.

4.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico
20 resulta en un valor de C_{max} medio de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 0.75 µg/kg de compuesto peptídico.

5.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico

63

resulta en un valor de $C_{\max}$ medio de aproximadamente 60 ng/ml a aproximadamente 3.0 $\mu\text{g/kg}$ de compuesto peptídico.

6.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico
5 resulta en una vida media terminal media de dicho compuesto peptídico de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 36 horas.

7.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico
10 resulta en un $t_{\max}$ mediano de aproximadamente 0.09 horas a aproximadamente 2 horas.

8.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico resulta en aproximadamente un incremento de 50% en el conteo de plaquetas en una dosis de aproximadamente 0.75 $\mu\text{g/kg}$.

15 9.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico resulta en aproximadamente un incremento de 2 veces en el conteo de plaquetas en una dosis de más de aproximadamente 0.75 $\mu\text{g/kg}$.

10.- El método de conformidad con la reivindicación 1,
20 caracterizado además porque la administración de dicho compuesto peptídico resulta en un incremento en niveles de TPO endógena.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho compuesto peptídico se une

64

covalentemente a un polímero hidrófilo.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 500 a aproximadamente 40,000 daltons.

5 13.- El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque el polímero hidrófilo tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 5,000 a aproximadamente 20,000 daltons.

10 14.- El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque el polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.

15 15.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque el polímero hidrófilo es polietilenglicol.

16 16.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el compuesto peptídico es dimerizado.

17.- El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado además porque cada una de las subunidades diméricas del compuesto peptídico se une covalentemente a un polímero hidrófilo.

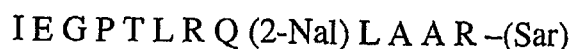
20 18.- El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo es polietilenglicol.

19.- El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado además porque el polietilenglicol se selecciona del grupo que

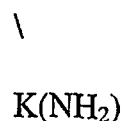
65

consiste en monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y
 5 monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

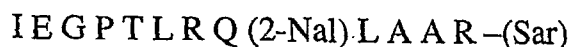
20.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho compuesto peptídico tiene la siguiente fórmula:



10



/



en donde (2-Nal) es β -(2-naftil)alanina y (Sar) es sarcosina.

15 21.- El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado además porque dicho compuesto peptídico se une de manera covalente a un polímero hidrófilo.

22.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo se selecciona del
 20 grupo que consta de polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.

23.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo es polietilenglicol.

64

24.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 5,000 a aproximadamente 20,000 daltons.

5 25.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado además porque el polietilenglicol se selecciona del grupo que consta de monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina
10 (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazol-carbonilo (MePEG-IM).

26.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado además porque cada una de las subunidades de dicho compuesto peptídico está unida de manera covalente a un polímero hidrófilo.

15 27.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consta de polietilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico y ácido poliglicólico.

28.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación
20 27, caracterizado además porque dicho polímero hidrófilo es polietilenglicol.

29.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque dicho polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 5,000 a aproximadamente

67

20,000 daltons.

- 30.- El compuesto peptídico de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque el polietilenglicol se selecciona del grupo que consta de monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH),
- 5 monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazol-carbonilo (MePEG-IM).

Sequence Listing (from parent case - prepared by Harbor Consulting).txt
SEQUENCE LISTING

<110> MACDONALD, BRIAN R.
WEIS, JEFFERY KENNETH
YURKOW, EDWARD JOHN

<120> PEPTIDES AND COMPOUNDS THAT BIND TO A RECEPTOR

<130> TDP-5001-USANP

<140> 10/918,561
<141> 2004-08-13

<150> 60/498,740
<151> 2003-08-28

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide motif

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)
<223> Variable amino acid

<400> 1
Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)
<223> Ala, Cys, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Arg, Gln,
Ser, Thr, or Val, preferably Ala or Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)
<223> Ala, Cys, Asp, Glu, Lys, Leu, Gln, Arg, Ser, Thr,
or Val, preferably Asp, Glu, or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)
<223> Cys, Leu, Met, Pro, Gln, or Val

<220>
<221> MOD_RES

Sequence Listing (from parent case - prepared by Harbor Consulting).txt

<222> (5)
<223> Phe, Lys, Leu, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)
<223> Cys, Phe, Ile, Leu, Met, Arg, Ser, Val, or Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> Variable amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Gln, Arg, Ser, Thr,
Val, or Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(2-naphthyl)alanine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> 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

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(2-naphthyl)alanine

<400> 3
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg Ala
1 5 10

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(2-naphthyl)alanine

Sequence Listing (from parent case - prepared by Harbor Consulting).txt

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)
<223> sarcosine or beta-alanine

<400> 4
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg Ala Xaa
1 5 10 15

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(2-naphthyl)alanine

<400> 5
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(1-naphthyl)alanine

<400> 6
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Xaa Leu Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)
<223> b-(2-naphthyl)alanine

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)
<223> sarcosine or beta-alanine

Sequence Listing (from parent case - prepared by Harbor Consulting).txt

<400> 7

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

FIG. 1

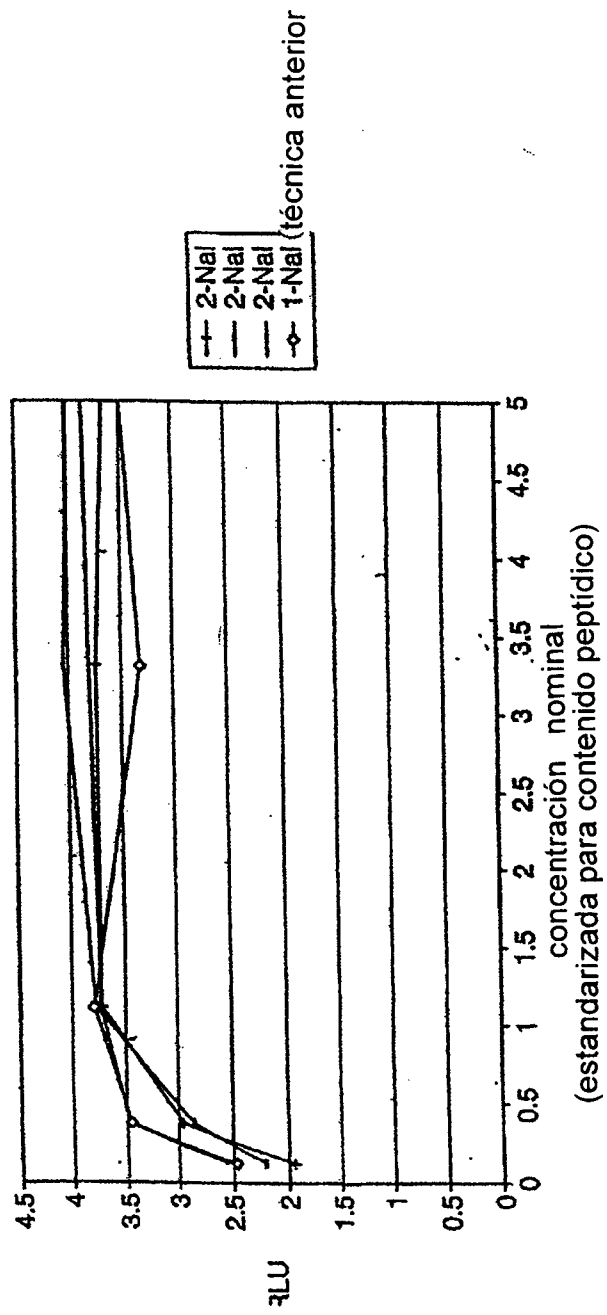
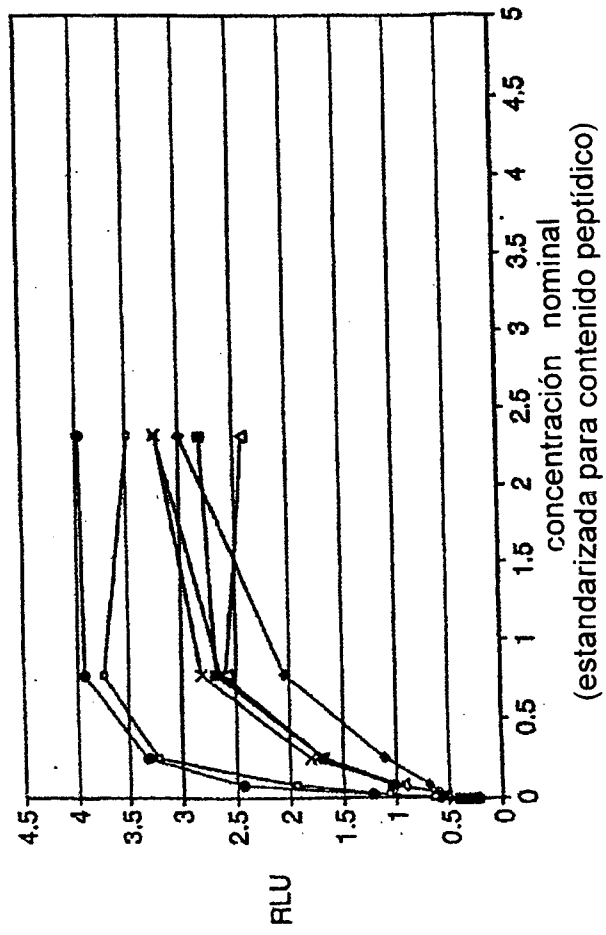


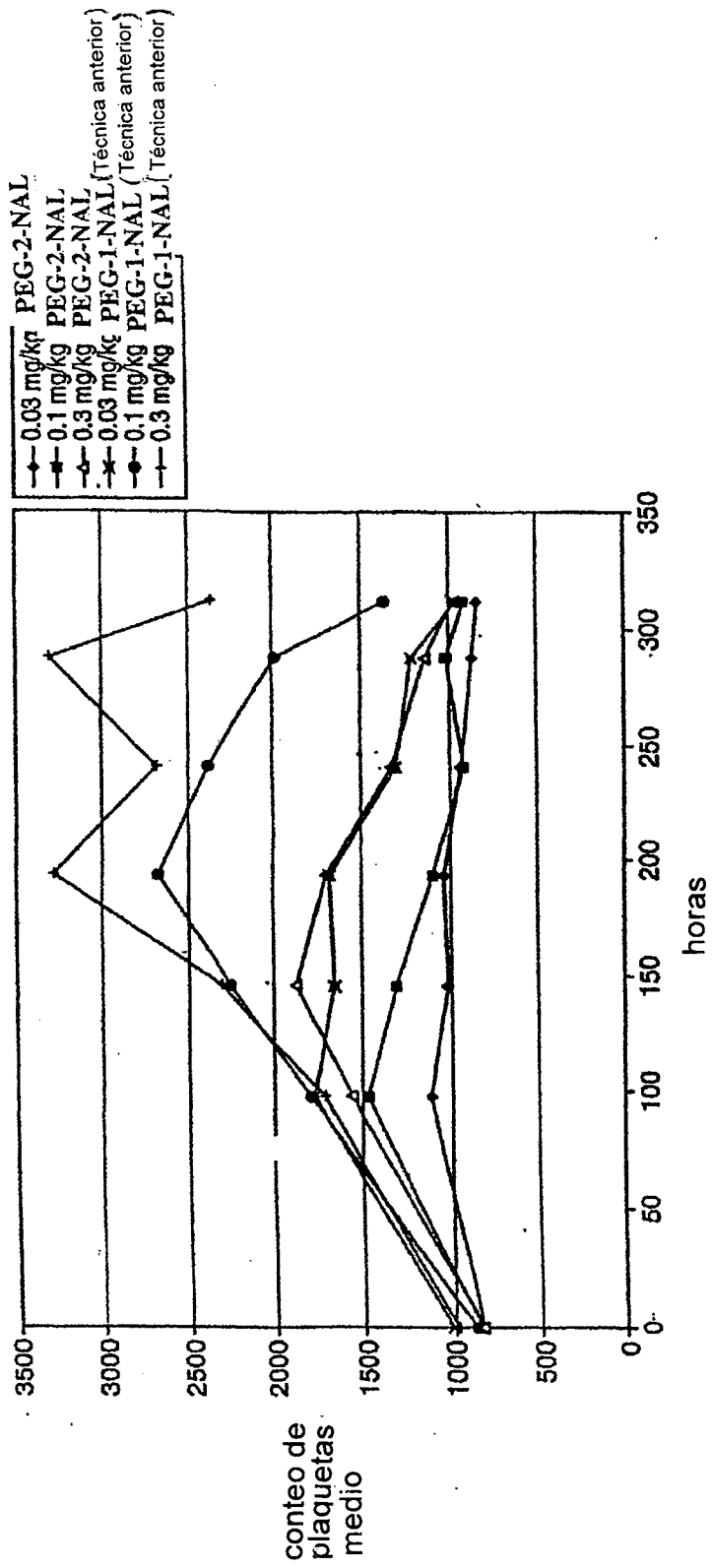
FIG. 2



76

FIG. 3

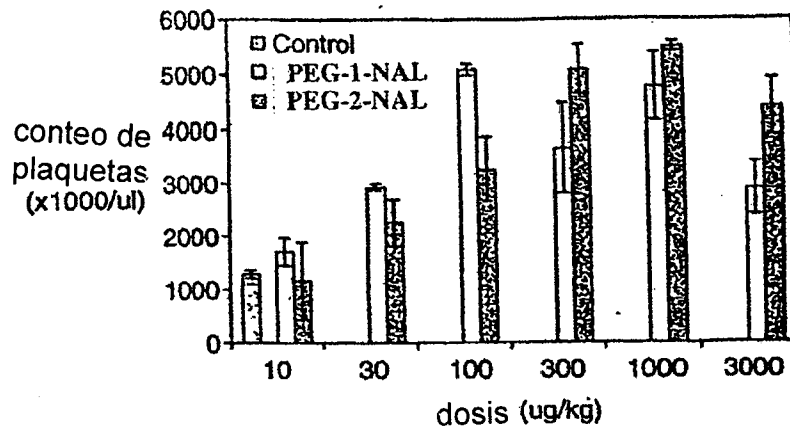
resumen de plaquetas



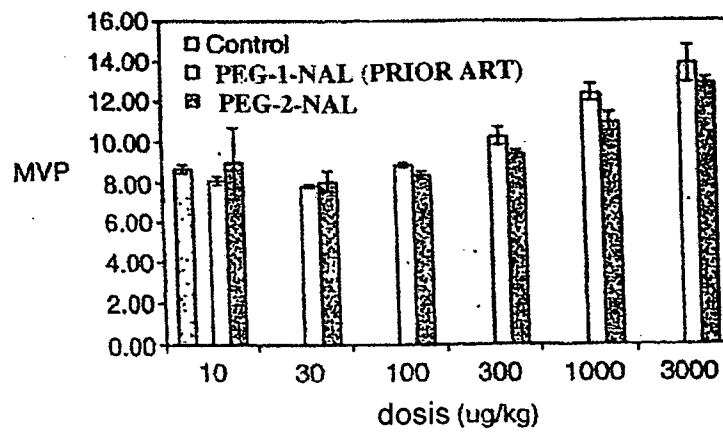
75

FIG. 4

efecto del tratamiento en el conteo de plaquetas

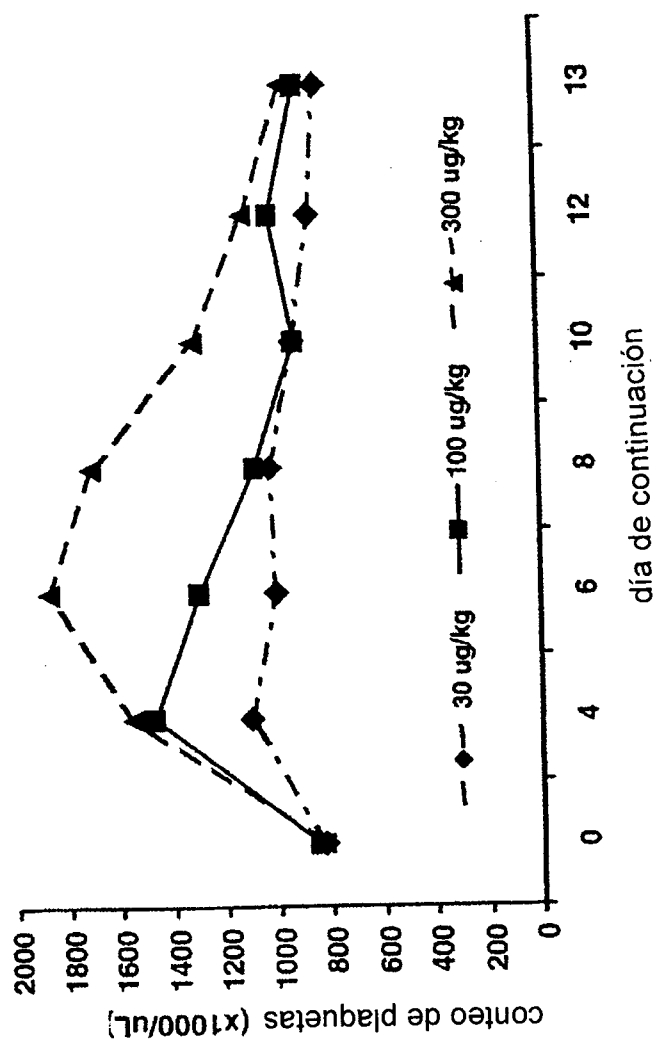
**FIG. 5**

efecto del tratamiento en el volumen de plaquetas medio



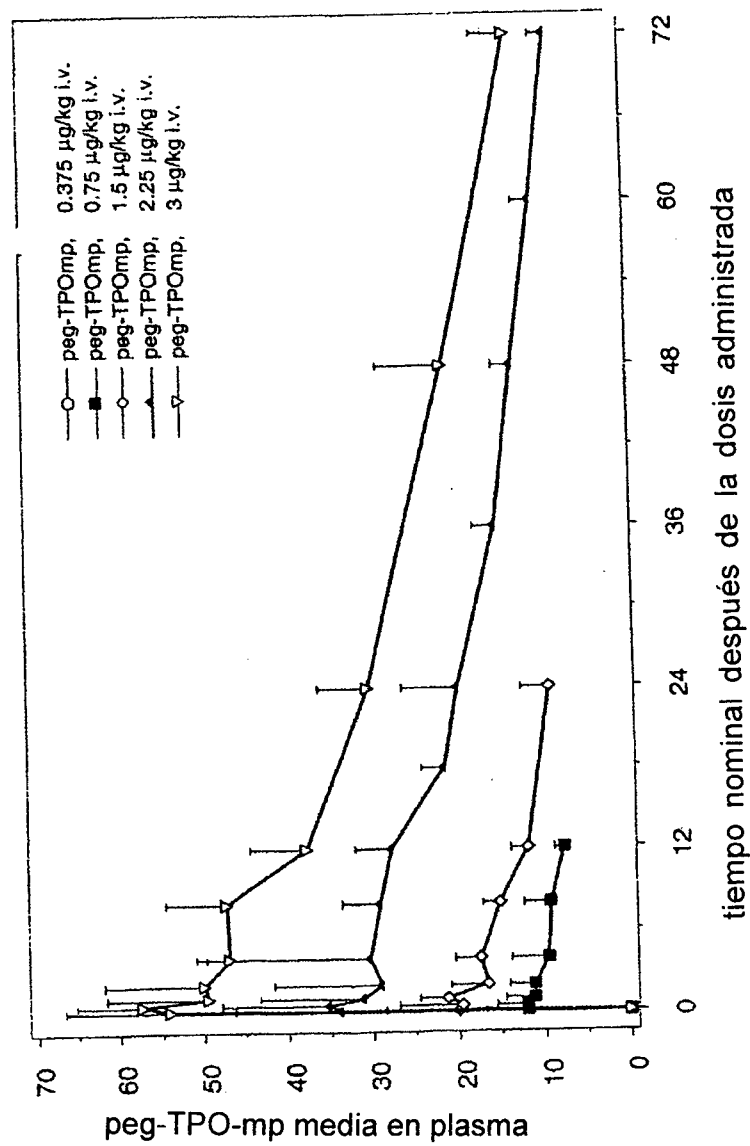
76

FIG. 6



77

FIG. 7



78

FIG. 8

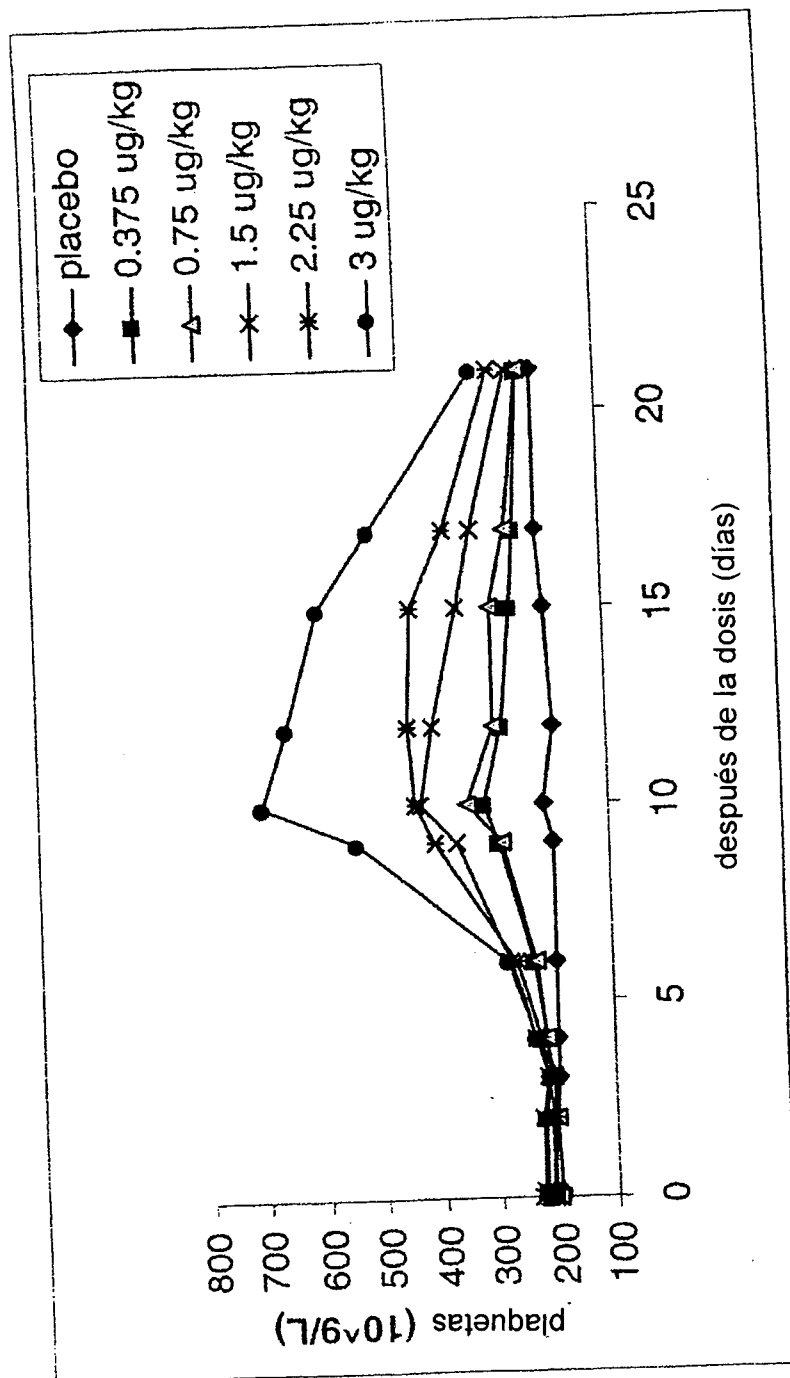
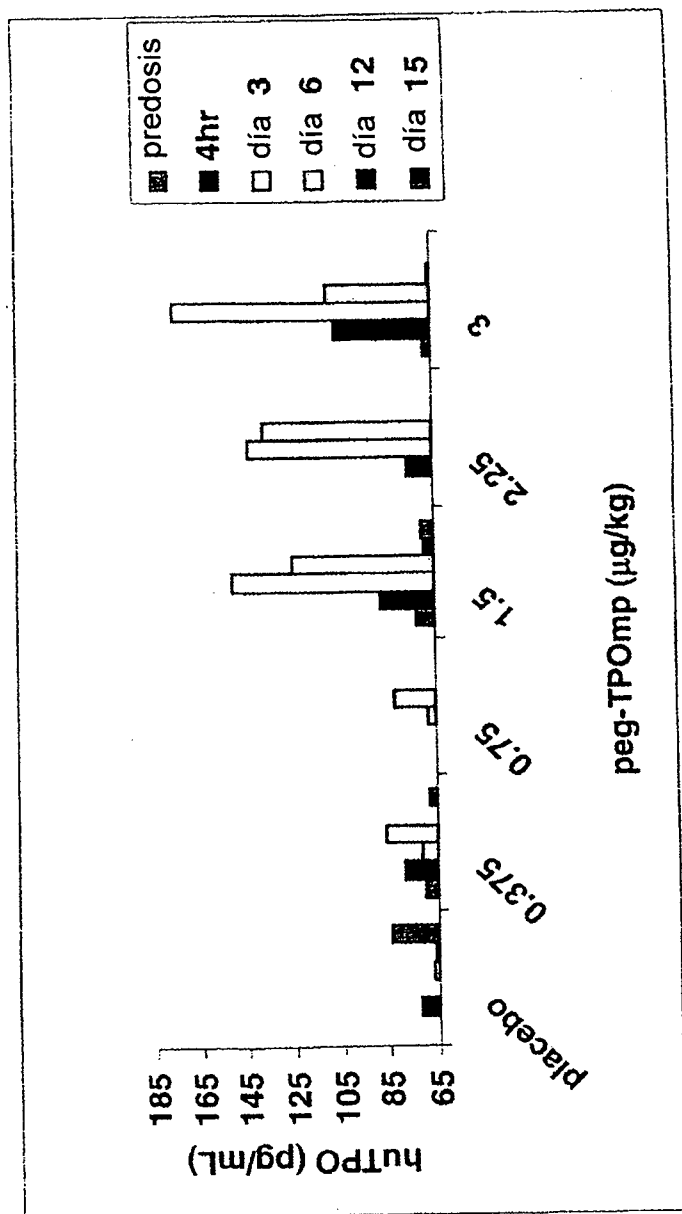


FIG. 9



PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY model] Version 3.51.005.180 MT/FOP 20060401/0.20.4rc.2.7
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	TDP-5001-PC1
I	Title of Invention	PEPTIDES AND COMPOUNDS THAT BIND TO A RECEPTOR
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.
II-5	Address	Turnhoutseweg 30 B-2340 Beerse Belgium
II-6	State of nationality	BE
II-7	State of residence	BE
II-8	Telephone No.	732-524-1729
II-9	Facsimile No.	732-524-2808
II-10	e-mail	ldonnel2@corus.jnj.com
II-11	Applicant's registration No. with the Office	38,435

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	MACDONALD, Brian R.
III-1-5	Address	19 Paper Mill Road Newtown Square, Pennsylvania 19073 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-1-11	Applicant's registration No. with the Office	38,435
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	WEIS, Jeffery Kenneth
III-2-5	Address	106 South Honeyman Road Whitehouse Station, New Jersey 08889 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-2-11	Applicant's registration No. with the Office	38,435
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	YURKOW, Edward John
III-3-5	Address	123 Woods Road Hillsborough, New Jersey 08844 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-3-11	Applicant's registration No. with the Office	38,435

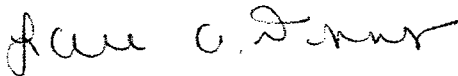
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	JOHNSON, Philip S.
IV-1-2	Address	Johnson & Johnson One Johnson & Johnson Plaza New Brunswick, New Jersey 08933 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	732-524-1729
IV-1-4	Facsimile No.	732-524-2808
IV-1-5	e-mail	ldonnel2@corus.jnj.com
IV-1-6	Agent's registration No.	27,200
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	DONNELLY, Laura A. (38,435)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, or the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	09 August 2005 (09.08.2005)
VI-1-2	Number	11/200,416
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	38	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	8	-
IX-7	TOTAL	56	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	DONNELLY, Laura A.	
X-1-2	Name of signatory	Agent	
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

85

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only		
0-1	International Application No.		
0-2	Date stamp of the receiving Office		
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet		
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.005.180 MT/FOP 20060401/0.20.4rc.2.7	
0-9	Applicant's or agent's file reference		TDP-5001-PC1
2	Applicant		JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (USD)
12-1	Transmittal fee T	↔	300
12-2-1	Search fee S	↔	1925
12-2-2	International search to be carried out by	EP	
12-3	International filing fee (first 30 sheets) i1	1086	
12-4	Remaining sheets	26	
12-5	Additional amount (X) i2	12	
12-6	Total additional amount	312	
12-7	i1 + i2 = i	1398	
12-12	EASY Filing reduction R	-78	
12-13	Total International filing fee (i-R) I	↔	1320
12-14	Fee for priority document Number of priority documents requested	1	
12-15	Fee per document (X) 20		
12-16	Total priority document fee: P	↔	20
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P)	↔	3565
12-19	Mode of payment authorization to charge deposit account		
12-20	Deposit account instructions		
	The receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)	
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above	✓	
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above	✓	
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document	✓	
12-21	Deposit account No.	10-0750/TDP-5001-WOPCT1/LAD	
12-22	Date	03 August 2006 (03.08.2006)	
12-23	Name and signature	Laura A. Donnelly <i>Laura A. Donnelly</i>	

Peptide compounds that bind to and activate the thrombopoietin receptor (c-mpl or TPO-R) or otherwise act as a TPO agonist are disclosed.

Johnson & Johnson

ONE JOHNSON & JOHNSON PLAZA • NEW BRUNSWICK, NEW JERSEY 08933

PCT SAFE

Applicant Name:

Tanison Pharmaceuticals NV

Reference No. TDP-501-WOPCT 1

EASY Version: 3.51.005.180 MT/PCP

For Official Use Only:

Date of Receipt: _____

Application No.: _____

FORM 1118-2

88

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 February 2007 (22.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/021572 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2006/030359

(22) International Filing Date: 3 August 2006 (03.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/200,416 9 August 2005 (09.08.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. [BE/BE]; Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MACDONALD, Brian, R.** [US/US]; 19 Paper Mill Road, Newtown Square, Pennsylvania 19073 (US). **WEIS, Jeffery, Kenneth** [US/US]; 106 South Honeyman Road, Whitehouse Station, New Jersey 08889 (US). **YURKOW, Edward, John** [US/US]; 123 Woods Road, Hillsborough, New Jersey 08844 (US).

(74) Agents: **JOHNSON, Philip, S.** et al.; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, New Jersey 08933 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

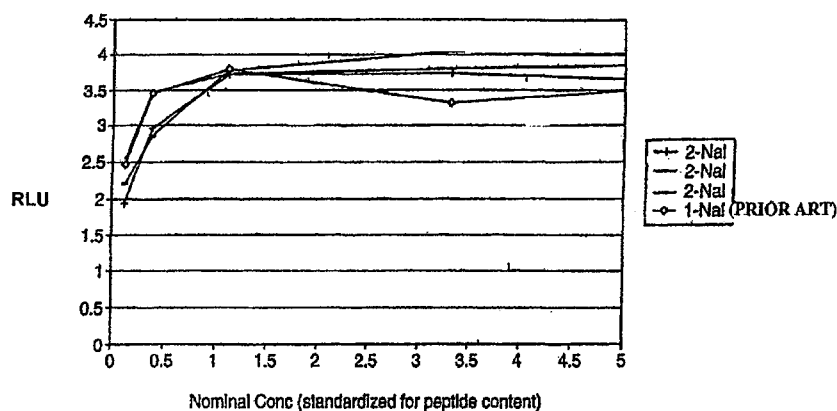
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PEPTIDES AND COMPOUNDS THAT BIND TO A RECEPTOR



(57) Abstract: Peptide compounds that bind to and activate the thrombopoietin receptor (c-mpl or TPO-R) or otherwise act as a TPO agonist are disclosed.

WO 2007/021572 A2

89

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 February 2007 (22.02.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/021572 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/030359

(22) International Filing Date: 3 August 2006 (03.08.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/200,416 9 August 2005 (09.08.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V. [BE/BE]; Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MACDONALD, Brian, R. [US/US]; 19 Paper Mill Road, Newtown Square, Pennsylvania 19073 (US). WEIS, Jeffery, Kenneth [US/US]; 106 South Honeyman Road, Whitehouse Station, New Jersey 08889 (US). YURKOW, Edward, John [US/US]; 123 Woods Road, Hillsborough, New Jersey 08844 (US).

(74) Agents: JOHNSON, Philip, S. et al.; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, New Jersey 08933 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

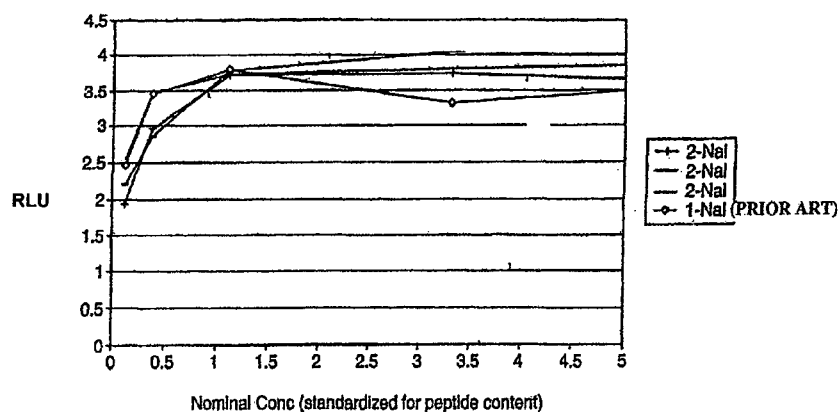
Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
7 June 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: USE OF PEPTIDES THAT BIND TO TPO RECEPTOR



(57) Abstract: Peptide compounds that bind to and activate the thrombopoietin receptor (c-mpl or TPO-R) or otherwise act as a TPO agonist are disclosed.

WO 2007/021572 A3

90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/030359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K7/08 A61K38/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/023834 A2 (DIMENSIONAL PHARM INC [US]; MACDONALD BRIAN R [US]; WEIS JEFFERY KENNE) 17 March 2005 (2005-03-17) claims 1-49 page 6, paragraphs 3,4	1-30
X	CASE B C ET AL: "The pharmacokinetics and pharmacodynamics of GW395058, a peptide agonist of the thrombopoietin receptor, in the dog, a large-animal model of chemotherapy-induced thrombocytopenia." STEM CELLS (DAYTON, OHIO) 2000, vol. 18, no. 5, 2000, pages 360-365, XP002421199 ISSN: 1066-5099 abstract the whole document	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2007

Date of mailing of the international search report

15/03/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fayos, Cécile

91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/030359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE SERRES M ET AL: "Pharmacokinetics and hematological effects of the PEGylated thrombopoietin peptide mimetic GW395058 in rats and monkeys after intravenous or subcutaneous administration." STEM CELLS (DAYTON, OHIO) 1999, vol. 17, no. 6, 1999, pages 316-326, XP002421200 ISSN: 1066-5099 abstract the whole document	1-30
X	SERRES DE M ET AL: "Immunogenicity of thrombopoietin mimetic peptide GW395058 in BALB7c mice and New Zealand white rabbits: evaluation of the potential for thrombopoietin neutralizing antibody production in man" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 17, 1999, pages 203-209, XP002230261 ISSN: 1066-5099 abstract the whole document	1-30
X	KAUSHANSKY K: "Hematopoietic growth factor mimetics." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES JUN 2001, vol. 938, June 2001 (2001-06), pages 131-138, XP002421201 ISSN: 0077-8923 page 135	1-30
X	WO 2004/026332 A (DIMENSIONAL PHARM INC [US]) 1 April 2004 (2004-04-01) claims 1-12 page 7, paragraph 3 page 11, line 13 - line 19	1-30
X	SINGER S C ET AL: "Pegylated thrombopoietin (TPO)-mimetic peptides bind human to TPO receptor causing proliferation and maturation of megakaryocytes in vitro" BLOOD, vol. 92, no. 10 SUPPL. 1 PART 1-2, 15 November 1998 (1998-11-15), page 568A, XP009079489 & 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; MIAMI BEACH, FLORIDA, USA; DECEMBER 4-8, 1998 ISSN: 0006-4971 abstract	1-30

-/--

92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/030359

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 869 451 A (DOWER WILLIAM J [US] ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09) cited in the application sequence 19 claims 1-20	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/030359

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/030359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005023834 A2	17-03-2005	AU 2004270656 A1 BR PI0414008 A CA 2537421 A1 CN 1871022 A EP 1675606 A2 MX PA06002292 A	17-03-2005 24-10-2006 17-03-2005 29-11-2006 05-07-2006 04-09-2006
WO 2004026332 A	01-04-2004	AU 2003275077 A1 BR 0314591 A CA 2499625 A1 EP 1542714 A1 HR 20050265 A2 IS 7756 A JP 2005539082 T KR 20050093759 A MX PA05003057 A US 2005282277 A1	08-04-2004 09-08-2005 01-04-2004 22-06-2005 30-06-2006 17-03-2005 22-12-2005 23-09-2005 18-04-2006 22-12-2005
US 5869451 A	09-02-1999	US 6251864 B1	26-06-2001

95

IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE

Applicant: JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.
International Publication No.:
International Publication Date:
International Application No.: PCT/US2006/030359
International Filing Date: 03.08.2006
For: PEPTIDES AND COMPOUNDS THAT BIND
TO A RECEPTOR

European Patent Office
Strand Program
Directorate Documentation
Room S00 E45
Patentlaan 2
NL 2288 EE Rijswijk, The Netherlands
Attention: Ms. N. Vercio

SUBMISSION OF NUCLEOTIDE AND/OR AMINO ACID SEQUENCE LISTING

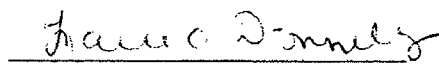
Dear Sir:

Applicant herewith submits a paper copy and computer-readable form of the sequence listing in connection with the above-identified patent application.

Please charge any fees which may be required for this submission to Johnson & Johnson Deposit Account No. 28300161. Three copies of this sheet are enclosed.

Should you require anything further, please contact Applicant's representative at the telephone number listed below.

Respectfully submitted,


Laura A. Donnelly
Attorney for Applicant
Registration No. 38,435

Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, NJ 08933
(732) 524-1729
(732) 524-2808 (facsimile)
Dated: February 5, 2007



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
 United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPL NO.	FILING OR 371 (c) DATE	ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLMS	IND CLMS
11/200,416	08/09/2005	1654	3380	TDP-5001-USCIP1	8	49	7

000027777
 PHILIP S. JOHNSON
 JOHNSON & JOHNSON
 ONE JOHNSON & JOHNSON PLAZA
 NEW BRUNSWICK, NJ 08933-7003

RECEIVED

NOV 28 2005

CONFIRMATION NO. 3098

UPDATED FILING RECEIPT



OC000000017502926

J&J PAT. DKT. SECTION

Date Mailed: 11/22/2005

Receipt is acknowledged of this regular Patent Application. It will be considered in its order and you will be notified as to the results of the examination. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please mail to the Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria Va 22313-1450. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).**

Applicant(s)

Brian R. MacDonald, Newtown Square, PA;
 Jeffery Kenneth Weis, Whitehouse Station, NJ;
 Edward John Yurkow, Hillsborough, NJ;

Power of Attorney: The patent practitioners associated with Customer Number 000027777.

Domestic Priority data as claimed by applicant

This application is a CIP of 10/918,561 08/13/2004
 which claims benefit of 60/498,740 08/28/2003

Foreign Applications

If Required, Foreign Filing License Granted: 09/19/2005

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US11/200,416**

Projected Publication Date: 03/02/2006

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

97

Title

Peptides and compounds that bind to a receptor

Preliminary Class

514

PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process **simplifies** the filing of patent applications on the same invention in member countries, but **does not result** in a grant of "an international patent" and does not eliminate the need of applicants to file additional documents and fees in countries where patent protection is desired.

Almost every country has its own patent law, and a person desiring a patent in a particular country must make an application for patent in that country in accordance with its particular laws. Since the laws of many countries differ in various respects from the patent law of the United States, applicants are advised to seek guidance from specific foreign countries to ensure that patent rights are not lost prematurely.

Applicants also are advised that in the case of inventions made in the United States, the Director of the USPTO must issue a license before applicants can apply for a patent in a foreign country. The filing of a U.S. patent application serves as a request for a foreign filing license. The application's filing receipt contains further information and guidance as to the status of applicant's license for foreign filing.

Applicants may wish to consult the USPTO booklet, "General Information Concerning Patents" (specifically, the section entitled "Treaties and Foreign Patents") for more information on timeframes and deadlines for filing foreign patent applications. The guide is available either by contacting the USPTO Contact Center at 800-786-9199, or it can be viewed on the USPTO website at <http://www.uspto.gov/web/offices/pac/doc/general/index.html>.

For information on preventing theft of your intellectual property (patents, trademarks and copyrights), you may wish to consult the U.S. Government website, <http://www.stopfakes.gov>. Part of a Department of Commerce initiative, this website includes self-help "toolkits" giving innovators guidance on how to protect intellectual property in specific countries such as China, Korea and Mexico. For questions regarding patent enforcement issues, applicants may call the U.S. Government hotline at 1-866-999-HALT (1-866-999-4158).

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

GRANTED

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

98

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Bureau of Industry and Security, Department of Commerce (15 CFR parts 730-774); the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

Johnson & Johnson

ONE JOHNSON & JOHNSON PLAZA • NEW BRUNSWICK, NEW JERSEY 08933

Applicant: Janssen Pharmaceutica N.V.

Docket No.: TDP-5001-WOPCT I

Filed: 03.08.2006

Title: PEPTIDES AND COMPOUNDS THAT
BIND TO A RECEPTOR

IBM PC-OS: Windows 2000-Text

Format Data

Date Recorded: 05.02.2007

FORM 11

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 08-13270

Fecha: 11 de Febrero de 2.008

Se certifica que:

Desde fecha 10 de Febrero de 1.997
del folio 88986 al folio 88991 del
libro de Protocolo No. 306, obra el poder No.
17154 conferido por JANSSEN PHARMACEUTICA
N.V. domiciliado(a) en BEERSE, BÉLGICA
a el (la) dr(a) JIMENA ESCOBAR URIBE Y/O
IGNACIO ESCOBAR URIBE.

Representante legal: los mismos

Facultad para desistir SI

Facultad para desistir: SI

Revisado: 202030

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-013270-00000-0000

Fecha: 2008-02-11 15:27:51 Dep. 2020 NUECREACIO-
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Carida M. Novoa Ortiz
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia