

C07K 7/02 (2007.10) **C07K 7/06** (2007.10)
C07K 7/08 (2007.10) **C07K 7/50** (2007.10)
C07K 7/54 (2007.10) **C07K 14/52** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.06.07**

(30) Prioridade(s): **1995.06.07 US 478128**
1995.06.07 US 485301

(43) Data de publicação do pedido: **1998.12.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.03.31**
118/2008

(73) Titular(es):

GLAXO GROUP LIMITED
GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY
AVENUE GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN
GB

(72) Inventor(es):

RONALD W. BARRETT **US**
WILLIAM J. DOWER **US**
STEVEN E. CWIRLA **US**
DAVID J. DUFFIN **US**
CHRISTIAN M. GATES **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS E COMPOSTOS QUE SE LIGAM A UM RECEPTOR DE TROMBOPOIETINA**

(57) Resumo:

RESUMO**"PÉPTIDOS E COMPOSTOS QUE SE LIGAM A UM RECEPTOR DE
TROMBOPOIETINA"**

O receptor são péptidos e miméticos de péptidos que se ligam a, e activam o receptor da trombopoietina. Esses péptidos e miméticos de péptidos são úteis nos métodos para tratar distúrbios hematológicos e, particularmente, trombocitopenia, resultando de quimioterapia, terapia de radiação, ou transfusões de medula óssea, bem como em métodos de diagnóstico empregando péptidos e miméticos de péptidos marcados.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS E COMPOSTOS QUE SE LIGAM A UM RECEPTOR DE TROMBOPOIETINA"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona péptidos e compostos que se ligam e activam o receptor de trombopoietina (c-mpl ou TPO-R) ou de outro modo actuam como um agonista de TPO. A invenção tem aplicação no campo da bioquímica e química medicinal e particularmente proporciona agonistas de TPO para utilização no tratamento de doença humana.

Os megacariócitos são células derivadas da medula óssea, que são responsáveis por produzir plaquetas sanguíneas em circulação. Embora compreendendo <0,25% das células da medula óssea na maior parte das espécies, estas possuem >10 vezes o volume das células típicas da medula. Ver Kuter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11104-11108 (1994). Os megacariócitos sofrem um processo conhecido como endomitose em que replicam os seus núcleos mas não conseguem sofrer divisão celular e conseqüentemente dão origem a células poliplóides. Em resposta a uma contagem diminuída de contagem de plaquetas, a taxa endomitótica aumenta, são formados megacariócitos com maior ploidia, e o número de megacariócitos pode aumentar até 3 vezes. Ver

Marker *J. Clin. Invest.* 47:458-465 (1968). Pelo contrário, em resposta a uma contagem de plaquetas elevada, a taxa endomitótica diminui, são formados megacariócitos com menor ploidia, e o número de megacariócitos pode diminuir em 50%. O mecanismo fisiológico exacto de retroacção através do qual a massa de plaquetas circulantes regula a taxa endomitótica e o número de megacariócitos da medula óssea não é conhecido. Pensa-se actualmente que o factor trombopoiético circulante envolvido na mediação desta retroacção é a trombopoietina (TPO). Mais especificamente, a TPO demonstrou ser o principal regulador humoral em situações que envolvem trombocitopenia. Ver, *e.g.*, *Metcalf Nature* 369:519-520 (1994). Foi demonstrado em vários estudos que a TPO aumentava a contagem de plaquetas, aumenta o tamanho das plaquetas, e aumenta a incorporação de isótopos em plaquetas dos animais que a recebiam. Especificamente, pensa-se que a TPO afecta a megacariocitopoiese de várias formas: (1) produz aumento no tamanho e número de megacariócitos; (2) produz um aumento no conteúdo do DNA, na forma da poliploidia, em megacariócitos; (3) aumenta endomitose de megacariócitos; (4) produz maturação aumentada de megacariócitos; e (5) produz um aumento na percentagem de células precursoras, na forma de pequenas células positivas para a acetilcolinesterase, na medula óssea.

Porque como plaquetas (trombócitos) são necessárias para coagulação do sangue e quando os seus números são muito baixos num doente este corre um sério risco de morte

por hemorragia catastrófica, a TPO possui uma aplicação potencial útil no diagnóstico e no tratamento de vários distúrbios hematológicos, por exemplo, doenças devidas essencialmente a defeito das plaquetas. Os ensaios clínicos em curso com TPO indicaram que a TPO pode ser administrada de forma segura a doentes. Adicionalmente, estudos recentes proporcionaram uma base para a projecção da eficácia da terapia com TPO no tratamento de trombocitopenia, e particularmente, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia por radiação, ou transplante de medula óssea como tratamento para cancro ou linfoma. Ver, e.g., McDonald (1992) *Am. J. Ped. Hematology/Oncology* 14:8-21 (1992).

O gene que codifica a TPO foi clonado e caracterizado. Ver 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); e Sauvage *et al. Nature* 369:533-538 (1994). A trombopoietina é uma glicoproteína com, pelo menos, duas formas, com massas moleculares aparentes de 25 kDa e 31 kDa, com uma sequência de aminoácidos N-terminal. Ver, Bartley *et al. Cell* 77:1117-1124 (1994). A trombopoietina parece apresentar duas regiões distintas separadas através de um sítio potencial de clivagem Arg-Arg. A região amino-terminal é altamente conservada no homem e no rato, e possui alguma homologia com eritropoietina e interferão- α e interferão- β . A região carboxi-terminal apresenta uma vasta divergência entre como espécies.

Foram descrita como sequências de DNA e sequências de péptidos codificadas para a TPO-R humana (também conhecida como *c-mpl*). Ver Vigon *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5640-5644 (1992). A TPO-R é um membro da família do receptor do factor de crescimento de hematopoietina, uma família caracterizada por uma concepção estrutural comum do domínio extracelular, incluindo quatro resíduos de C conservados na porção N-terminal e um motivo WSXWS próximo da região transmembranar. Ver Bazan *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6934-6938 (1990). A evidência de que este receptor desempenha um papel funcional na hematopoiese inclui observações de que a sua expressão está restrita ao baço, medula óssea, ou fígado fetal em ratinhos (ver Souyri *et al. Cell* 63:1137-1147 (1990)) e a megacariócitos, plaquetas, e células CD34⁺ em humanos (ver Methia *et al. Blood* 82: 1395-1401 (1993)). Além disso, a exposição de células CD34⁺ a oligonucleótidos sintéticos anti-sentido contra o ARN de *mpl* inibe significativamente o aparecimento de colónias de megacariócitos sem afectar a formação eritróide ou mielóide. Alguns postularam que o receptor funciona como um homodímero, semelhante à situação com os receptores para G-CSF e eritropoietina.

A disponibilidade dos genes clonados para TPO-R facilita a pesquisa de agonistas deste receptor importante. A disponibilidade da proteína recombinante do receptor permite o estudo da interacção receptor-ligando numa variedade de sistemas aleatórios e semi-aleatórios de diversidade de péptidos. Estes sistemas incluem o sistema

de "péptidos em plasmídeos" descritos nas Patentes U.S. N° 5 270 170 e 5 338 665; o sistema de "péptidos no fago" descritos na Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/718 577, de 20 de Junho de 1991, Série de Pedidos de Patente U.S. N° 07/541 108, de 20 de Junho de 1990, e em Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1990); o sistema "polissoma" descrito na Série de Pedidos de Patente U.S. N° 08/300,262, de 2 de Setembro de 1994, que é um pedido de continuação em parte com base na Série de Pedidos de Patente U.S. N° 08/144 775, de 29 de Outubro de 1993 e PCT WO 95/11992; o sistema "biblioteca sintética codificada" descrito na Série de Pedido de Patente U.S. N° 08/146 886, de 12 de Novembro de 1993, 07/946 239, de 16 de Setembro de 1992, e 07/762 522, de 18 de Setembro de 1991; e o sistema "síntese de polímero imobilizado em muito larga escala" descrito na Patente U.S. N° 5 143 854; Publicação de Patente PCT N° 90/15070, publicado em 13 de Dezembro de 1990; Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/624,120, de 6 de Dezembro de 1990; Fodor *et al. Science* 251:767-773 (2/1991); Dower e Fodor *Ann. Rep. Med. Chem.* 26:271-280 (1991); e Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/805,727, de 6 de Dezembro de 1991.

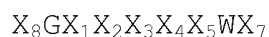
A recuperação dos níveis de plaquetas em doentes que sofrem de trombocitopenia é um problema sério, e tem existe alguma urgência na pesquisa de um agonista do factor de crescimento do sangue capaz de acelerar a regeneração de plaquetas. A presente invenção proporciona um destes agonistas.

LUBB573A (Genentech) revela certos péptidos de trombopoietina que são ligandos para o receptor da citocina mpl e reivindicou ser útil para o tratamento de trombocitopenia e estados relacionados.

SUMMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um composto que se liga ao receptor de trombopoietina, possuindo o referido composto

(1) um peso molecular inferior a cerca de 8000 daltons, e (2) uma afinidade de ligação ao receptor de trombopoietina como expresso por um IC₅₀ não superior a cerca de 100 nm, em que o referido composto compreende uma sequência de aminoácidos:



em que X₈ é qualquer dos 20 L-aminoácidos geneticamente codificados; X₁ é P; X₂ é T; X₃ é L; X₄ é R; X₅ é E ou Q; X₇ é I ou L.

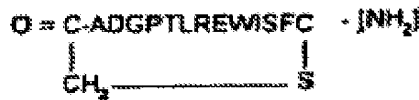
Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um composto que se liga ao receptor de trombopoietina, possuindo o referido composto:

(1) um peso molecular inferior a cerca de 8000 daltons,
e

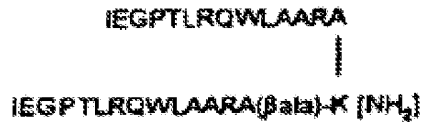
(2) uma afinidade de ligação ao receptor de trombopoietina como expresso por um IC₅₀ não superior a cerca de 100 nm, em que o referido composto compreende uma sequência de aminoácidos:

GGCTLREWLHGGFCOG.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um composto que se liga ao receptor de trombopoietina, em que o referido composto é seleccionado a partir do grupo consistindo em



e



Esta invenção é dirigida, em parte, à nova e inesperada observação de que péptidos definidos de baixo peso molecular e miméticos de péptidos possuem fortes propriedades de ligação ao TPO-R e podem activar o TPO-R. De acordo com o exposto, estes péptidos e miméticos de péptidos são úteis para propósitos terapêuticos no trata-

mento de estados mediados por TPO (e.g., trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia por radiação, ou transfusões de medula óssea) assim como para propósitos de diagnóstico no estudo do mecanismo de hematopoiese e para a expansão *in vitro* de megacariócitos e células progenitoras comprometidas.

Os péptidos e miméticos de péptidos adequados para propósitos terapêuticos e/ou de diagnóstico possuem um IC_{50} de cerca de 2 mM ou menos, como determinado pelo ensaio de afinidade de ligação apresentado no Exemplo 3 a seguir em que um IC_{50} baixo correlaciona com uma afinidade de ligação mais forte ao TPO-R. Para propósitos farmacêuticos, os péptidos e miméticos de péptidos possuem preferencialmente um IC_{50} não superior a cerca de 100 mM, mais preferencialmente, não superior a 500 nM. Numa forma de realização preferida, o peso molecular do péptido ou mimético do péptido é de cerca de 250 a cerca de 8000 daltons.

Quando utilizado para propósitos de diagnóstico, os péptidos e miméticos de péptidos são preferencialmente marcados com uma marca detectável e, de acordo com o exposto, os péptidos e miméticos de péptidos sem esta marcação servem como intermediários na preparação de péptidos e miméticos de péptidos marcados.

Os péptidos que preenchem os critérios definidos para o peso molecular e afinidade de ligação para o TPO-R compreendem 9 ou mais aminoácidos em que os aminoácidos são

aminoácidos que ocorrem naturalmente ou sintéticos (que não ocorrem naturalmente). Os miméticos de péptidos incluem péptidos possuindo uma ou mais das seguintes modificações:

péptidos em que uma ou mais das ligações peptídico [-C(O)NR-] (ligações) foram substituídos por uma ligação não peptídico tal como uma ligação -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-]; uma ligação fosfonato; uma ligação -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-]; uma ligação ureia [-NHC(O)NH-]; uma ligação amina secundária -CH₂-; ou uma ligação peptídico alquilada [-C(O)NR⁶- em que R⁶ é alquilo inferior];

péptidos em que o terminal N é derivado num grupo -NRR¹; num grupo -NRC(O)R; num grupo -NRC(O)OR; num grupo -NRS(O)₂R; num grupo -NHC(O)NHR em que R e R¹ são hidrogénio ou alquilo inferior com a condição de que R e R¹ não são ambos hidrogénio; num grupo succinimida; num grupo benziloxicarbonil-NFi- (CH₃₂-NH-); ou num grupo benziloxicarbonil-NH- possuindo de 1 a 3 substituintes no anel fenilo seleccionado a partir do grupo consistindo em alquilo inferior, alcoxilo inferior, cloro, e bromo;

ou péptidos em que o terminal C é derivado num -C(O)R³ em que R³ é seleccionado a partir do grupo consistindo em alcoxilo inferior, e -NR³R⁴ em que R³ e R⁴ são independentemente seleccionados a partir do grupo consistindo em hidrogénio e alquilo inferior.

De acordo com o exposto, os péptidos e miméticos de péptidos preferidos compreendem um composto possuindo:

- (1) um peso molecular inferior a cerca de 5000 daltons,
e
- (2) uma afinidade de ligação ao TPO-R como expresso por um IC_{50} não superior a cerca de 100 nm,

em que desde zero a todas as ligações $-C(O)NH-$ do péptido foram substituídas uma ligação seleccionada a partir do grupo consistindo em numa ligação $-CH_2OC(O)NR-$; uma ligação fosfonato; uma ligação $-CH_2S(O)_2NR-$; uma ligação $-CH_2NR-$; e uma ligação $-C(O)NR^6-$; e uma ligação $-NHC(O)NH-$ em que R é hidrogénio ou alquilo inferior e R^5 é alquilo inferior, além de que o terminal N do referido péptido ou mimético do péptido é seleccionado a partir do grupo consistindo num grupo $-NRR^1$; num grupo $-NRC(O)R$; num grupo $-NRC(O)OR$; num grupo $-NRS(O)_2R$; num grupo $-NHC(O)NHR$; num grupo succinimida; num grupo benziloxicarbonil-NH-; e num grupo benziloxicarbonil-NH- possuindo de 1 a 3 substituintes no anel fenilo seleccionado a partir do grupo consistindo em alquilo inferior, alcoxilo inferior, cloro, e bromo, em que R e R^1 são independentemente seleccionados a partir do grupo consistindo em hidrogénio e alquilo inferior, e ainda em que o terminal C do referido péptido ou mimético do péptido possui a fórmula $-C(O)R^2$ em que R^2 é seleccionado a partir do grupo consistindo em hidroxilo, alcoxilo inferior, e $-NR^3R^4$ em que R^3 e R^4 são independentemente seleccionados a partir do grupo consistindo em hidrogénio e

alquilo inferior e em que o átomo de azoto do grupo $-NR^3R^4$ pode opcionalmente ser o grupo amina do terminal N do péptido de modo a formar um péptido cíclico, e seus sais fisiologicamente aceitáveis.

Numa forma de realização relacionada, a invenção é dirigida para um péptido ou mimético do péptido marcados compreendendo um péptido ou mimético do péptido descritos como acima possuindo covalentemente ligada a estes uma marcação capaz de detecção.

Os péptidos particularmente preferidos incluem: GGCADGPTLREWISFCGG; GNADGPTLRQWLEGRRPKN; GGCADGPTLREWISFCGGK; TIKGPTLRQWLKSREHTS; SIEGPTLREWLTSTRTPHS; LAIEGPTLRQWLHGNGRDT; CADGPTLREWISFC; e IEGPTLRQWLAARA.

Os compostos aqui descritos são úteis para a prevenção e tratamento de doenças mediadas por TPO, e particularmente para tratar distúrbios hematológicos, incluindo, mas não se limitando a, trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia por radiação, ou transfusões de medula óssea. Deste modo, a presente invenção é útil para tratamento quando um doente possuindo um distúrbio que é susceptível de tratamento com um agonista de TPO recebe, ou lhe é administrada, uma dose terapeuticamente eficaz ou quantidade de um composto da presente invenção.

A invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo um ou mais dos compostos aqui

descritos e um veículo fisiologicamente aceitável. Estas composições farmacêuticas podem estar numa variedade de formas incluindo as formas de dosagem oral, assim como pós inaláveis e soluções e soluções injectáveis e infundíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras 1A-B ilustram os resultados de um ensaio funcional na presença de vários péptidos; o ensaio é descrito no Exemplo 2. A Figura 1A é uma apresentação gráfica dos resultados do ensaio de proliferação de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R para péptidos seleccionados da invenção:

- designando os resultados para G G C A D G P T L R E W I S F C G G K (biotina);
- X designando os resultados para G G C A D G P T L R E W I S F C G G;
- ▲ designando os resultados para L A I E G P T L R Q W L H G N G R D T;
- O designando os resultados para G N A D G P T L R Q W L E G R R P K N; e
- + designando os resultados para T I K G P T L R Q W L K S R E H T S.

A Figura 1B é uma representação gráfica dos resultados com os mesmos péptidos e a linha parental de células.

A Figura 2A-C apresenta os resultados de oligomerização de péptidos utilizando o ensaio de proliferação de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R. A Figura 2A apresenta os resultados do ensaio para o péptido biotinilado complexado (AF 12285 com estreptavidina (SA)) para as linhas de células transfectadas e parentais. A Figura 2B apresenta os resultados do ensaio para o péptido biotinilado livre (AF 12295) para as linhas de células transfectadas e parentais. A Figura 2C apresenta os resultados do ensaio para a estreptavidina isolada para as linhas de células transfectadas e parentais.

As Figuras 3A-G apresentam os resultados de uma série de experiências de controlo que mostram a actividade de TPO, os péptidos da presente invenção, EPO, e péptidos de ligação a EPO-R num ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R e a sua correspondente linha parental, ou uma linha de células dependente de EPO. A Figura 3A apresenta os resultados para TPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R e a sua correspondente linha parental. A Figura 3B apresenta os resultados para EPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R e a sua correspondente linha parental. A Figura 3C apresenta os resultados para o péptido biotinilado complexado (AF 12285 com estreptavidina (SA)) e uma forma complexada de um péptido de ligação a EPO-R (AF 11505 com SA) na linha de células Ba/F3 transfectadas com

TPO-R. Os resultados para a correspondente linha de células parental são apresentados na Figura 3D. A Figura 3E apresenta os resultados para TPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células dependente de EPO. A Figura 3F apresenta os resultados para EPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células dependente de EPO. A Figura 3G apresenta os resultados para o péptido biotinilado complexado (AF 12885 com estreptavidina (SA)) e a forma complexada de um péptido de ligação a EPO-R biotinilado (AF 17.505 com SA) na linha de células dependente de EPO.

As Figuras 4A-C ilustram a construção de bibliotecas de péptidos em plasmídeos no vector pJS142. A Figura 4A apresenta um mapa de restrição e posição dos genes. A biblioteca de plasmídeo inclui o terminador de transcrição *rrnB*, o *bla* gene para permitir a selecção em ampicilina, a região intragénica do fago M13 (*M13 IG*) para permitir a captura de DNA de cadeia simples, uma origem de replicação do plasmídeo (*ori*), duas sequências *lacO_s*, e o gene *araC* para permitir a regulação positiva e negativa do promotor *araB* que conduz a expressão do gene de fusão com *lac*. A Figura 4B apresenta a sequência da região de clonagem na extremidade 3' do gene *lac I*, incluindo os sítios *SfiI* e *EagI* utilizados durante a construção da biblioteca. A Figura 4C apresenta a ligação dos oligonucleótidos da biblioteca emparelhados, ON-229 e ON-830, a sítios *SfiI* de pJS142 para produzir uma biblioteca. Os espaços únicos na sequência indicam sítios de ligação.

As Figuras 5A-B ilustram a clonagem nos vetores pELM3 e pELM15 MBP. A Figura 5A apresenta a sequência na extremidade 3' do gene de fusão *malE*, incluindo a sequência codificante de MBP, o ligante de poli-asparagina, o sítio de clivagem por protease do factor Xa, e os sítios de clonagem disponíveis. As restantes porções dos vetores são derivadas de pMALc2 (pELM3) e pMALp2 (pELM15), disponíveis em New England Biolabs. A Figura 5B apresenta a sequência dos vetores após transferência do fragmento da biblioteca *BspEII-ScaI* para o pELM3/pELM15 digerido com *AgeI-ScaI*. A sequência transferida inclui a sequência que codifica o ligante do péptido GGG da biblioteca pJS142.

A Figura 6A apresenta um mapa de restrição e posição dos genes para a construção de bibliotecas de dímeros de capacete no vector pCMG14. A biblioteca de plasmídeo inclui: o terminador de transcrição *rrnB*, o gene *bla* para permitir a selecção em ampicilina, a região intragénica do fago M13 (*M13 IG*) para permitir a captura de DNA de cadeia simples, uma origem de replicação de plasmídeo (*ori*), uma sequência *lacOs*, e o gene *araC* para permitir a regulação positiva e negativa do promotor *araB* que conduz a expressão do gene de fusão do capacete em dímero. A Figura 6B apresenta a sequência da região de clonagem na extremidade 3' do gene do capacete em dímero, incluindo os sítios *SfiI* e *EagI* utilizados durante a construção da biblioteca. A Figura 6C apresenta a ligação dos ON-1679, ON-829, e ON-830 emparelhados nos sítios *SfiI*

de pCMG14 para produzir uma biblioteca. Os espaços únicos na sequência indicam os sítios de ligação.

As Figuras 7 a 9 apresentam os resultados de outros ensaios para avaliar a actividade dos péptidos e miméticos de péptidos da invenção. Neste ensaio os ratinhos são tornados trombocitopénicos com carboplatina. A Figura 7 apresenta resultados típicos quando os ratinhos Balb/C são tratados com carboplatina (125 mg/kg intraperitonealmente) no Dia 0. As linhas a tracejado representam animais não tratados das três experiências. A linha a cheio representa grupos tratados com carboplatina em três experiências. As linhas grossas a cheio representam os dados históricos. A Figura 8 apresenta o efeito da titulação da carboplatina na contagem de plaquetas em ratinhos criados com as quantidades indicadas de carboplatina (em mg/kg, intraperitonealmente (ip) no Dia 0). A Figura 9 apresenta as melhoras da trombocitopenia induzidas por carboplatina no Dia 10 pelo péptido AF12513 (513). A carboplatina (CBP; 50-125 mg/kg, intraperitonealmente) foi administrada no Dia 0. AF12513 (1 mg/kg, ip) foi dada nos Dias 1-9.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ESPECÍFICAS

I. DEFINIÇÕES E PARÂMETROS GERAIS

As definições que se seguem são apresentadas para ilustrar e definir o significado e âmbito dos vários termos utilizados para descrever esta invenção.

"Agonista" refere-se a um ligando biologicamente activo que se liga a ao seu receptor complementar biologicamente activo e activa o último para causar uma resposta biológica no receptor ou para intensificar a actividade biológica pré-existente do receptor.

"Sais farmacêuticamente aceitáveis" referem-se aos sais não tóxicos de metais alcalinos, metais alcalino-terrosos, e de amónio normalmente utilizados na indústria farmacêutica incluindo os sais de sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, bário, amónio, e protamina e zinco, que são preparados por métodos bem conhecidos na técnica. O termo também inclui sais de adição não tóxicos, que são geralmente preparados fazendo reagir os compostos desta invenção com um ácido orgânico ou inorgânico adequado. Os sais representativos incluem o cloridrato, bromidrato sulfato, bissulfato, acetato, oxalato, valerato, oleato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartarato, napsilato, e semelhantes.

"Sal de adição de ácido farmacêuticamente aceitável" refere-se aos sais que retêm a eficácia biológica e propriedades das bases livres e que não são biologicamente ou de algum modo indesejáveis, formados com, ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e semelhantes, e ácidos orgânicos tais como ácido acético,

ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzóico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido o-toluenossulfônico, ácido salicílico e semelhantes. Para uma descrição de sal de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis como pró-fármacos, ver Bundgaard, H., *supra*.

"Éster farmacologicamente aceitável" refere-se aos ésteres que retêm, após hidrólise da ligação éster, a eficácia biológica e propriedades do ácido carboxílico ou álcool e não são biologicamente ou de outro modo indesejáveis. Para uma descrição de ésteres farmacologicamente aceitáveis como pró-fármacos, ver Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Estes ésteres são tipicamente formados a partir do correspondente ácido carboxílico e um álcool. Geralmente, a formação de éster pode ser conseguida através de técnicas sintéticas convencionais. (Ver, e.g., March *Advanced Organic Chemistry*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque (1985) p. 1157 e referências aqui citadas, e Mark *et al.* *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1980)). O componente álcool do éster geralmente compreende (i) um C₂-C₁₂ álcool alifático que pode ou não pode conter uma ou mais ligações duplas e pode ou não pode conter carbonos ramificados ou (ii) um álcool aromático C₇-C₁₂ ou heteroaromáticos. Esta invenção também contempla a utilização de destas composições que são

ésteres como aqui descrito e ao mesmo tempo são o seu sal de adição de ácido farmacologicamente aceitável.

"Amida farmacologicamente aceitável" refere-se às amidas que retêm, após hidrólise da ligação amida, a eficácia biológica e propriedades do ácido carboxílico ou amina e não são biologicamente ou de outro modo indesejáveis. Para uma descrição de amidas farmacologicamente aceitáveis como pró-fármacos, ver Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdão (1985). Estas amidas são tipicamente formadas a partir do correspondente ácido carboxílico e uma amina. Geralmente, a formação de amida pode ser conseguida através de técnicas sintéticas convencionais. (Ver, e.g., March *Advanced Organic Chemistry*, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque (1985) p. 1152 e Mark *et al.* *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1980)). Esta invenção também contempla a utilização destas composições que são amidas como aqui descrito e ao mesmo tempo são os seus sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis.

"Veículo farmacologicamente ou terapêuticamente aceitável" refere-se a um meio veículo que não interfere com a eficácia da actividade biológica dos ingredientes activos e que não é tóxico para o hospedeiro ou doente.

"Estereoisómero" refere-se a um composto químico possuindo o mesmo peso molecular, composição química, e constituição como outro, mas com os átomos agrupados

diferentemente. Ou seja, certas unidades químicas idênticas estão em diferentes orientações no espaço e, deste modo, quando puro, possui a capacidade de rodar o plano da luz polarizada. Contudo, alguns estereoisómeros puros podem ter uma rotação óptica que é tão suave que não é detectável com a instrumentação actual. Os compostos da presente invenção podem ter um ou mais átomos de carbono assimétricos e deste modo incluem vários estereoisómeros. Todos os estereoisómeros estão incluídos no âmbito da invenção.

"Quantidade terapêuticamente ou farmacêuticamente eficaz" como aplicado às composições da presente invenção refere-se à quantidade de composição suficiente para induzir um resultado biológico desejado. Esse resultado pode ser o alívio dos sinais, sintomas, ou causas de uma doença, ou qualquer outra alteração desejada de um sistema biológico. Na presente invenção, o resultado envolverá tipicamente um decréscimo nas respostas imunológicas e/ou inflamatórias à infecção ou lesão em tecidos.

Os resíduos de aminoácidos em péptidos são abreviados como se segue: Fenilalanina é Phe ou F; Leucina é Leu ou L; Isoleucina é Ile ou I; metionina é Met ou M; Valina é Val ou V; Serina é Ser ou S; Prolina é Pro ou P; Treonina é Thr ou T; Alanina é Ala ou A; Tirosina é Tyr ou Y; Histidina é His ou H; Glutamina é Gln ou Q; Asparagina é Asn ou N; Lisina é Lys ou K; Ácido Aspártico é Asp ou D; Ácido Glutâmico é Glu ou E; Cisteína é Cys ou C; Triptofano é Trp ou W; Arginina é Arg ou R; e Glicina é Gly ou G.

Adicionalmente, Bu é Butoxilo, Bzl é benzilo, CHA é ciclohexilamina, Ac é acetilo, Me é metilo, Pen é penicilamina, Aib é ácido amino-isobutírico, Nva é norvalina, Abu é ácido amino-butírico, Thi é tienilalanina, OBn é O-benzilo, e hyp é hidroxiprolina.

Em adição aos péptidos consistindo apenas em aminoácidos que ocorrem naturalmente, são também proporcionados peptidomiméticos ou análogos de péptidos. Os análogos de péptidos são normalmente utilizados na indústria farmacêutica como fármacos não péptidos com propriedades análogas às do péptido molde. Estes tipos de compostos não péptido são denominados "miméticos de péptidos" ou "peptidomiméticos" (Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p.392 (1985); e Evans *et al. J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Os miméticos de péptidos que são estruturalmente semelhantes a péptidos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente ou intensificado. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipéptido paradigma (*i.e.*, um polipéptido que possui uma actividade biológica ou farmacológica), tal como polipéptido que ocorre naturalmente que se liga ao receptor, mas possui uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação seleccionada a partir do grupo consistindo em: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, e $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos conhecidos na técnica e outros descritos nas referências que se seguem: Spatola,

A.F. in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nova Iorque, p. 267 (1983); Spatola, A.F., *Vega Data* (Março 1983), Vol. 1, Issue 3, *Peptide Backbone Modifications* (revisão geral); Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) pp. 463-468 (revisão geral); Hudson, D. et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185 (1979) (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola et al. *Life Sci* 38:1243-1249 (1986) (-CH₂-S); Hann *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 307-314 (1982) (-CH-CH-, *cis e trans*); Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (1980) (-COCH₂-); Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett* 23:2533 (1982) (-COCH₂-); Szelke et al. *European Appln.* EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) (-CH(OH)CH₂, -); Holladay et al. *Tetrahedron Lett* 24:4401-4404 (1983) (-C(OH)CH₂-); e Hruby *Life Sci* 31:189-199 (1982) (-CH-, -S-). Uma ligação não peptídica particularmente preferida é -CH₂NH-. Estes miméticos de péptidos podem ter vantagens significativas sobre as formas de realização polipéptido, incluindo, por exemplo: uma produção mais económica, maior estabilidade química, propriedades farmacológicas (semi-vida, absorção, potência, eficácia, etc.), especificidade alterada (e.g., um largo espectro de actividades biológicas), antigenicidade reduzida, e outras. A marcação de peptidomiméticos envolve normalmente a ligação covalente de uma ou mais marcações, directamente ou através de um espaçador (e.g., um grupo amida), em posições de não interferência com o peptidomimético que são previstas por dados de estrutura-actividade quantitativos e/ou modelação molecular. Estas posições de não interferência são geralmente posições que não formam

contactos directos com a(s) macromoléculas(s) (e.g., moléculas da superfamília das imunoglobulinas) a que o peptidomimético se liga para produzir o efeito terapêutico. A derivação (e.g., marcação) de peptidomiméticos não deve interferir substancialmente com a actividade biológica ou farmacológica desejada do peptidomimético. Geralmente, os peptidomiméticos dos péptidos que se ligam ao receptor ligam-se ao receptor com elevada afinidade e possuem actividade biológica detectável (*i.e.*, são agonísticos ou antagonísticos para uma ou mais alterações fenotípicas mediadas por receptor).

A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (e.g., D-lisina em vez de L-lisina) pode ser utilizada para produzir péptidos mais estáveis. Adicionalmente, os péptidos restritos compreendendo uma sequência de consenso ou uma variação na sequência de consenso substancialmente idêntica podem ser produzidos por métodos conhecidos na técnica (Rizo e Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); por exemplo, por adição de resíduos internos de cisteína capazes de formar pontes dissulfureto intramoleculares que ciclizam o péptido.

Os aminoácidos sintéticos ou que não ocorrem naturalmente referem-se a aminoácidos que não ocorrem naturalmente *in vivo* mas que, contudo, podem ser incorporados nas estruturas de péptido aqui descritas. Os aminoácidos sintéticos preferidos são os D- α -aminoácidos dos amino-

ácidos que ocorrem naturalmente L- α -aminoácidos assim como os aminoácidos D- e L-a-aminoácidos que não ocorrem naturalmente representados pela fórmula H_2NCHR_5COOH em que R_5 é 1) um grupo alquilo inferior, 2) um grupo cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, 3) um heterociclo de 3 a 7 átomos de carbono e 1 a 2 heteroátomos seleccionados a partir do grupo consistindo em oxigénio, enxofre, e azoto, 4) um resíduo aromático de 6 a 10 átomos de carbono opcionalmente possuindo de 1 a 3 substituintes no núcleo aromático seleccionado a partir do grupo consistindo em hidroxilo, alcoxilo inferior, amino, e carboxilo, 5) -alquilen-Y em que alquilen é um grupo alquilen de 1 a 7 átomos de carbono e Y é seleccionado a partir do grupo consistindo em (a) hidroxilo, (b) amino, (c) cicloalquilo e cicloalquilen de 3 a 7 átomos de carbono, (d) arilo de 6 a 10 átomos de carbono opcionalmente possuindo de 1 a 3 substituintes no núcleo aromático seleccionado a partir do grupo consistindo em hidroxilo, alcoxilo inferior, amino e carboxilo, (e) heterocíclico de 3 a 7 átomos de carbono e 1 a 2 heteroátomos seleccionados a partir do grupo consistindo em oxigénio, enxofre, e azoto, (f) $-C(O)R^2$ em que R^2 é seleccionado a partir do grupo consistindo em hidrogénio, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxilo inferior, e $-NR^3R^4$ em que R^3 e R^4 são independentemente seleccionados a partir do grupo consistindo em hidrogénio e alquilo inferior, (g) $-S(O)nR^6$ em que n é um número inteiro de 1 a 2 e R^6 é alquilo inferior e com a condição de que R^5 não define uma cadeia lateral de um aminoácido que ocorre naturalmente.

Outros aminoácidos sintéticos preferidos incluem aminoácidos em que o grupo amino está separado a partir do grupo carboxilo por mais do que um átomo de carbono tal como β -alanina, ácido γ -aminobutírico, e semelhantes.

Os aminoácidos sintéticos particularmente preferidos incluem, por via de exemplo, os D-aminoácidos que ocorrem naturalmente dos L-aminoácidos, L-1-naftil-alanina, L-2-naftilalanina, L-ciclo-hexilalanina, ácido L-2-amino isobutírico, os derivados sulfóxido e sulfona da metionina (*i.e.*, $\text{HOOC}-(\text{H}_2\text{NCH})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})\text{nR}^6$) em que n e R^6 são como definido acima assim como o alcóxido inferior derivado de metionina (*i.e.*, $\text{HOOC}-(\text{H}_2\text{NCH})\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OR}^6$ em que R^6 é como definido acima).

"Marcação detectável" refere-se a materiais, que quando covalentemente ligados aos péptidos e miméticos de péptidos desta invenção, permitem a detecção do péptido e miméticos de péptidos *in vivo* no doente a quem o péptido ou mimético do péptido foi administrado. As marcações detectáveis adequadas são bem conhecidas na técnica e incluem, por via de exemplo, radioisótopos, marcações fluorescentes (*e.g.*, fluoresceína), e semelhantes. A marcação particular detectável empregue não é crítica e é seleccionada em relativamente à quantidade de marcação a ser empregue assim como a toxicidade da marcação para a quantidade de marcação a ser empregue. A selecção de marcação relativamente a estes factores está bem no âmbito do especialista da técnica.

A ligação covalente da marcação detectável ao péptido ou mimético do péptido é conseguida através de métodos convencionais bem conhecidos na técnica. Por exemplo, quando o radioisótopo ^{125}I é empregue como a marcação detectável, a ligação covalente de ^{125}I ao péptido ou ao mimético do péptido pode ser conseguida por incorporação do aminoácido tirosina no péptido ou mimético do péptido e iodando depois o péptido. Se a tirosina não está presente no péptido ou mimético do péptido, a incorporação de tirosina no terminal N ou C do péptido ou mimético do péptido pode ser conseguida através de química bem conhecida. Do mesmo modo, o ^{32}P pode ser incorporado no péptido ou mimético do péptido como uma unidade fosfato através de, por exemplo, um grupo hidroxilo no péptido ou mimético do péptido utilizando química convencional.

II. VISÃO GLOBAL

A presente invenção proporciona compostos que se ligam a e activam o TPO-R ou de outro modo se comportam como um agonista de TPO. Estes compostos incluem compostos "iniciais" péptido e compostos "derivados" construídos de modo a possuir a mesma estrutura molecular ou forma ou semelhantes como os compostos iniciais mas que diferem a partir de compostos iniciais com respeito à susceptibilidade à hidrólise ou proteólise e/ou com respeito a outras propriedades biológicas, tais como afinidade aumentada para o receptor. A presente invenção também propor-

ciona composições compreendendo uma quantidade eficaz de um agonista de TPO, e mais particularmente um composto, que é útil para tratar distúrbios hematológicos, e particularmente, trombocitopenia associada com quimioterapia, terapia por radiação, ou transfusões de medula óssea.

III. IDENTIFICAÇÃO DE AGONISTAS DE TPO

Os péptidos possuindo uma afinidade de ligação ao TPO-R podem ser rapidamente identificados por sistemas de produção de diversidade de péptidos aleatórios acoplados com um processo de enriquecimento por afinidade.

Especificamente, sistemas de produção de diversidade de péptidos aleatórios incluem os sistemas de "péptidos em plasmídeos" descritos nas Patentes U.S. N° 5 270 170 e 5 338 665; o sistema de "péptidos em fago" descrito na Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/718,577, de 20 de Junho de 1991 que é um pedido de continuação em parte da Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/541 108, de 20 de Junho de 1990, e em Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382 (1980); o "sistema polissoma" descrito na Série de Pedido de Patente U.S. N° 08/300 262, de 2 de Setembro de 1994, que é um pedido de continuação em parte com base na Série de Pedido de Patente U.S. N° 08/144 775, de 29 de Outubro de 1993 e PCTW095/11992; o sistema "biblioteca de sintéticos codificados (ESL)" descrito na Série de Pedido de Patente U.S. N° 08/146 886, de 12 de Novembro de 1993 que é um pedido de continuação em parte da

Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/946 239, de 16 de Setembro de 1992, que é um pedido de continuação em parte da Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/762 522, de 18 de Setembro de 1991; e o sistema "síntese de polímero imobilizado em muito larga escala" descrito na Patente U.S. N° 5 143 854; Publicação de Patente PCT N° 90/15070, publicado em 13 de Dezembro de 1990; Série de Pedido de Patente U.S. N° 07/524, :20, de 6 de Dezembro de 1990; Fodor *et al. Science* 251:767-773 (2/1991); Dower e Fodor *Ann. Rep. Med. Chem.* 26: 271-180 (1991); e Série de Pedido de Patente U.S. N° 805 727, de 6 de Dezembro de 1991.

Utilizando os procedimentos descritos acima, foram geralmente concebidos péptidos aleatórios para possuir um número definido de resíduos de aminoácidos em comprimento (e.g., 12). Para produzir a colecção de oligonucleótidos que codificam os péptidos aleatórios, o motivo codão (NNK)_x, em que N é o nucleótido A, C, G, ou T (equimolar; dependendo da metodologia empregue, podem ser empregues outros nucleótidos), K é G ou T (equimolar), e x é um número inteiro correspondente ao número de aminoácidos no péptido (e.g., 12) foi utilizado para especificar qualquer um dos 32 codões possíveis resultantes a partir do motivo NNK: 1 para cada 12 aminoácidos, 2 para cada 5 aminoácidos, 3 para cada 3 aminoácidos, e apenas um dos três codões stop. Deste modo, o motivo NNK codifica todos os aminoácidos, codifica apenas um codão stop, e reduz a influência dos codões.

Nos sistemas empregues, os péptidos aleatórios foram apresentados à superfície de uma partícula de fago, como parte de uma proteína de fusão compreendendo pIII ou a proteína de revestimento pVIII de um derivado de fago fd (péptidos em fago) ou como uma proteína de fusão com a proteína de fusão LacI péptido ligada a um plasmídeo (péptidos em plasmídeos).

O fago ou plasmídeos, incluindo o DNA que codifica os péptidos, foram identificados e isolados através de um processo de enriquecimento por afinidade utilizando TPO-R imobilizado. O processo de enriquecimento por afinidade, por vezes chamada "selecção," envolve múltiplas rondas de incubação do fago, plasmídeos, ou polissomas com o receptor imobilizado, reunindo os fagos, plasmídeos, ou polissomas que se ligam ao receptor (em conjunto com o DNA ou mRNA acompanhante), e produzindo mais do fago ou plasmídeos recolhidos (em conjunto com a proteína de fusão LacI-péptido acompanhante). O domínio extracelular (ECD) do TPO-R foi tipicamente utilizado durante a selecção.

Após várias rondas de enriquecimento por afinidade, o fago ou plasmídeos e péptidos acompanhantes foram examinados por ELISA para determinar se os péptidos se ligam especificamente a TPO-R. Este ensaio foi efectuado de modo semelhante aos procedimentos utilizados no processo de enriquecimento por afinidade, excepto que após remoção do fago não ligado, os poços foram tipicamente tratados com

anticorpo de coelho anti-fago, depois com anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (AP). A quantidade de fosfatase alcalina em cada poço foi determinada por métodos convencionais. Um procedimento de ELISA semelhante para utilização no sistema de péptidos em plasmídeos é descrito em detalhe a seguir.

Por comparação dos poços de teste com os poços de controlo (sem receptor), pode determinar-se se as proteínas de fusão se ligam especificamente ao receptor. As misturas de fago em que se verificou a ligação a TPO-R foram pesquisadas num formato de sondagem por levantamento de colónias utilizando receptor monovalente marcado radioactivamente. Esta sonda pode ser produzida utilizando cinase proteína A para fosforilar uma sequência kemptide em fusão com o terminal C do receptor solúvel. A forma manipulada do receptor TPO é depois expressa em células hospedeiras, tipicamente células CHO. Após colheita de PI-PLC dos receptores, o receptor foi testado para a ligação a clones de fago específicos para TPO ou TPO-R. O receptor é depois marcado com elevada actividade com ^{33}P para utilização como uma sonda monovalente para identificar ligandos com elevada afinidade utilizando levantamentos de colónias.

Os péptidos em que se verificou ligação especificamente ao receptor foram depois sintetizados como o péptido livre (e.g., no fago) e testado num ensaio de bloqueamento. O ensaio de bloqueamento foi efectuado de

modo semelhante à ELISA , excepto que foi adicionado TPO ou um péptido de referência aos poços antes da proteína de fusão (os poços de controlo foram de dois tipos: (1) sem receptor; e (2) sem TPO ou péptido de referência). As proteínas de fusão para as quais a ligação ao receptor foi bloqueada por TPO ou pelo péptido de referência contêm péptidos na porção do péptido aleatório que são compostos preferidos da invenção.

O TPO-R, assim como o seu domínio extracelular, foram produzidos em células hospedeiras recombinantes. É construída uma forma útil de TPOR por expressão da proteína como uma proteína solúvel em células hospedeiras transformadas com baculovírus utilizando métodos convencionais; é construída outra forma útil com um péptido sinal para a secreção de proteína e para a ligação em âncora a glicofosfolípidos de membrana. Esta forma de ligação em âncora é denominada "PIG-tailing"- Ver Caras e Wendell *Science* 243: 1196-1198 (1989) e Lin *et al.* *Science* 249:677-679 (1990).

Utilizando o sistema PIG-tailing, pode clivar-se o receptor a partir da superfície das células que expressam o receptor (e.g., células CHO transformadas seleccionadas para um nível de expressão elevado do receptor com a separador de células) com fosfolipase C. O receptor clivado compreende ainda uma sequência de aminoácidos do terminal carboxílico, denominada "cauda HPAP", a partir da proteína sinal para ligação à membrana e pode ser imobilizada sem

posterior purificação. A proteína recombinante do receptor pode ser imobilizada através do revestimento dos poços de placas de microtitulação com um anticorpo anti-cauda HPAP (Ab 179 ou MAb 179), bloqueamento da ligação não específica com albumina do soro bovino (BSA) em PBS, e depois ligando o receptor recombinante clivado com o anticorpo. Utilizando este procedimento, deve efectuar-se a reacção de imobilização em várias concentrações de receptor para determinar a quantidade óptima para uma dada preparação, porque diferentes preparações de proteína recombinante contêm frequentemente diferentes quantidades da proteína desejada. Adicionalmente, deve assegurar-se que o anticorpo imobilizador é completamente bloqueado (com TPO ou qualquer outro composto de bloqueamento) durante o processo de enriquecimento por afinidade. De outro modo, o anticorpo não bloqueado pode ligar o fago não desejado durante o enriquecimento por procedimento de afinidade. Podem utilizar-se péptidos que se ligam ao anticorpo imobilizador para bloquear sítios não ligados que permanecem após imobilização do receptor para evitar este problema ou pode simplesmente imobilizar-se o receptor directamente nos poços de placas de microtitulação, sem o auxílio de um anticorpo imobilizador. Ver Série de Pedido de Patente U.S. Nº 07/947,339, de 18 de Setembro de 1992.

Quando se utilizam sistemas de produção de péptidos aleatórios que permitem interacção ligando-receptor multivalente, deve reconhecer-se que a densidade do receptor imobilizado é um factor importante na determinação

da afinidade dos ligandos que podem ser ligados ao receptor imobilizado. A densidade de receptor elevadas (e.g., cada poço revestido com anticorpo anti-receptor tratado com 0,25 a 0,5 mg de receptor), é mais provável que ocorra ligação multivalente do que a densidades baixas de receptor (e.g., cada poço revestido com anticorpo anti-receptor tratado com 0,5 a 1 ng do receptor). Se ocorre a ligação multivalente, então será mais provável isolar ligandos com afinidade relativamente baixa, a menos que utilize densidades elevadas de receptor imobilizado para identificar compostos iniciais e utiliza baixas densidades de receptor para isolar compostos derivados com elevada afinidade.

Para discriminar entre péptidos de elevada afinidade, é frequentemente utilizada uma sonda de receptor monovalente. Esta sonda pode ser produzida utilizando cinase de proteína A para fosforilar uma sequência kemptide com o terminal C do receptor solúvel. A forma "manipulada" do receptor TPO é depois expressa em células hospedeiras, tipicamente células CHO. Após recolha de PIP2C dos receptores, o receptor foi testado para a ligação a TPO ou a clones de fago específicos para TPO-R. O receptor é depois marcado com uma elevada actividade específica com ³³P para utilização como uma sonda monovalente para identificar ligandos com elevada afinidade utilizando levantamentos de colónias.

Os métodos de rastreio preferidos para facilitar identificação de péptidos que ligam TPO-R envolve inicial-

mente a identificação de péptidos iniciais que se ligam ao domínio extracelular do receptor e depois preparar outros péptidos que se assemelhem aos péptidos iniciais. Especificamente, utilizando péptidos com base em pIII ou pVIII no sistema de fagos, pode ser pesquisada uma biblioteca aleatória para descobrir um fago que apresente um péptido que se liga a TPO-R. Os DNA dos fagos são sequenciados para determinar as sequências dos péptidos apresentados à superfície dos fagos.

Os clones capazes de se ligar especificamente ao TPO-R foram identificados a partir de uma biblioteca de pVI_TI 10-mero aleatórios lineares e de bibliotecas 10-mero e 12-mero pVIII cíclicos aleatórios. As sequências destes péptidos servem como a base para a construção de outras bibliotecas de péptidos concebidas para conter uma frequência elevada de derivados dos péptidos inicialmente identificados. Estas bibliotecas podem ser sintetizadas de modo a favorecer a produção de péptidos que diferem a partir do péptido de ligação: n apenas a alguns resíduos. Esta abordagem envolve a síntese de um oligonucleótido com a sequência codificante do péptido de ligação, excepto que em vez de utilizar preparações puras de cada um de quatro trifosfatos de nucleósido na síntese, utilizam-se misturas de quatro trifosfatos de nucleósido (*i.e.*, 55% do nucleótido "correcto", e 15% de cada um dos outros três nucleótidos é uma mistura preferida para este propósito e 70% do nucleótido "correcto" e 10% de cada um dos outros três nucleótidos é outra mistura preferida para este

propósito) de modo a produzir derivados da sequência codificante do péptido de ligação.

Foram utilizadas várias estratégias para derivar os péptidos iniciais efectuando bibliotecas por "mutagéneses num tema". Estas incluíram uma biblioteca de fagemídeos de mutagéneses em pVIII com base na sequência de consenso mutagenizada numa frequência 70:10:10:10 e estendida em cada terminal com resíduos aleatórios para produzir clones que codificam a sequência XXXX (C, S, P, ou R) TLREWL XXXXXX (C ou S). Foi construída uma biblioteca semelhante estendida/mutagenizada utilizando o sistema péptidos em plasmídeos para produzir clones que codificam a sequência XXXXX (C, S, P, ou R) TLREWL XXXXXXXX. Foi construída uma biblioteca estendida/mutagenizada, XXXX (C, S, P, ou R) TLREWL XXXXXXXX (C ou S), utilizando o sistema de apresentação em polissoma. Todas as três bibliotecas foram pesquisadas com a eluição de péptido e pesquisadas com receptor monovalente marcado radioactivamente.

As técnicas "péptidos em plasmídeos" foram também utilizadas para pesquisa de péptidos e estudos de mutagéneses e são descritas em maior detalhe na Patente U.S. nº. 5 338 665. de acordo com esta abordagem, os péptidos aleatórios são fundidos no terminal C de LacI através da expressão a partir de um plasmídeo vector que comporta um gene de fusão. A ligação da fusão LacI-péptido ao seu DNA codificante ocorre através das sequências *lacO* no plasmídeo, formando um complexo péptido-LacI-plasmídeo estável

que pode ser pesquisado através de purificação por afinidade (selecção) num receptor imobilizado. Os plasmídeos assim isolados podem depois ser reintroduzidos em *E. coli* por electroporação para amplificar a população seleccionada para rondas adicionais de pesquisa, ou para a pesquisa de clones individuais.

Adicionalmente, a pesquisa de péptidos aleatórios e os estudos de mutagénese foram efectuados utilizando a sistema de apresentação do terminal C de LacI modificado em que a valência da apresentação foi reduzida (sistema de apresentação "capacete em dímero"). As bibliotecas foram pesquisadas e as inserções de DNA resultantes foram clonadas como uma mistura num vector de proteína de ligação a maltose (MBP) permitindo a sua expressão como uma proteína de fusão C-terminal. Os lisados celulares brutos a partir de clones individuais de fusão com MBP repicados aleatoriamente foram depois ensaiados quanto a ligação a TPO-R num formato de ELISA, como discutido acima.

Os estudos de mutagénese de péptidos foram também conduzidos utilizando o sistema de apresentação em polissoma, como descrito na Série de Pedido co-pendente de Patente U.S. N° 08/300,262, de 2 de Setembro de 1994, que é um pedido de continuação em parte com base na Série de Pedido de Patente U.S. N° 08/144,775, de 29 de Outubro de 1993 e PCT WO 95/11992. Foi construída uma biblioteca de mutagénese com base numa sequência X X X X (C, P, R, ou S)

t l r e f l X X X X X X (C ou S), em que X representa um codão aleatório NNK, e as letras minúsculas representam os codões de aminoácidos contendo mutagénese 70:10:10:10 nas posições 1 e 2 e K (G ou T) na posição 3 do codão. A biblioteca foi seleccionada por 5 rondas contra o receptor de TPO que foi imobilizado em esferas magnéticas. Após a quinta ronda, a mistura amplificada por PCR foi clonada em pAFF6 e os clones positivos em ELISA foram sequenciados. As sequências foram subclonadas num vector MBP e as suas afinidades de ligação foram determinadas por uma MBP ELISA.

Para imobilizar o TPO-R para pesquisa de polissoma, o Ab 179 foi primeiro quimicamente conjugado com esferas magnéticas activadas com tosilo (disponíveis em Dynal Corporation) como descrito pelo fabricante. As esferas foram incubadas com anticorpo num tampão borato a 0,5 M (pH 9,5) durante a noite à temperatura ambiente. As esferas foram lavadas e combinadas com TPO-R contendo a "cauda HEAP". As esferas revestidas com anticorpo e o receptor foram incubados durante 1 hora a 4° C, e as esferas foram lavadas de novo antes da adição à biblioteca em polissoma.

A pesquisa das várias bibliotecas descritas acima produziu péptidos de ligação ao receptor de TPO apresentados nas Tabelas 1 e 2 a seguir, assim como outros não listados aqui.

TABELA 1

Peptides
REGPTLRQWM
REGPTLRQWM
SRGMTLREWL
EGPTLRGWLA
REGQTLKEWL
ERGPFWAKAC
REGPRQVMWM
CSSLTLREWLVC
CLTGPFYTQWLYEC
CGEGLTLTQWLEHC
CRAGPTLLEWLTLC
CRAGPTLLEWLTLC
CRQGPTLTAWLLC
CADGPTLREWISFC
CELVGPSLMSWLTC
CGTSGPTLSTWLDC
CDQLGVTLSRWLEC
SGTGLTLREWLGSFSLLS
CPEGPTLLQWLKRGYSSC
RGDGPTLSQWLYSLMIMC
MVAGPTLREFIASLPIHC
SMQGPTFREWVSMMKVLC
SVQCGPTLRQWLAARNHLS
GNADGPTLRQWLEGRRPKN
SVRCGPTLRQWLAARTHLS
LAIEGPTLRQWLHGNGRDT
HGRVGPTLREWKTQVATKK
CADGPTLREWISFC
ISDGPTLKEWLSVTRGAS
SIEGPTLREWLTSTRTPHS
TIKGPTLRQWLKSREHTS
GNADGPTLRQWLEGRRPKN
SIEGPTLREWLTSTRTPHS
ISDGPTLKEWLSVTRGAS

TABELA 2

Peptideo
CSLEDLRKRC
CRRSELLERC
CTFKQFLDGC
CTRGEWLRCC
CTLRQWLQGC
CTLEELRACC
CTREELMRLC
CQRADLINF C
CNRNDLLLFC
CTRTEWLHGC
CTLEFMNGC
CSLGELRRLC
CNINQLRSIC
CTMRQFLVCC
CTRSEWLERC
CTLHEYLSGC
CTREELLRQC
CTFREFVNGC
CSRADFLAAC
CSCAQVVQCC
CTLRQWILLGMC
CTLREWLHGGFC
CTLRAWLMSETC
CTLRAWLMESCC
CTFQVWKLARNC
CLLREWLDXRTC
CVLREWLLXXSC
OLLSEFLAGQQC
CSLRQYLDFGLGSC
CTLQELKQSSLYEC
CDLSELKTHGYAYC
OKLSDWLMNGVAAC
CSLQEFLSHGGYVC
CSLKEFLHSGLMQC
CTFRQLLEYGVSSC
CTMREFLVASGVAC
CTLAEFLASGVEQC
CTLAEFLASGVEQC

(continuação)

Peptídeo
GTLKEWLVSHEVWC
CTLREFLSLGMNAC
GTLREFLDPTTAVC
CSLLEFLALGVALC
GGGRGCTLKQWKQGDCGRS
CNRSQLLAAC
GTLQQWLSGC
CTLREFKAGC
GTRAQFLKGC
CTLREFNRGC
CTLSDFKRG
GTFRQWKEAC
GTLSEFRGGC
CTLQEFLEGC
GTLQQWKDGC
CTRSQWLEGC
CSLQEFKHGC
GTLGEWKRG
GTLWGCGKRG
GTLQEWRRGC
CTRLSGCWLC
CTRTQWLLDC
CTLAEFRRG
GTSTQWLLAC
CSRSQFLRSC
GTLREWLEGC
CTLREFLLMGAC
CTLKEWLLWSSC
CTLLEWLRNPVC
GTLRQWLGDAWC
CTLGOWLQMGMC
GTLREWVFAGLC
CLLLEFLSGADC
CTLGEFLAGHLG
GRLREFLVDLTC
GSFRSWLVDQTC
CTLREWLEDLGC
GTLQDWLVSWTC

(continuação)

Peptídeo
CTLSEWLSELSC
CTLMQWLGGWPC
CTLREWLSYGTC
CTLQEWLGGGLC
GSHGCTLREWLCMKIVPC
QWQGCTLRDCTLRGVFWS
SVNSCTLREFLTGCRVFC
SYDGCTLRHWLMDIYGDC
QRSGCTLRDWVLLNCLAS
NYRGCTLSQWVSEQIVGC
GRSGCTLREYLGGMCYLS
ASWYCTVPELMEMLPEC
GSTGCTLREXLHMLGLDC
ACEGCTLRQWLEYVVRVGC
AQRGCTLQYFVSYGXDMC
GVCGCTLREFLAIPHTSC
SEGGCTLREWVASSLANC
SNSRCTLREWIHQGDFS
SNSRCTLREWIHQGDFS
CLGCTLSQWRKRTRCDTH
YRGCSRAQLLGGECRKK
GRGCTLKQWKQGDGGRS
VRGCALRDWYAGECFDWT
LWRGCTLNGFKSRHCSSPE
CTLRQWKHRGCAP
GRGCTRAQWLAGCOTGH
RAGCTLREFRKGCLAL
KRGCTLAEMIRGONRSN
GRGCTLKQWKQGDGGRS
RWRGCSLAKLKKGAACGRG
RGGCTLREWRVRVIN
GRGCTLKQWKQGDGGRS
RYGCTRHQMLVGTCVRH

Os valores de IC₅₀ para alguns péptidos representativos adicionais são dados na tabela a seguir. Podem ser utilizados vários métodos para avaliar os valores de IC₅₀.

Por exemplo, foi utilizado um ensaio ELISA de equilíbrio de ligação, utilizando um indicador de MBP-TPO ou péptido lacI, para determinar se os péptidos inibiam a ligação de TPO ao domínio extracelular do receptor de TPO. Tipicamente, o valor de IC_{50} foi determinado utilizando o péptido livre. O valor de IC_{50} pode ser determinado utilizando o péptido livre, que opcionalmente pode ser amidado no terminal C, ou pode ser preparado como um éster ou outra amida carboxilo.

Para recriar a exacta sequência apresentada no fago, os aminoácidos N-terminais e C-terminais aminoácidos dos péptidos sintéticos são frequentemente antecidos por um ou dois resíduos de glicina. Não se crê que estas glicinas sejam necessárias para ligação ou actividade. Do mesmo modo, para mimar a sequência exacta de péptidos apresentados em polissomas, os aminoácidos C-terminais dos péptidos sintéticos são frequentemente antecidos da sequência M A S. de novo, não se crê que esta sequência seja necessária para ligação ou actividade.

Os valores de IC_{50} são indicados simbolicamente pelos símbolos "-", "+", e "++". Por exemplo, os péptidos que apresentaram valores de IC_{50} em excesso de 200 mM são indicados com "-". Os péptidos que dão valores de IC_{50} inferiores a ou iguais a 200 mM são dados por "+", enquanto os que dão valores de IC_{50} de 500 nM ou inferior são indicados com "++". Os péptidos que dão valores de IC_{50} no ponto de exclusão ou próximo para um símbolo particular são

indicados com um designador híbrido, e.g., "+/-". Os péptidos para os quais os valores de IC₅₀ não foram determinados estão listados como "N.D.". O valor de IC₅₀ para péptidos possuindo a estrutura: G G C T L R E W L H G G F C G G foi de 500 nm ou inferior. (Note-se que os aminoácidos N-terminais e C-terminais foram antecidos de duas glicinas para recriar a sequência exacta apresentada pelo fago. Não se crê que estas glicinas não sejam necessárias para ligação ou actividade.)

TABELA 3

Peptideo	Afinidade
GGCADGPTLREWISFCGG	++
GNADGPTLRQWLEGRRPKN	++
GGCADGPTLREWISFCGGK	++
TIKGPTLRQWLKSREHTS	++
GPTLRQWL	-
AIEGPTLRQWLHGNGRDTS	++
LIEGPTLREWLTSRTPHS	++

Os péptidos e peptidomiméticos possuindo um IC₅₀ superior a cerca de 100 mM não ligam o suficiente para permitir a utilização em aspectos diagnósticos ou terapêuticos desta invenção. Preferencialmente, para propósitos de diagnóstico, os péptidos e peptidomiméticos possuem um IC₅₀ de cerca de 2 mM ou menos e, para propósitos farmacêuticos, os péptidos e peptidomiméticos possuem um IC₅₀ de cerca de 100 mM ou menos. A sequência do péptido de ligação

também proporciona um meio para determinar o tamanho mínimo de um composto de ligação a TPOR da invenção. Utilizando o sistema de "sintéticos codificados pela biblioteca" (ESL) ou o sistema de "síntese de polímero imobilizado em muito larga escala", não se pode apenas determinar o tamanho mínimo de um péptido com esta actividade, mas podem-se produzir também todos os péptidos que formam o grupo de péptidos que diferem num motivo preferido (ou o tamanho mínimo desse motivo) em um, dois, ou mais resíduos. Esta colecção de péptidos pode depois ser pesquisada quanto à capacidade para se ligar ao receptor de TPO. Estes sistemas de síntese de polímeros imobilizados ou outros métodos de síntese de péptidos podem também ser utilizados para sintetizar análogos truncados, análogos de deleção, análogos de substituição, e combinações de todos os compostos de péptidos da invenção.

Os péptidos e miméticos de péptidos da presente invenção foram também avaliados num ensaio de proliferação de células dependente de trombopoietina, como descrito em maior detalhe no Exemplo 2 a seguir. A proliferação de células é medida por técnicas conhecidas na técnica, tais como um ensaio de MTT que se correlaciona com a incorporação de ³H-timidina como uma indicação de proliferação de células (ver Mossman *J. Immunol. Methods* 65:55 (1983)). Os péptidos testados estimularam a proliferação de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R numa forma dependente da dose como apresentado na Figura 1A. Estes péptidos não produzem efeito na linha de células parental como apresentado na Figura 1B.

As Figuras 7 a 9 apresentam os resultados de um outro ensaio avaliando a actividade dos péptidos e miméticos de péptidos da invenção. Neste ensaio, os ratinhos são tornados trombocitopénicos com carboplatina. A Figura 7 apresenta resultados típicos quando são criados ratinhos Balb/C com carboplatina (125 mg/kg intraperitonealmente) no Dia 0. As linhas a tracejado representam os animais não tratados das três experiências. A linha a cheio representa os grupos tratados com carboplatina em três experiências. As linhas a cheio grossas representam dados históricos. A Figura 8 apresenta o efeito da titulação de carboplatina na contagem de plaquetas em ratinhos tratados com as quantidades de carboplatina indicadas (em mg/kg, intraperitonealmente (ip) no Dia 0). A Figura 9 apresenta a melhoria da trombocitopenia induzida por carboplatina no Dia 10 pelo péptido AF12513 (513). A carboplatina (CBP; 50-125 mg/kg, intraperitonealmente) foi administrada no Dia 0. O AF12513 (1 mg/kg, ip) foi dado nos Dias 1-9. Estes resultados mostram que os péptidos da invenção podem melhorar a trombocitopenia num modelo de ratinho.

Adicionalmente, certos péptidos da presente invenção podem ser dimerizados ou oligomerizados, aumentando conseqüentemente a afinidade e/ou actividade dos compostos. Para investigar o efeito que a dimerização/oligomerização péptido possui uma potência de mimético de TPO em ensaio de proliferação de células, foi

sintetizado um análogo biotinilado no terminal C do péptido G G C A D G P T L R E W I S F C G G (G G C A D G P T L R E W I S F C G G K (Biotina)). O péptido foi pré-incubado com estreptavidina em RPMI isento de soro tamponado com HEPES a uma proporção molar de 4:1. O complexo foi testado quanto à estimulação da proliferação celular de células Ba/F3 transfectadas com TPO-R, como acima, em paralelo com o péptido biotinilado livre e o péptido não biotinilado parental. A Figura 2A apresenta os resultados do ensaio para o péptido biotinilado complexado (AF 12885 com estreptavidina (SA)) para as linhas de células transfectadas e parentais. A Figura 2B apresenta os resultados do ensaio para o péptido biotinilado livre (AF 12285) para as linhas de células transfectadas e parentais. A Figura 2C apresenta os resultados do ensaio para a estreptavidina isolada para as linhas de células transfectadas e parentais. Estas Figuras ilustram que o complexo pré-formado foi aproximadamente 10 vezes tão potente como o péptido livre.

A especificidade da ligação e actividade dos péptidos da invenção foi também examinada através do estudo da reactividade cruzada dos péptidos para o receptor da eritropoietina (EPO-R). A EPO-R é também um membro do receptor do factor de crescimento da família da hemato-poietina, como é TPO-R. Os péptidos da invenção, assim como TPO, EPO, e um péptido de ligação a EPO conhecido, foram examinados num ensaio de proliferação de células utilizando uma linha de células dependente de EPO. Este ensaio utilizou FDCP-1, uma linha de células haematopoiéticas

primitivas multi-potenciais de murino dependentes do factor de crescimento (ver, e.g., Dexter et al. *J. Exp. Med.* 152:1036-1047 (1981)) como a linha de células parental. Esta linha de células pode proliferar, mas não diferenciar-se quando suplementada com meio condicionado WEHI-3 (um meio que contém IL-3, número ATCC T1B68). A linha de células parental é transfectada com SPO-R humano ou de murino para produzir a linha de células DCP-1-EPO-R. Esta linha de células transfectada pode proliferar, mas não diferenciar-se na presença de EPO humano ou de murino.

As células foram cultivadas até metade da densidade estacionária na presença dos factores de crescimento necessários. As células são depois lavadas em PBS e mantidas em jejum durante 16-24 horas em meio total sem os factores de crescimento. Após determinar a viabilidade das células, as soluções de armazenamento (em meio total sem os factores de crescimento) são preparadas para cerca de 10^5 células por 50 microlitros. As diluições seriadas dos compostos (tipicamente, o péptido livre da fase da solução como oposição a um péptido ligado a fago ou a outra ligação ou péptido imobilizado) a serem testados são preparadas em placas de cultura de células de 96 poços para um volume final de 50 microlitros por poço. As células (50 microlitros) são adicionadas a cada poço e as células são incubadas durante 24-48 horas, ponto em que os controlos negativos devem morrer ou ficar quiescentes. A proliferação celular é depois medida por técnicas conhecidas na técnica, tais como um ensaio MTT.

As Figuras 3A-G apresentam os resultados de uma série de experiências de controlo que apresentam a actividade de TPO, os péptidos da presente invenção, EPO, e péptidos de ligação a EPO-R num ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectada com TPO-R e a sua correspondente linha parental, ou uma linha de células dependente de EPO e a sua correspondente linha parental. A Figura 3A apresenta os resultados para TPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectada com TPO-R e a sua correspondente linha parental. A Figura 3B apresenta os resultados para EPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células Ba/F3 transfectada com TPO-R e a sua correspondente linha parental. A Figura 3C apresenta os resultados para o péptido biotinilado complexado (AF 12285 com estreptavidina (SA)) e uma forma complexada de um péptido de ligação a EPO-R biotinilado (AF 11505 com SA) numa linha de células Ba/F3 transfectada com TPO-R. Os resultados para a correspondente linha de células parental são apresentados na Figura 3D. A Figura 3E apresenta os resultados para TPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células dependente de EPO. A Figura 3F apresenta os resultados para EPO no ensaio de proliferação de células utilizando a linha de células dependente de EPO. A Figura 3G apresenta os resultados para o péptido biotinilado complexado (AF 12285 com estreptavidina (SA)) e a forma complexada de um péptido de ligação a EPO-R biotinilado (AF 11505 com SA) na linha de células dependente de EPO. Estes resultados mostram que os

péptidos da invenção se ligam e activam o TPO-R com um elevado grau de especificidade.

IV. PREPARAÇÃO DE PÉPTIDOS E MIMÉTICOS DE PÉPTIDOS

A. SÍNTESE DE FASE SÓLIDA

Os péptidos da invenção podem ser preparados por métodos clássicos conhecidos na técnica, por exemplo, utilizando técnicas convencionais de fase sólida. Os métodos convencionais incluem síntese de fase sólida exclusiva, métodos de síntese de fase sólida parcial, condensação de fragmentos, síntese clássica em solução, e mesmo por tecnologia de DNA recombinante. Ver, e.g., Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963). Em fase sólida, a síntese é tipicamente iniciada a partir da extremidade C-terminal do péptido utilizando uma resina com protecção alfa-amino. Pode ser preparado um material de partida adequado, por exemplo, por ligação do alfa-aminoácido necessário a uma resina clorometilada, uma resina de hidroximetilo, ou uma resina de benzidrilamina. Uma destas resinas clorometilada é comercializada sob o nome comercial de BIO-BEADSSX-1 por BioRad Laboratories, Richmond, CA. e a preparação da resina de hidroximetilo é descrita por Bodonszky *et al. Chem. Ind. (Londres)* 38:1597 (1966). A resina benzidrilamina (BHA) foi descrita por Pietta e Marshall *Chem. Commun.* 650 (1970) e está comercialmente disponível em Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, na forma de cloridrato.

Deste modo, os compostos da invenção podem ser preparados por acoplamento de um aminoácido alfa-amino protegido com a resina clorometilada com o auxílio de, por exemplo, o catalizador bicarbonato de céσιο, de acordo com o método descrito por Gisin *Helv. Chim. Acta.* 56:1467 (1973). Após o acoplamento inicial, o grupo de protecção alfa-amino é removido pela escolha de reagentes incluindo soluções de ácido trifluoroacético (TFA) ou ácido clorídrico (HCl) em solventes orgânicos à temperatura ambiente.

Os grupos de protecção do alfa-amino são os conhecidos como sendo úteis na técnica de síntese de péptidos passo a passo. Estão incluídos grupos de protecção do tipo acilo (e.g., formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos de protecção aromáticos do tipo uretano (e.g. benziloxicarbóilo (Cbz) e Cbz substituído), grupos de protecção uretano alifático (e.g., t-butiloxicarbonilo (Boc), isopropiloxicarbonilo, ciclo-hexiloxicarbonilo) e grupos de protecção do tipo alquilo (e.g., benzilo, trifenilmetilo). Boc e Fmoc são grupos de protecção preferidos. O grupo de protecção da cadeia lateral permanece intacto durante o acoplamento e não é separado durante a desprotecção do grupo de protecção do terminal amino ou durante o acoplamento. O grupo de protecção da cadeia lateral deve ser removível após estar completa a síntese do péptido final e sob condições de reacção que não alteram o péptido alvo. Os grupos de protecção da cadeia lateral para Tyr incluem tetra-hidropiraniilo, *terc*-butilo, tritilo, benzilo, Cbz, Z-Br-Cbz, e 2,5-diclorobenzilo. Os grupos de protecção da cadeia

lateral para Asp incluem benzilo, 2,6-diclorobenzilo, metilo, etilo, e ciclo-hexilo. Os grupos de protecção da cadeia lateral para Thr e Ser incluem acetilo, benzoílo, tritilo, tetra-hidropiraniolo, benzilo, 2,6-diclorobenzilo, e Cbz. O grupo de protecção da cadeia lateral para Thr e Ser é benzilo. Os grupos de protecção da cadeia lateral para Arg incluem nitro, Tosilo (Tos), Cbz, adamantiloxicarbonilmesitoilsulfonilo (Mts), ou Boc. Os grupos de protecção da cadeia lateral para Lys incluem Cbz, 2-clorobenziloxicarbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromobenziloxicarbonilo (2-BrCbz), Tos, ou Boc.

Após remoção do grupo de protecção alfa amino, os restantes aminoácidos protegidos estão acoplados passo a passo pela ordem desejada. Um excesso de cada aminoácido protegido é geralmente utilizado com um grupo carboxilo activador apropriado tal como diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em solução, por exemplo, em misturas de cloreto de metileno (CH_2Cl_2), dimetilformamida (DMF).

Após estar completa a sequência de aminoácidos desejada, o péptido desejado é desacoplado do suporte da resina por tratamento com um reagente tal como ácido trifluoroacético e fluoreto de hidrogénio (HF), que não só cliva o péptido a partir da resina, mas também cliva todos os restantes grupos de protecção das cadeias laterais. Quando é utilizada a resina clorometilada, o tratamento com fluoreto de hidrogénio resulta na formação dos ácidos do péptido livre. Quando é utilizada a resina

benzidrilamina, o tratamento com fluoreto de hidrogénio resulta directamente na amida do péptido livre. Alternativamente, quando é empregue a resina clorometilada, o péptido de cadeia lateral protegida pode ser desacoplado por tratamento da resina do péptido com amónia para produzir a desejada amida protegida pelas cadeias laterais ou com uma alquilamina para produzir uma alquilamida ou dialquilamida de cadeia lateral protegida. A protecção da cadeia lateral é depois removida da forma normal por tratamento com fluoreto de hidrogénio para produzir as amidas livres, alquilamidas, ou dialquilamidas.

Estes procedimentos de síntese de péptidos em fase sólida são bem conhecidos na técnica e posteriormente descritos em Stewart Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman e Co., San Francisco, (1969)).

Utilizando o sistema "biblioteca de sintéticos codificados" ou "síntese de polímero imobilizado em muito larga escala" descritos na Série de Pedido de Patente U.S. N°07/492 462, de 7 de Março de 1990; 07/624 120, de 6 de Dezembro de 1990; e 07/805 727 de 6 de Dezembro de 1991; não se pode determinar apenas o tamanho mínimo de um péptido com esta actividade, pode também produzir-se todos os péptidos que formam o grupo de péptidos que diferem do motivo preferido (ou do tamanho mínimo desse motivo) em um, dois, ou mais resíduos. Esta colecção de péptidos pode depois ser pesquisada quanto à capacidade para se ligarem a TPO-R. Este sistema de síntese de polímero imobilizado ou

outros métodos de síntese de péptidos podem também ser utilizados para sintetizar análogos truncados e análogos de deleção e análogos de combinação de truncagem e deleção de todos os compostos péptidos da invenção.

B. AMINOÁCIDOS SINTÉTICOS

Estes procedimentos podem também ser utilizados para sintetizar péptidos em que os aminoácidos para além dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, geneticamente codificados, são substituídos em uma, duas, ou mais posições de qualquer dos compostos da invenção. Por exemplo, naftilalanina pode ser substituído por triptofano, facilitando a síntese. Outros aminoácidos sintéticos que podem ser substituídos nos péptidos da presente invenção incluem L-hidroxi-propilo, L-3,4-di-hidroxifenilalanilo, d aminoácidos tais como L-d-hidroxisililo e D-d-metilalanilo, L-a-metilalanilo, b aminoácidos, e isoquinolilo. Os D aminoácidos e os aminoácidos sintéticos que não ocorrem naturalmente podem também ser incorporados nos péptidos da presente invenção.

Podem substituir-se as cadeias laterais que ocorrem naturalmente dos 20 aminoácidos geneticamente codificados (ou D aminoácidos) com outras cadeias laterais, por exemplo com grupos tais como alquilo, alquilo inferior, alquilo cíclico de 4, 5, 6, a 7 membros, amida, amida alquilo inferior, amida ci(alquilo inferior), alcoxilo inferior, hidroxilo, carboxilo e os seus derivados de éster

inferior, e heterocíclicos de 4, 5, 6, a 7 membros. Em particular, podem ser empregues análogos da prolina em que o tamanho do anel do resíduo de prolina é alterado de 5 membros para 4, 6, ou 7 membros. Os grupos cíclicos podem ser saturados ou insaturados, e se insaturados, podem ser aromáticos ou não-aromáticos.

Os grupos cíclicos podem ser saturados ou insaturados, e se insaturados, podem ser aromáticos ou não aromáticos. Os grupos heterocíclicos contêm preferencialmente um ou mais heteroátomos de azoto, oxigénio, e/ou enxofre. Exemplos destes grupos incluem o furazanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (e.g. morfolino), oxazolilo, piperazinilo (e.g. 1-piperazinilo), piperidilo (e.g. 1-piperidilo, piperidino), piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (e.g. 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tiomorfolinilo (e.g. tiomorfolino), e triazolilo. Estes grupos heterocíclicos podem ser substituídos ou não substituídos. Quando um grupo é substituído, o substituinte pode ser alquilo, alcóxilo, halogénio, oxigénio, ou fenilo substituído ou não substituídos.

Podem-se também, rapidamente, modificar os péptidos da presente invenção por fosforilação, e outros métodos para tornar os derivados de péptido dos compostos da presente invenção são descritos em Hruby *et al.*⁴² Deste

modo, os compostos péptido da invenção também servem como uma base para preparar miméticos de péptidos com actividade biológica semelhante.

Os compostos péptidos da invenção, incluindo peptidomiméticos, podem ser covalentemente modificados num ou mais de uma variedade de polímeros não proteicos, e.g., polietilenoglicol, polipropilenoglicol, ou polioxialquenos, da forma apresentada na Patente U.S. N° 4 640 835; Patente U.S. N° 4 496 689; Patente U.S. N° 4 301 144; Patente U.S. N° 4 670 417; Patente U.S. N° 4 791 192) ou Patente U.S. N° 4 179 337.

C. MODIFICAÇÕES TERMINAIS

Os especialistas na técnica reconhecem que estão disponíveis várias técnicas para a construção de miméticos de péptidos com a mesma actividade biológica desejada ou semelhante como o correspondente composto péptido mas com uma actividade mais favorável do que a do péptido em relação a solubilidade, estabilidade, e susceptibilidade a hidrólise e proteólise. Ver, por exemplo, Morgan e Gainor *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252 (1989). O que se segue descreve métodos para preparar miméticos de péptidos modificados no grupo amina N-terminal, no grupo carboxilo C-terminal, e/ou alterando uma ou mais das ligações amida no péptido para uma ligação não amida. É entendido que duas ou mais destas modificações podem ser acopladas na estrutura do mimético do péptido (e.g., modificação do

grupo carboxilo C-terminal e inclusão de uma ligação $-CH_2-$ carbamato entre dois aminoácidos no péptido).

1. MODIFICAÇÕES N-TERMINAIS

Os péptidos são tipicamente sintetizados como o ácido livre mas, como notado acima, podem ser rapidamente preparados como uma amida ou éster. Pode também modificar-se o terminal amino e/ou carboxílico dos compostos péptido da invenção para produzir outros compostos da invenção. As modificações do terminal amino incluem metilação (*i.e.*, $-NHCH_3$ ou $-NH(CH_3)_2$), acetilação, adição de um grupo carbobenzoílo, ou bloqueamento do terminal amino com qualquer grupo de bloqueamento contendo uma funcionalidade carboxilato definida por $RCOO-$, em que R é seleccionado a partir do grupo consistindo em naftilo, acridinilo, esteroidilo, e grupos semelhantes. As modificações do terminal carboxilo incluem a substituição do ácido livre por um grupo carboxamida ou a formação de uma lactama cíclica no terminal carboxílico para introduzir restrições estruturais.

As modificações do terminal amino são como recitado acima e incluem alquilação, acetilação, adição de um grupo carbobenzoílo, formação de um grupo succinimida, etc. Especificamente, o grupo amino N-terminal pode depois ser feito reagir como se segue:

(a) para formar um grupo amida de fórmula $RC(O)NH-$ em

que R é como definido acima por reacção com um haleto ácido [e.g., RC(O)Cl] ou anidrido ácido. Tipicamente, a reacção pode ser conduzida colocando em contacto quantidades aproximadamente equimolares ou em excesso (e.g., cerca de 5 equivalentes) de um haleto ácido com o péptido num diluente inerte (e.g., diclorometano) preferencialmente contendo um excesso (e.g., cerca de 10 equivalentes) de uma amina terciária, tal como diisopropiletilamina, para eliminar o ácido produzido durante a reacção. As condições de reacção são, de outro modo, convencionais (e.g., temperatura ambiente durante 30 minutos). A alquilação do terminal amino para proporcionar uma N-substituição por um alquilo inferior seguida por reacção com um haleto ácido, como descrito acima, proporcionará um grupo N-alquilamida da fórmula RC(O)NR- ;

(b) para formar um grupo succinimida por reacção com anidrido succínico. Como anteriormente, pode ser empregue uma quantidade aproximadamente equimolar ou um excesso de anidrido succínico (e.g., cerca de 5 equivalentes) e o grupo amino é convertido na succinimida através de métodos bem conhecidos na técnica incluindo a utilização de um excesso (e.g., dez equivalentes) de uma amina terciária tal como diisopropiletilamina num solvente inerte adequado (e.g., diclorometano). Ver, por exemplo, Wollenberg, *et al.*, Patente U.S. N° 4 612 132. É entendido que o grupo succínico pode ser substituído por, por exemplo, alquilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ ou substituintes

-SR que são preparados de uma forma convencional para proporcionar succinimida substituída no terminal N do péptido. Estes substituintes alquilo são preparados por reacção de uma olefina inferior (C_2-C_6) com anidrido maleico da forma descrita por Wollenberg, *et al.*, *supra.* e os substituintes -SR são preparados por reacção de RSH com anidrido maleico em que R é como definido acima;

(c) para formar um benziloxicarbonil-NH- ou um grupo benziloxicarbonil-NH- substituído por reacção com aproximadamente uma quantidade equivalente ou um excesso de CBZ-Cl (*i.e.*, cloreto de benziloxicarbonilo) ou um CBZ-Cl substituído num diluente inerte adequado (*e.g.*, diclorometano) preferencialmente contendo uma amina terciária para eliminar o ácido produzido durante a reacção;

(d) para formar um grupo sulfonamida por reacção com uma quantidade equivalente ou um excesso (*e.g.*, 5 equivalentes) de $R-S(O)_2Cl$ num diluente inerte adequado (diclorometano) para converter a amina terminal numa sulfonamida em que R é como definido acima. Preferencialmente, o diluente inerte contém amina terciária excesso (*e.g.*, dez equivalentes) tal como diisopropiletilamina, para eliminar o ácido produzido durante reacção. As condições de reacção são, de outro modo, convencionais (*e.g.*, temperatura ambiente durante 30 minutos);

(e) para formar um grupo carbamato por reacção com uma quantidade equivalente ou um excesso (e.g., 5 equivalentes) de $R-OC(O)Cl$ ou $R-OC(O)OC_5H_4-p-NO_2$ num diluente inerte adequado (e.g., diclorometano) para converter a amina terminal num carbamato em que R é como definido acima. Preferencialmente, o diluente inerte contém um excesso (e.g., cerca de 10 equivalentes) de uma amina terciária, tal como diisopropiletilamina, para eliminar qualquer ácido produzido durante reacção. As condições de reacção são, de outro modo, convencionais (e.g., temperatura ambiente durante 30 minutos); e

(f) para formar um grupo ureia por reacção com uma quantidade equivalente ou um excesso (e.g., 5 equivalentes) de $R-N=C=O$ num diluente inerte adequado (e.g., diclorometano) para converter a amina terminal numa ureia (i.e., grupo $RNHC(O)NH-$) em que R é como definido acima. Preferencialmente, o diluente inerte contém um excesso (e.g., cerca de 10 equivalentes) de uma amina terciária, tal como diisopropiletilamina. As condições de reacção são, de outro modo, convencionais (e.g., temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos).

2. MODIFICAÇÕES C-TERMINAIS

Na preparação de miméticos de péptidos em que o grupo carboxilo C-terminal é substituído por um éster

(i.e., $-C(O)OR$ em que R é como definido acima), são empregues as resinas utilizadas para preparar os ácidos de péptido, e o péptido protegido na cadeia lateral é clivado com base e o álcool apropriado, e.g., metanol. Os grupos de protecção de cadeia lateral são depois removidos de modo habitual por tratamento com fluoreto de hidrogénio para obter o éster desejado.

Na preparação de miméticos de péptidos em que o grupo carboxilo C-terminal é substituído pela amida $-C(O)NR^3R^4$, a resina benzidrilamina é utilizada como o suporte sólido para a síntese do péptido. Após a finalização da síntese, o tratamento com fluoreto de hidrogénio para libertar o péptido a partir do suporte resulta directamente na amida livre de péptido (i.e., o C-terminal é $-C(O)NH_2$). Alternativamente, a utilização da resina clorometilada durante a síntese do péptido acoplada com a reacção com amónia para clivar o péptido protegido na cadeia lateral a partir do suporte produz o a amida livre de péptido livre e a reacção com uma alquilamina ou uma dialquilamina produz uma alquilamida ou dialquilamida protegida na cadeia lateral (i.e., o C-terminal é $-C(O)NRR^1$ em que R e R^1 são como definido acima). A protecção da cadeia lateral é depois removida da forma habitual por tratamento com fluoreto de hidrogénio para produzir as amidas, alquilamidas, ou dialquilamidas livres.

Noutra forma de realização alternativa, o grupo carboxilo C-terminal ou um éster C-terminal pode ser induzido para

ciclizar por deslocação interna do -OH ou do éster (-OR) do grupo carboxilo ou éster, respectivamente com o grupo amino N-terminal para formar um péptido cíclico. Por exemplo, após síntese e clivagem para produzir o ácido de péptido, o ácido livre é convertido num éster activado por um activador de grupo carboxilo apropriado, tal como diciclohexilcarbodiimida (DCC) em solução, por exemplo, em misturas de cloreto de metileno (CH_2Cl_2), dimetil formamida (DMF). O péptido cíclico é depois formado por deslocação interna do éster activado com a amina N-terminal. A ciclização interna como oposta à polimerização pode ser aumentada por utilização de soluções muito diluídas. Esses métodos são bem conhecidos na técnica.

Podem também ciclizar-se os péptidos da invenção, ou incorporar um resíduo desamino ou descarboxilo nos terminais do péptido, de modo a que não existe nenhum grupo terminal amino ou carboxilo, para diminuir a susceptibilidade a proteases ou para restringir a conformação do péptido. Os grupos funcionais C-terminais dos compostos da presente invenção incluem amida, amida alquilo inferior, amida di(alquilo inferior), alcoxilo inferior, hidroxilo, e carboxilo, e derivados éster inferior destes, e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

D. MODIFICAÇÕES DE ESTRUTURA

São descritos outros métodos para produzir derivados de péptido dos compostos da presente invenção em

Hruby *et al.* *Biochem J.* 268(2):299-262 (1990). Deste modo, os compostos de péptido da invenção também servem como modelos estruturais para compostos não peptídicos com semelhante actividade biológica. Os especialistas na técnica reconhecem que estão disponíveis uma variedade de técnicas para construir compostos com a mesma actividade biológica desejada, ou semelhante, como o composto péptido inicial, mas com mais actividade favorável do que o inicial, em relação a solubilidade, estabilidade, e susceptibilidade à hidrólise e proteólise. Ver Morgan e Gainor *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252 (1989). Estas técnicas incluem substituir a estrutura peptídica com uma estrutura composta por fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, amins secundárias, e N-metilaminoácidos.

Miméticos de péptido em que uma ou mais das ligações peptidilo [-C(O)NH-] foram substituídas por ligações como uma ligação -CH₂-carbamato, uma ligação fosfonato, uma ligação -CH₂-sulfonamida, uma ligação ureia, uma ligação de amina secundária (-CH₂NH-), e uma ligação peptidilo alquilada [-C(O)NR⁶- em que R⁶ é alquilo inferior] são preparados durante a síntese de péptido convencional substituindo meramente um análogo de aminoácido protegido adequadamente para o reagente aminoácido no ponto apropriado durante a síntese.

Reagentes adequados incluem, por exemplo, análogos de aminoácido, em que o grupo carboxilo do aminoácido foi substituído com uma parte adequada para

formar uma das ligações acima. Por exemplo, se é desejável substituir uma ligação $-C(O)NR-$ no péptido com uma ligação $-CH_2$ -carbamato ($-CH_2OC(O)NR-$), depois do grupo carboxilo ($-COOH$) de um aminoácido adequadamente protegido é primeiro reduzido no grupo $-CH_2OH$, que é depois convertido através de métodos convencionais, numa funcionalidade $-OC(O)Cl$ ou numa funcionalidade para-nitrocarbonato $-OC(O)O-C_6H_4-p-NO_2$. A reacção de qualquer um dos grupos funcionais com a amina livre ou uma amina alquilada no terminal N do péptido parcialmente fabricado, encontrado no suporte sólido conduz à formação de uma ligação $-CH_2OC(O)NR-$. Para uma descrição mais detalhada da formação dessas ligações $-CH_2$ -carbamato, ver Cho *et al.*, *Science*, 261:1303-1305 (1993).

De um modo semelhante, a substituição de uma ligação amido no péptido com uma ligação fosfonato pode ser conseguida do modo apresentado nos Pedido de Patente U.S. com os N°s de Série 07/943 805, 08/081 577, e 08/119 700.

A substituição de uma ligação amido no péptido por uma ligação $-CH_2$ -sulfonamida pode ser conseguida reduzindo o grupo carboxilo ($-COOH$) de um aminoácido adequadamente protegido no grupo $-CH_2OH$ e o grupo hidroxilo é depois convertido num grupo de saída adequado, tal como um grupo tosilo através de métodos convencionais. A reacção do derivado tosilado com, por exemplo, ácido tioacético, seguido por hidrólise e cloração oxidativa irá proporcionar o grupo funcional $-CH_2-S(O)_2Cl$ que substitui o grupo carboxilo do aminoácido, de outro modo adequadamente

protegido. A utilização deste análogo de aminoácido adequadamente protegido na síntese de péptido proporciona a inclusão de uma ligação $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{NR}-$, que substitui a ligação amido no péptido conseqüentemente proporcionando um mimético de péptido. Para uma descrição mais completa na conversão do grupo carboxilo do aminoácido num grupo $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{Cl}$, ver, por exemplo, Weinstein, Boris *Chemistry & Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* Vol. 7, pp. 267-357, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque (1983).

Ligações amina secundárias em que uma ligação $-\text{CH}_2\text{NH}-$ substitui a ligação amido no péptido podem ser preparadas empregando, por exemplo, um análogo de dipéptido adequadamente protegido, em que a ligação carbonilo da ligação amido foi reduzida num grupo CH_2 através de métodos convencionais. Por exemplo, no caso da diglicina, a redução da amida em amina irá produzir, após desprotecção de $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$, que é depois utilizado na forma N-protegida na seguinte reacção de acoplamento. A preparação desses análogos por redução do grupo carbonilo da ligação amido no dipéptido é bem conhecida na técnica.

O análogo de aminoácido protegido adequadamente é empregue na síntese de péptidos convencional do mesmo modo como seria para o aminoácido correspondente. Por exemplo, tipicamente cerca de 3 equivalentes do análogo de aminoácido protegido são empregues nesta reacção. É empregue um diluente orgânico inerte, tal como cloreto de metileno ou DMF e, quando é produzido um ácido como produto colateral

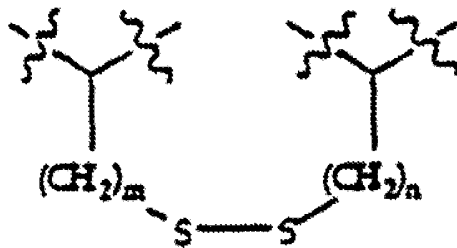
da reacção, um solvente da reacção contém tipicamente uma quantidade em excesso de uma amina terciária para eliminar o ácido produzido durante a reacção. Uma amina terciária particularmente preferida é diisopropiletilamina que é tipicamente empregue em cerca de 10 vezes de excesso. Os resultados da reacção na incorporação no mimético do péptido de um análogo de aminoácido possuindo uma ligação não peptidilo. Essa substituição pode ser repetida como desejado, de modo a que desde zero a todas as ligações amida no péptido foram substituídas por ligações não amida.

Pode também ciclizar-se os péptidos da invenção, ou incorporar um resíduo desamino ou descarboxilo nos terminais do péptido, de modo a que não exista nenhum grupo amino ou carboxilo terminal, para diminuir a susceptibilidade a proteases ou para restringir a conformação do péptido. Os grupos funcionais C-terminais dos compostos da presente invenção incluem amida, amida alquilo inferior, amida di(alquilo inferior), alcoxilo inferior, hidroxilo, e carboxilo, e os seus derivados de éster inferior, e os seus sais farmacologicamente aceitáveis. Exemplos de compostos ciclizados são proporcionados nas Tabelas 4, 5, 6, 8, e 9.

E. FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO DISSULFURETO

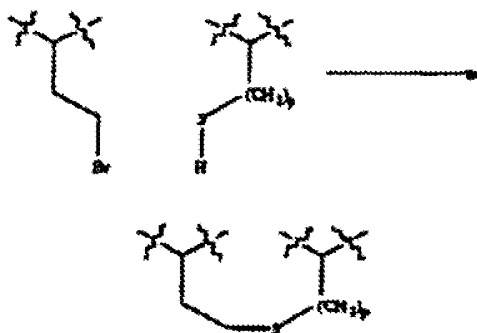
Os compostos da presente invenção podem existir numa forma ciclizada com uma ligação dissulfureto intramolecular entre os grupos tiol das cisteínas. Alternativamente, uma ligação dissulfureto intermolecular entre os

grupos tiol das cisteínas pode ser produzida para produzir um composto dimérico (ou oligomérico superior). Um ou mais dos resíduos de cisteína podem também ser substituídos com uma homocisteína. Estes derivados dissulfureto intramoleculares ou intermoleculares podem ser reapresentados esquematicamente, como apresentado abaixo:



em que m e n são independentemente 1 ou 2.

Outras formas de realização desta invenção proporcionam análogos destes derivados dissulfureto em que um dos enxofres foi substituído por um grupo CH_2 ou outro isostero para enxofre. Estes análogos podem ser produzidos através de um deslocamento intramolecular ou intermolecular, utilizando métodos conhecidos na técnica como apresentado abaixo:



em que p é 1 ou 2. Um especialista na técnica será entenderá prontamente que esta deslocação também pode ocorrer utilizando outros homólogos de derivado de ácido amino- γ -butírico apresentado acima e homocisteína.

Alternativamente, o terminal amino do péptido pode ser protegido com um ácido acético substituído em alfa, em que o substituinte alfa é um grupo de saída, tal como um ácido α -haloacético, por exemplo, α -cloroacético, α -bromoacético, ou α -iodoacético. Os compostos da presente invenção podem ser ciclizados ou dimerizados através da deslocação do grupo de saída pelo enxofre do resíduo de cisteína ou homocisteína. Ver, e.g., Barker et al. *J. Med. Chem.* 35: 2040-2048 (1992) e Or et al. *J. Org. Chem.* 56:3146-3149 (1991). Exemplos de compostos dimerizados são proporcionados nas Tabelas 7, 9, e 10.

V. UTILIDADE

Os compostos da invenção são úteis *in vitro* como ferramentas únicas para compreender o papel biológico de TPO, incluindo a avaliação dos muitos factores que se pensam influenciar, e ser influenciados por, a produção de TPO e o processo de ligação ao receptor. Os presentes compostos são também úteis no desenvolvimento de outros compostos que se ligam a, e activam, o TPO-R, porque os presentes compostos proporcionam informação importante na relação entre estrutura e actividade que deve facilitar esse desenvolvimento.

Os compostos são também úteis como ligantes competitivos em ensaios para o rastreamento de novos agonistas do receptor de TPO. Nessas formas de realização de ensaio, os compostos da invenção podem ser utilizados sem modificação ou podem ser modificados numa variedade de formas; por exemplo, por marcação, tal como unindo covalentemente ou não covalentemente uma parte que proporciona directamente ou indirectamente um sinal detectável. Em qualquer destes ensaios, os materiais para isto podem ser marcados quer directamente ou indirectamente. Possibilidades para a marcação directa incluem grupos marcadores, tais como: marcadores radioactivos, tais como ^{125}I , enzimas (Patente US 3 645 090), tais como peroxidase e fosfatase alcalina, e marcadores fluorescentes (Patente U.S. N.º. 3 940 475) capazes de monitorizar a alteração na intensidade da fluorescência, desvio do comprimento de onda, ou polarização da fluorescência. Possibilidades para marcação indirecta incluem a biotinylação de um constituinte seguido por ligação a avidina acoplada a um dos grupos de marcação acima. Os compostos podem também incluir espaçadores ou ligantes em casos em que os compostos serão ligados a um suporte sólido.

Para além disso, com base na sua capacidade para se ligarem ao receptor de TPO, os péptidos da presente invenção podem ser utilizados como reagentes para detectar receptores de TPO em células vivas, células fixadas, em fluidos biológicos, em homogenatos de tecidos, em materiais biológicos naturais, purificados, etc. Por exemplo, pela

marcação desses péptidos, podem identificar-se células possuindo TPO-R nas suas superfícies. Adicionalmente, com base na sua capacidade para se ligarem ao receptor de TPO, os péptidos da presente invenção podem ser utilizados em coloração *in situ*, FACS (separação por tamanho de célula activada por fluorescência), transferência de Western, ELISA, etc. Adicionalmente, com base na sua capacidade para se ligarem ao receptor de TPO, os péptidos da presente invenção podem ser utilizados na purificação do receptor, ou na purificação de células que expressam os receptores de TPO na superfície celular (ou dentro de células permeabilizadas).

Os compostos da presente invenção também podem ser utilizados como reagentes comerciais para várias utilizações de investigação médica e de diagnóstico. Essas utilizações incluem, mas não estão limitadas a: (1) utilização como um padrão de calibração para quantificar as actividades de agonistas candidatos de TPOs numa variedade de ensaios funcionais; (2) utilização para manter a proliferação e crescimento de linhas de células dependentes de TPO; (3) utilização na análise estrutural do receptor de TPO através de co-cristalização; (4) utilização para investigar o mecanismo de transdução do sinal de TPO/activação do receptor; e (5) outras aplicações de investigação e diagnóstico, em que o receptor de TPO é preferencialmente activado ou essa activação é convenientemente calibrada contra a quantidade conhecida de um agonista de TPO, e semelhantes.

Os compostos da presente invenção podem ser utilizados para a expansão *in vitro* de megacariócitos e seus progenitores dedicados, ambos em conjunção com citocinas adicionais ou isoladamente. Ver, e.g., DiGiusto *et al.* Publicação PCT N°. 95/05843. As terapêuticas de quimioterapia e radiação provocam trombocitopenia matando a população madura, em rápida divisão, de megacariócitos. Contudo, estes tratamentos terapêuticos pode também reduzir o número e viabilidade das células precursoras menos mitoticamente activas de megacariócito imaturo. Deste modo, o melhoramento de trombocitopenia por TPO ou os compostos da presente invenção podem ser apressados por doentes infundidos após quimioterapia ou terapia por radiação com uma população das suas próprias células enriquecidas para megacariócitos e precursores imaturos por cultura *in vitro*.

Os compostos da invenção também podem ser administrados a animais de sangue quente, incluindo humanos, para activar o TPO-R *in vivo*. Deste modo, a presente invenção é útil em métodos para tratamentos terapêuticos de distúrbios relacionados com TPO, que compreendem administrar um composto da invenção em quantidades suficientes para mimetizar o efeito de TPO em TPO-R *in vivo*. Por exemplo, os péptidos e compostos da invenção podem ser administrados para tratar uma variedade de distúrbios hematológicos, incluindo, mas não limitados a distúrbios de plaquetas e trombocitopenia, particularmente quando associadas a transfusões de medula óssea, terapia por radiação, e quimioterapia.

Os antagonistas de TPO podem ser primeiro administrados a doentes submetidos a quimioterapia ou terapia por radiação, seguido pela administração dos agonistas de tpo da invenção.

A actividade dos compostos da presente invenção pode ser avaliada quer *in vitro* ou *in vivo* num de vários modelos descritos em McDonald *Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology* 14:8-21 (1992).

De acordo com uma forma de realização, as composições da presente invenção são úteis para o tratamento de trombocitopenia associado a transfusões de medula óssea, terapia por radiação, ou quimioterapia. Os compostos tipicamente serão administrados profilacticamente antes de quimioterapia, terapia por radiação, ou transplante de medula óssea, ou após essa exposição.

De acordo com o exposto, a presente invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo, como um ingrediente activo, pelo menos um dos péptidos ou miméticos de péptidos da invenção em associação com um veículo ou diluente farmacêutico. Os compostos desta invenção podem ser administrados por vias de administração oral, pulmonar, parentérica (injecção intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) ou subcutânea), inalação (através de uma formulação de pó fino), transdérmica, nasal, vaginal, rectal, ou sublingual, e podem ser formulados em formas de dosagem apropriadas para cada via de adminis-

tração. Ver, e.g., Bernstein *et al.* Publicação de Patente PCT N°. WO93/25221; Pitt *et al.* Publicação de Patente PCT N°. WO94/17784; e Pitt *et al.* Pedido de Patente Europeia 613 683.

Formas de dosagem sólida para administração oral incluem cápsulas, comprimidos, pílulas, pós, e grânulos. Nessas formas de dosagem sólida, o composto activo é misturado com pelo menos um veículo inerte farmacologicamente aceitável, tal como sacarose, lactose, ou amido. Essas formas de dosagem também podem compreender, como é prática normal, substâncias adicionais diferentes de diluentes inertes, e.g., agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio. No caso de cápsulas, comprimidos, e pílulas, as formas de dosagem podem também compreender agentes tamponantes. Os comprimidos e pílulas podem também ser preparados com revestimentos entéricos.

Formas de dosagem líquida para administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes farmacologicamente aceitáveis, com os elixires contendo diluentes inertes normalmente utilizados na técnica, tais como água. Além desses diluentes inertes, as composições podem também incluir adjuvantes, tais como agentes humidificantes, agentes emulsificantes e de suspensão, e agentes adoçantes, aromatizantes, e perfumantes.

Preparações de acordo com esta invenção para administração parentérica incluem soluções aquosas ou não

aquosas, suspensões, ou emulsões estéreis. Exemplos de solventes ou veículo não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite e óleo de milho, gelatina, e ésteres orgânicos injectáveis, tais como oleato de etilo. Essas formas de dosagem podem também conter adjuvantes, tais como agentes de conservação, humedecimento, emulsificação, e dispersão. Eles podem ser esterilizados por, por exemplo, filtração através de um filtro de retenção de bactérias, por incorporação de agentes de esterilização nas composições, por irradiação das composições, ou por aquecimento das composições. Eles também podem ser fabricados utilizando água estéril, ou outro meio injectável estéril, imediatamente antes da utilização.

Composições para administração rectal ou vaginal são preferencialmente supositórios que podem conter, adicionalmente à substância activa, excipientes tais como manteiga de cacau ou uma cera de supositório. Composições para administração nasal ou sublingual são também preparadas com excipientes convencionais bem conhecidos na técnica.

As composições contendo os compostos podem ser administradas para tratamentos profilácticos e/ou terapêuticos. Em aplicações terapêuticas, as composições são administradas a um doente que já sofre da doença, como descrito acima, numa quantidade suficiente para curar, ou pelo menos parar parcialmente os sintomas da doença e suas

complicações. Uma quantidade adequada para realizar isto é definido como "dose terapeuticamente eficaz". Quantidades eficazes for esta utilização irá depender da gravidade da doença e do peso e estado geral do doente.

As composições da invenção também podem ser microencapsuladas através de, por exemplo, o método de Tice e Bibi (em *Treatise on Controlled Drug Delivery*, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, N.Y. (1992), pp. 315-339).

Em aplicações profilácticas, composições contendo os compostos da invenção são administrados a um doente susceptível de, ou de outro modo em risco de, uma doença particular. Uma tal quantidade é definida como sendo uma "dose profilacticamente eficaz". Nesta utilização, as quantidades precisas dependem novamente do estado de saúde e do peso do doente.

As quantidades do agonista de TPO necessárias para terapia eficaz dependerão de muitos factores diferentes, incluindo meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do doente, e outros medicamentos administrados. Deste modo, as dosagens de tratamento devem ser tituladas para otimizar segurança e eficácia. Tipicamente, as dosagens utilizadas *in vitro* podem proporcionar guias úteis nas quantidades úteis para administração *in situ* destes reagentes. O teste de animais de doses eficazes para o tratamento de distúrbios particulares irá proporcionar outra indicação de previsão de dosagem humana.

Várias considerações são descritas, e.g., em Gilman *et al.* (eds), Goodman and Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^a ed., Pergamon Press (1990); e Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 7^a ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1985).

Os péptidos e miméticos de péptidos desta invenção são eficazes no tratamento de estados mediados por TPO quando administrados num intervalo de dosagem desde cerca de 0,001 mg até cerca de 10 mg/kg de peso corporal por dia. A dose específica empregue é regulada pelo estado particular a ser tratado, a via de administração, assim como pelo juízo do médico assistente, dependendo de factores tais como a gravidade do estado, a idade e o estado geral do doente, e semelhantes.

EXEMPLO 1

SÍNTESE DE PÉPTIDOS EM FASE SÓLIDA

Vários péptidos da invenção foram sintetizados utilizando as técnicas de síntese de fase sólida de Merrifield (Ver Steward e Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a. edição, Pierce Chemical, Rockford, IL (1984) e Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963)) num instrumento automatizado Milligen/Biosearch 9600 ou um sintetizador de péptidos Applied Biosystems Inc. Modelo 431A. Os péptidos foram montados utilizando protocolos convencionais de Applied Biosystems Inc. System Software

versão 1.01. Cada acoplamento foi efectuado durante uma-duas horas com BOP (hexafluorofosfato de benzotriazolil N-oxtrisdimetilamino-fosfónio) e HOBt (1-hidroxibenzo-triazole).

A resina utilizada foi resina HMP ou PAL (Milligen/Biosearch), que é uma resina de poliestireno de ligação reticulada com ácido 5-(4'-Fmoc-aminometil-3,5'-dimetioxi)fenóxi)valérico como um ligante. A utilização de resina PAL resulta numa funcionalidade amida carboxil terminal após clivagem do péptido a partir da resina. Após clivagem, a resina HMP produz uma parte de ácido carboxílico no terminal C do produto final. Mais reagentes, resinas, e aminoácidos protegidos (livres ou na resina) foram adquiridos a Millipore ou Applied Biosystems Inc.

O grupo Fmoc foi utilizado para protecção amina durante o procedimento de acoplamento. A protecção de amina primária de aminoácidos foi conseguida com Fmoc e grupos de protecção da cadeia lateral, que foram t-butilo para serina, tirosina, asparagina, ácido glutâmico, e treonina; tritilo para glutamina; Pmc (2,2,5,7,8-pentametil-cromasulfonato) para arginina; N-t-butiloxicarbonilo para triptofano; N-tritilo para histidina e glutamina; e S-tritilo para cisteína.

A remoção dos péptidos a partir da resina e desprotecção simultânea das funções de cadeia lateral foi conseguida por tratamento com reagente K ou ligeiras

modificações deste. Alternativamente, numa síntese de péptidos escolhidos, com um terminal carboxilo amidado, o péptido totalmente montado foi clivado com uma mistura de 90% de ácido trifluoroacético, 5% de etanoditiol, e 5% de água, inicialmente a 4 °C, e gradualmente aumentando até à temperatura ambiente. Os péptidos desprotegidos foram precipitados com éter dietílico. Em todos os casos, a purificação foi por cromatografia líquida de elevado desempenho preparativa, de fase reversa, numa coluna de sílica gel ligada a C19, com um gradiente de acetoni-trilo/água em ácido trifluoroacético a 0,1%. Os péptidos homogéneos foram caracterizados por Espectrometria de massa de Bombardeamento Atómico Fasc ou espectrometria de massa de electrospray e análise de aminoácidos quando aplicável.

EXEMPLO 2

BIOENSAIOS

A bioactividade dos péptidos pode ser medida utilizando um ensaio de proliferação de células dependente de trombopoietina. Células Ba/F3 dependentes de IL-3 de Murino foram transfectadas com TPO-R humano de comprimento total. Na ausência de IL-3 (meio condicionado WEHI-3), estas células são dependentes de TPO para a proliferação. A linha de células parentéricas, não transfectadas não respondem ao TPO humano, mas permanecem dependentes de IL-3.

Foram efectuados bioensaios em ambas as linhas de

células acima utilizando péptidos sintéticos derivados do rastreio da biblioteca. As células foram cultivadas em meio RPMI-10 completo, contendo meio condicionado WSHI-3 a 10%, depois lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em meio que não tinha meio condicionado WEHT-3, e adicionadas a poços contendo diluições de péptido ou TPO a 2×10^4 células/poço. As células foram incubadas durante 48 horas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5% de CO₂ e actividade metabólica foi ensaiada pela redução de MTT para formazan, com a absorvência a 570 nM medido num leitor de placas de ELISA. Os péptidos testados estimularam a proliferação de células 3a/F3 transfectadas com TPO-R num modo dependente da dose, como apresentado na Figura 1. Estes péptidos não têm efeito na linha de células parental.

EXEMPLO 3

AFINIDADE DE LIGAÇÃO

As afinidades de ligação de péptidos sintetizados quimicamente para TPO-R foram medidas num ensaio de competição de ligação. Os poços de uma placa de microtitulação foram revestidos com 1 mg de estreptavidina, bloqueada com PBS/BSA a 1%, seguido por 50 ng de anticorpo imobilizador anti-receptor biotinilado (Ab179). Os poços foram depois tratados com uma diluição 1:10 da recolha de TPO-R solúvel. Várias concentrações de péptido ou mimético do péptido foram misturadas com uma quantidade constante de uma forma truncada de TPO consistindo nos resíduos 1-156

fundidos com o terminal C de proteína de ligação a maltose (MBP-TPO₁₅₆). As misturas do péptido MBP-TPO₁₅₆ foram adicionadas aos poços revestidos com TPO-R, incubadas durante 2 horas a 4 °C e depois lavadas com PBS. A quantidade de MBP-TPO₁₅₆ que foi ligada em equilíbrio foi medida adicionando um anti-soro de coelho dirigido contra MBP, seguido por fosfatase alcalina conjugada com IgG anti-coelho de cabra. A quantidade de fosfatase alcalina em cada poço foi depois determinada utilizando métodos convencionais.

O ensaio é conduzido numa variedade de concentrações de péptido e os resultados são apresentados em gráfico, de modo a que o eixo dos y representa a quantidade de MBP-TPO₁₅₆ ligado e o eixo dos x representa a concentração de péptido ou mimético de péptido. Pode depois determinar-se a concentração a que o péptido ou mimético do péptido reduzirá em 50% (IC₅₀) a quantidade de MBP-TPO₁₅₆ ligado a TPO-R imobilizado. A constante de dissociação (K_d) para o péptido será semelhante à IC₅₀ medida utilizando as condições de ensaio descritas acima.

EXEMPLO 4

"PÉPTIDOS EM PLASMÍDEOS"

O vector pJS142 é utilizado para a construção de biblioteca e é apresentado na Figura 4. São necessárias três sequências de oligonucleótido para a construção da

biblioteca: ON-829 (5' ACC ACC TCC GG); ON-830 (5' TTA CTT AGT TA) e um oligonucleótido específico para a biblioteca de interesse (5' GA GGT GGT {NNK}_n TAA CTA AGT AAA GC), em que {NNK}_n representa uma região aleatória do comprimento e sequência desejados. Os oligonucleótidos podem ser fosforilados em 5' quimicamente durante a síntese ou após a purificação com cinase de polinucleótido. Eles são depois emparelhados a uma proporção molar de 1:1:1 e ligados ao vector.

A estirpe de *E. coli* que é preferencialmente utilizada para biosselecção possui o genótipo: $\Delta(srl-recA) endA1 nupG lon-11 sulA1 hsdR17 \Delta(ompT-fepC)266 \Delta clpA319$: : *kan* $\Delta lacI lac ZU118$ que pode ser preparada a partir de uma estirpe de *E. coli* a partir de *E. coli* Genetic Stock Center na Universidade de Yale (*E. coli* b/r, designação do stock do centro CGSC:6573) com o genótipo *lon-11 sulA1*. A estirpe de *E. coli* acima é preparada para utilização em electroporação como descrito por Dower *et al.* *Nucleic Acids Res.* 16:6127 (1988), excepto: que é utilizado glicerol a 10% para todos os passos de lavagem. As células são testadas quanto à eficiência utilizando 1 pg de um plasmídeo Bluescript (Stratagene). Estas células são utilizadas para o crescimento da biblioteca original e para amplificação da população enriquecida após cada ronda de biosselecção.

Os péptidos nos plasmídeos são libertados das células para biosselecção por digestão enzimática moderada da parede celular utilizando lisozima. Após sedimentação

dos resíduos celulares, o lisado bruto pode ser utilizado directamente na maioria dos receptores. Se é necessária alguma purificação adicional dos complexos de plasmídeo, pode ser utilizada uma coluna de filtração em gel para remover muitos dos contaminantes de baixo peso molecular no lisado bruto.

A biosselecção é realizada num tampão (HEKL) de uma concentração salina inferior à maioria dos tampões fisiológicos. A biosselecção pode ser realizada em poços de microtitulação com um receptor imobilizado num anticorpo monoclonal de não bloqueamento (MAb) ou por biosselecção em esferas ou em colunas. Mais especificamente, na primeira ronda de biosselecção. Podem ser utilizados 24 poços, cada um revestido com receptor. Para a segunda ronda, são tipicamente utilizados seis poços revestidos com receptor (amostra PAN) e 6 poços sem receptor (amostra NC). A comparação do número de plasmídeos nestas duas amostras pode dar uma indicação sobre se os clones específicos para o receptor estão a ser enriquecidos por biosselecção. O "enriquecimento" é definido como a proporção de transformantes de PAN em relação aqueles recuperados a partir da amostra NC. O enriquecimento de 10 vezes é normalmente uma indicação de que os clones específicos para o receptor estão presentes.

Nas últimas rondas de biosselecção, é útil reduzir a entrada de lisado nos poços para baixar a ligação de fundo não específica dos complexos de plasmídeo. Na

ronda 2, é normalmente utilizado 100 mL de lisado por poço. Na ronda 3, é utilizado 100 mL de lisado por poço diluído com 1/10 em HEKL/BSA. Para outras rondas de biosselecção, é utilizada tipicamente uma entrada de unidades de transformação de plasmídeo de, pelo menos, 1000 vezes acima da diversidade restante estimada.

As propriedades de ligação dos péptidos codificados por clones individuais são tipicamente examinadas após 3, 4, ou 5 rondas de biosselecção, dependendo dos números de enriquecimento observados. Tipicamente, é utilizada uma ELISA que detecta a ligação específica do receptor por proteínas de fusão do péptido LacI. LacI é normalmente um tetrâmero e a espécie de ligação ao DNA funcional mínimo é um dímero. Os péptidos são assim apresentados multivalentemente na proteína de fusão. Assumindo que uma densidade suficiente de receptor pode ser imobilizada em poços, os péptidos fundidos a LacI irão ligar-se à superfície de um modo cooperativo, multivalente. Esta ligação cooperativa permite a detecção de eventos de ligação de afinidade intrínseca baixa. A sensibilidade deste ensaio é uma vantagem em que os sucessos iniciais de baixa afinidade podem ser facilmente identificados, mas é uma desvantagem em que o sinal na ELISA não está correlacionado com a afinidade intrínseca dos péptidos. A fusão dos péptidos com a proteína de ligação a maltose (MBP), como descrita abaixo, permite testar num formato de ELISA em que força de sinal está melhor correlacionada com a afinidade. Ver Figura 5A-B.

O DNA dos clones de interesse pode ser preparado na forma de cadeia dupla utilizando qualquer procedimento de miniprep convencional. As sequências codificantes de clones isolados ou de populações de interesse podem ser transferidos para vectores que fundem as sequências em grelha com o gene que codifica MBP, uma proteína que geralmente ocorre como um monómero em solução. A clonagem de uma biblioteca em pJS142 cria um sítio de restrição *BspEI* próximo do início da região codificante aleatória da biblioteca.

A digestão com *BspEI* e *ScaI* permite a purificação de um fragmento de DNA de -900 pb que pode ser subclonada num de dois vectores, pELM3 (citoplásmico) ou pELM15 (periplásmico), que são modificações simples dos vectores pMALc2 e pMALp2, respectivamente, comercialmente disponível de New England Biolabs. Ver Figura 5A-B. A digestão de pELM3 e pELM15 com *AgeI* e *ScaI* permite a clonagem eficiente do fragmento *BspEI-ScaI* a partir da biblioteca em pJS142. As extremidades *BspEI* e *AgeI* são compatíveis para a ligação. Adicionalmente, a ligação correcta dos sítios *ScaI* é essencial para recriar um gene funcional *bla* (resistência a Amp), baixando assim o nível de clones de fundo de eventos de ligação não desejados. A expressão das fusões de péptido MBP conduzida pelo promotor *tac* pode depois ser induzida com IPTG.

Os lisados para as ELISAs de LacI ou MBP são

preparados a partir de clones individuais por células de lise utilizando lisozima e removendo resíduos de células insolúveis por centrifugação. Os lisados são depois adicionadas aos poços contendo receptor imobilizado e a poços de controlo sem receptor. A ligação por fusões de péptido LacI ou MBP é detectada por incubação com um anti-soro policlonal de coelho dirigido contra quer LacI ou MBP seguido por incubação com anticorpo secundário anti-coelho de cabra marcado com fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina marcada é detectada com substrato cromagénico fosfato de p-nicrofenilo.

EXEMPLO 5

SISTEMA DE "DÍMERO DE CAPACETE"

Uma variante da técnica de péptidos LacI-em-plasmídeos utiliza uma proteína de ligação a DNA denominada "dímero de capacete". O DNA que se liga pelo repressor lac de *E. coli* é mediado pelo domínio de "capacete" de aproximadamente 60 aminoácidos. O dímero dos domínios de capacete que se ligam ao operador lac é normalmente formado por associação do domínio C-terminal muito maior de aproximadamente 300 aminoácidos: O sistema de "dímero de capacete" utiliza moléculas de dímero de capacete contendo dois capacetes ligados através de um ligante de péptido curto. Estas proteínas ligam-se ao DNA com estabilidade suficiente para permitir a associação de um epitopo de péptido apresentado no terminal C do dímero de capacete com o plasmídeo que codifica esse péptido.

Os péptidos aleatórios são fundidos com o terminal C do dímero de capacete, que se liga com o plasmídeo que o codifica para produzir um complexo péptido-dímero de capacete-plasmídeo que pode ser rastreado por biosselecção. O sistema dímero de capacete péptidos-em-plasmídeos permite maior selectividade para os ligandos com mais elevada afinidade do que o sistema LacI. Deste modo, o sistema de dímero de capacete é útil para produzir bibliotecas de mutagénesis com base em sucessos de baixa afinidade iniciais, e seleccionar variantes de mais elevada afinidade do que essas sequências iniciais.

As bibliotecas são construídas como com péptidos em plasmídeos utilizando o vector de dímero de capacete pCMG14 (ver Figura 6A-C). A presença do operador *lac* não é necessária para a ligação de plasmídeo pela proteína de dímero de capacete. As bibliotecas foram introduzidas na estirpe bacteriana compreendendo *E. coli* (*lon-11 sulA1 hsdR17 (ompT-fepC) ΔclpA319::kan ΔlacI lac ZU118 Δ(srI-recA) 306::Tn10* e amplificado em condições de indução de promotor basal (A). A biosselecção de bibliotecas de dímero de capacete é realizada através de procedimentos semelhantes aos utilizados para bibliotecas LacI, excepto que é utilizado o tampão HEK em vez de tampão HEKL e a eluição de plasmídeos a partir de poços é efectuada com fenol aquoso em vez de com IPTG. As sequências da biosselecção do dímero de capacete são frequentemente

caracterizadas após transferência para o vector MBP, de modo que podem ser testadas na ELISA de MBP sensível à afinidade e também de modo a que as populações de clones podem ser rastreadas por levantamentos de colónias com receptor marcado.

EXEMPLO 6

Neste exemplo os compostos ciclizados foram sujeitos a três ensaios. Primeiro, os valores de IC₅₀ foram obtidos como descrito acima. Adicionalmente, foi efectuado um ensaio de proliferação de células MTT como descrito acima, para calcular os valores de EC₅₀. Finalmente, foi realizado um ensaio de microfisiómetro (Molecular Devices Corp.). Basicamente, neste ensaio foi determinada a taxa de acidificação do meio extracelular em resposta à estimulação do receptor de TPO pelos compostos da invenção. Os intervalos para EC₅₀ estão indicados simbolicamente como para IC₅₀ descritos acima. Os resultados estão resumidos na Tabela 4.

TABELA 4

Estrutura	EC50(nM) Proliferação	EC50(nM) Microorganismos	IC50 (nM)
$\begin{array}{c} \text{[H]} - (\text{Pen})\text{A} \text{---} \text{D} \text{---} \text{C} \text{---} \text{P} \text{---} \text{T} \text{---} \text{L} \text{---} \text{E} \text{---} \text{W} \text{---} \text{I} \text{---} \text{E} \text{---} \text{P} \text{---} (\text{Cys}) - (\text{NH}_2) \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \text{---} \text{-----} \text{S} \end{array}$	++	++	++

(continuação)

Estrutura	EC50(nM) Proliferação	EC50(nM) Microorganismos	IC50 (nM)
$\begin{array}{c} \text{[O=C-NH]} - \text{ADGFTLRWISF (Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} \text{[H]} - \text{(Homocys)} \text{ADGFTLRWISF (Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	++	++	ND
$\begin{array}{c} \text{[O=C-N]} - \text{ADGFTLRWISF} - \text{(Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array}$	+	++	++
$\begin{array}{c} \text{[H]} - \text{(D-Cys)} \text{ADGFTLRWISF (D-Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	+	++	ND
$\begin{array}{c} \text{[H]} - \text{(Cys)} \text{ADGFTLRWISF (D-Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	++	+	++
$\begin{array}{c} \text{[H]} - \text{(D-Pen)} \text{ADGFTLRWISF (D-Cys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	+	+	++
$\begin{array}{c} \text{[H]} - \text{(Homocys)} \text{ADGFTLRWISF (Homocys)} - \text{[NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \end{array}$	+	+	++

(continuação)

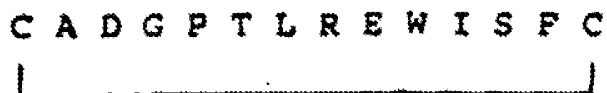
Estrutura	EC50(nM) Proliferação	EC50(nM) Microorganismos	IC50 (nM)
$\begin{array}{c} \text{[O=C-NH] - ADGFTLEWISF (Homocys) - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \text{-----S} \end{array}$	+	+	++
$\begin{array}{c} \text{[O=C-NH] - ADGFTLEWISF (Pen) - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \text{-----S} \end{array}$	+	+	++
$\begin{array}{c} \text{[O=C-NH] - ADGFTLEWISF (Cys) - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Ph-CH-----S} \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} \text{[H] - ADGFTLEWISFE - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH-C=O} \end{array}$	+	++	ND
$\begin{array}{c} \text{[H] - ADGFTLEWISFE - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{O=C-NH-----} \end{array}$	+	+	ND
$\begin{array}{c} \text{[O=C-NH] - ADGFTLEWISF (Cys) - [NH}_2\text{]} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{-----S} \end{array}$	++	+	ND

(continuação)

Estrutura	EC50(nM) Proliferação	EC50(nM) Microorganism.	IC50 (nM)
$\begin{array}{c} \text{[O}_2\text{C-NH]}-\text{ADGPTLEWISF(Cys)}-\text{[NH}_2\text{]} \\ \text{└──────────────────────────┘} \\ \text{S} \end{array}$	++	+	ND
$\begin{array}{c} \text{[HN]}-\text{ADGPTLEWISFE}-\text{[NH}_2\text{]} \\ \text{└──────────────────────────┘} \\ \text{C=O} \end{array}$	++	+	++
$\begin{array}{c} \text{[H]}-\text{(Pen)ADGPTLEWISF(Pen)}-\text{[NH}_2\text{]} \\ \text{┆} \qquad \qquad \qquad \text{┆} \\ \text{S} \qquad \qquad \qquad \text{S} \\ \text{└──────────────────────────┘} \end{array}$	++	+	ND

EXEMPLO 7

Neste exemplo os aminoácidos de substituição nas posições D, E, I, S, ou F no composto ciclizado



foram ensaiados para EC₅₀ e IC₅₀, valores como descritos acima. Os resultados de microfisiómetro são apresentados em parêntesis. Os resultados estão resumidos na Tabela 5 abaixo.

TABELA 5

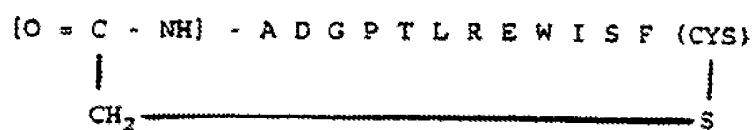
<u>CADGFTLRWISFC</u>		
Substituição	EC50(nM) Prolif. Celular	IC50(nM)
E - Q	++ (+)	++
D-A	+ (+)	++
I-A	+ (+)	+
S-A	++ (++)	++
S - D-Ala	+	+
S - Sar	+	++

Substituição	EC50(nM) Prolif. Celular	IC50(nM)
S - Alb	+++ (+)	++
S - D-Ser	++	++
S - Nva	+++ (+++)	++
S - Abu	++	++
S - (N-Me-Ala)	+	+
S - (N-Me-Val)	+	+
S - (N-Me-Ala)*	+	+
S - (Nor-Leu)	++	++
S - (t-Bu-Gly)	+	++
S - (N-Me-Ser(Bzl))		+
S - (Homoser)	ND	ND
S - (N-Me-Leu)	+	ND
F - A	++ (+)	++
F - D-Ala	+	++
F - D-Phe	+	++
F - Homo-Phe	+++ (+++)	++
F - CHA	+++ (+++)	++
F - Thi	++	++
F - (Ser(Bzl))	++	++
F - (N-Me-Ala)	+	+
F - (Phenylgly)	+++ (+++)	++
F - (Pyridylala)	++	++
F - (p-Nitrophe)	+++ (+++)	++
F - (3,4-di-Cl-Phe)	+++ (+++)	++
F - (p-Cl-Phe)	++	++
F - (2-Nal)	+++ (+++)	++
F - (1-Nal)	++	++
F - (DiPh-Ala)	++	++
F - (N-Me-Phe)	++	ND
S ₂ F - Ava (thioether)	+	++
S ₂ F - Ava (cys-cys)	+	++
S ₂ F - Ava	+	++
AD - deletion	++ (+)	ND
ADG - deletion	+	+

$\text{H}_2\text{N} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$
Ava =

EXEMPLO 8

Neste exemplo, os aminoácidos de substituição no composto



foram avaliados nas posições D, S, ou F como indicados na Tabela 6 abaixo. Os valores de EC₅₀ e de IC₅₀ foram calculados como descrito acima. Os resultados de microfisiómetro estão em parêntesis

$\begin{array}{c} \text{[O=C - NH] - ADGFTLREWISF (Cys)} \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \text{-----} \text{S} \end{array}$			
Substituição	EC50 (nM)	Proliferação Celul.	IC50 (nM)
D - E		(+)	ND
Forma de solção livre		++(+)	ND
Adição de Gly C-Term		++	++
S - Abu		++(++)	ND
F - DiPh-Ala		(++)	++
S,F - Abu, DiPh-Ala		++(+)	++

EXEMPLO 9

Neste exemplo, os valores de EC₅₀ e de IC₅₀ foram

calculados como descrito acima para os compostos de dímero listados na Tabela 7 abaixo. O monómero ciclizado



é incluído como uma comparação.

Os compostos da Tabela 8 eram inactivas a uma concentração máxima testada de 10 μM .

Na Tabela 9, os valores de EC_{50} e IC_{50} determinados como descritos acima para as variantes ciclizadas e dimerizadas de I E G P T L R Q W L A A R A são comparadas.

Na Tabela 10, as truncagens do dímero



são comparadas. Os valores de EC_{50} e de IC_{50} foram calculados como descrito acima. Os resultados do microfisiómetro são apresentados em parêntesis.

TABELA 7

	EC50 (nM) Microorganism.	IC50 (nM) Proliferação	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{Br} + \text{C} - \text{NH}) - \text{ADGFTLRQWLAEFC} - (\text{NH}_2) \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{Br} + \text{C} - \text{NH}) - \text{ADGFTLRQWLAEFC} - (\text{NH}_2) \end{array}$			
$\begin{array}{c} (\text{H}) - \text{EEGFTLRQWLAARA} \\ \\ (\text{H}) - \text{EEGFTLRQWLAARA} (\text{D-Ala}) \text{K} - (\text{NH}_2) \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} (\text{H}) - \text{CEEGFTLRQWLAARA} - (\text{NH}_2) \\ \\ (\text{H}) - \text{CEEGFTLRQWLAARA} - (\text{NH}_2) \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} (\text{H}) - \text{CADGFTLRQWLAEFC} - (\text{NH}_2) \\ \\ (\text{H}) - \text{CADGFTLRQWLAEFC} - (\text{NH}_2) \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} (\text{H}) - \text{SVQCGFTLRQWLAARQELLE} - (\text{NH}_2) \\ \\ (\text{H}) - \text{SVQCGFTLRQWLAARQELLE} - (\text{NH}_2) \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} (\text{H}) - \text{HWGFTLRSGC} - (\text{NH}_2) \\ \\ (\text{H}) - \text{HWGFTLRSGC} - (\text{NH}_2) \end{array}$	ND	+	+
CADGFTLRQWLAEFC	++	++	++

(continuação)

	EC50 (nM)	IC50 (nM)	Microorganism. Proliferação
(Ac)-ADGPTLRENWISFC (Ac)-ADGPTLRENWISFC	ND	++	++
ADGPTLRENWISFC ADGPTLRENWISFC	++	++	++
(Ac)-DGPTLRENWISFC (Ac)-DGPTLRENWISFC	++	++	++
(Ac)-GPTLRENWISFC (Ac)-GPTLRENWISFC	ND	++	++
GPTLRENWISFC GPTLRENWISFC	++	++	+
(Ac)-PTLRENWISFC (Ac)-PTLRENWISFC	ND	++	++
PTLRENWISFC PTLRENWISFC	++	++	++
(Ac)-TLRENWISFC (Ac)-TLRENWISFC	++	++	++
TLRENWISFC TLRENWISFC	++	++	++

TABELA 8**[H]-CITRAQUILINAC - (100₂)**

(continuação)

[H]-CHINQLSTC-(NH₂)[H]-CHRSQLLAAC-(NH₂)[H]-CTSTQWLLAC-(NH₂)[H]-CQRAQLINFC-(NH₂)[H]-CTLSEFLAQQC-(NH₂)[H]-CTFQVWKLARNC-(NH₂)[H]-CTLQQLAQHRC-(NH₂)[H]-CLNFFVTQMLNCC-(NH₂)[H]-CTLRFLLDPTAVC-(NH₂)[H]-CGTEPTLSTWLLCC-(NH₂)[H]-CHLVGFELMSWLLCC-(NH₂)[H]-CELRFTEGLMCC-(NH₂)[H]-CTLAEFLAQVEQC-(NH₂)[H]-CTLRMLVSRHVAIC-(NH₂)[H]-CHNPTLRQMLAARAC-(NH₂)[H]-RENPTLRQWM-(NH₂)

(continuação)

[H]-IEGPTLRQWLAAEA-(NH₂)TABELA 9

	EC50 (nM)	IC ₅₀ (nM)
Microorganism.	Proliferação	
	N.D.	++
<u>[H]-IEGPTLRQWLAAA-(NH₂)</u>		
	N.D.	++
<u>[H]-IEGPTLRQWLAAAC-(NH₂)</u>		
	++	++
<u>[H]-IEGPTLRQWLAAA</u> <u>[H]-IEGPTLRQWLAAA(β-Ala)K-(NH₂)</u>		
	++	++
<u>[H]-IEGPTLRQWLAAA-(NH₂)</u> <u>[H]-IEGPTLRQWLAAA-(NH₂)</u>		

TABELA 10

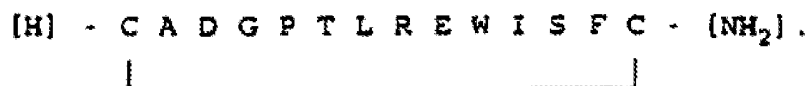
<u>[H]-IEGPTLRQWLAAA</u> <u>[H]-IEGPTLRQWLAAA(β-Ala)K-(NH₂)</u>

(continuação)

	Sequência	EC50 (nM) Prolifer. celul.	IC50 (nM)
	(Ac)-IEPTLEQNLAARA (Ac)-IEPTLEQNLAARA- β A-K(NH ₂)	++	ND
	(H)-IEPTLEQNLAAR (H)-IEPTLEQNLAAR- β A-K(NH ₂)	++	ND
	(H)-IEPTLEQNLAAR (H)-IEPTLEQNLAAR- β A-K(NH ₂)	++(++)	ND
	(Ac)-EGPTLEQNLAARA (Ac)-EGPTLEQNLAARA- β A-K(NH ₂)	ND	ND
	(H)-EGPTLEQNLAARA (H)-EGPTLEQNLAARA- β A-K(NH ₂)	++	ND
	(H)-EGPTLEQNLAAR (H)-EGPTLEQNLAAR- β A-K(NH ₂)	++(+++)	ND
	(Ac)-EGPTLEQNLAAR (Ac)-EGPTLEQNLAAR- β A-K(NH ₂)	++	ND
	(H)-EGPTLEQNLAAR (H)-EGPTLEQNLAAR- β A-K(NH ₂)	++	ND

EXEMPLO 10

Neste exemplo foram introduzidas várias substituições nas posições G, P, e W no composto ciclizado

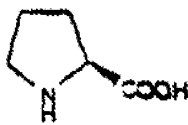


A Tabela 11 lista exemplos dos compostos substituídos que apresentam actividade agonista de TPO. As abreviaturas das substituições na tabela são como se segue:

Tabela 11

[H]-CADGPTLREWISFC-[NH ₂]		
G	P	W
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gly	Pro	Trp
Gly	Pro	Trp
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gaba	Pro	Trp
Cpr-Gly	Pro	Trp
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gly	Pro	Trp
Gly	Pro	Nal
Sar	Pro	Trp
Cpr-Gly	L-Tic	Nal
Gly	D-Tic	D-Trp
Cpr-Gly	D-Tic	Trp
Gaba	Hyp(OBn)	Trp

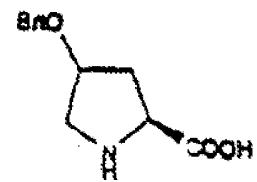
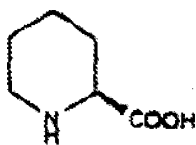
Substituições de prolina



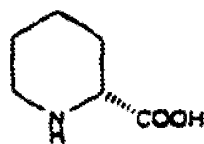
L-Pro



D-Pro

L-4-Hvo (OBn)

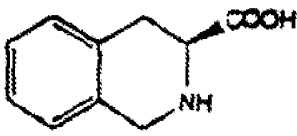
Ácido L-pipecolínico



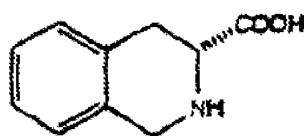
Ácido D-pipecolínico



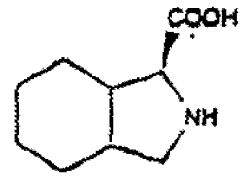
Ácido L-azetidina carboxílico



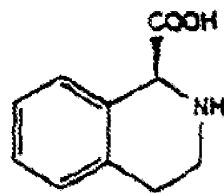
L-Tic



D-Tic

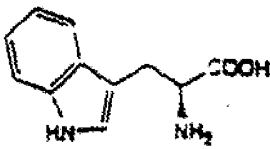


L-Oic

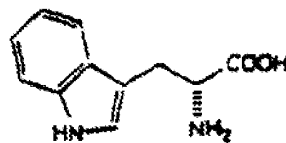


L-Tiq

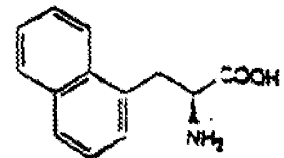
Substituições de Triptofano



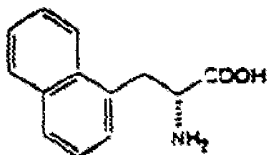
L-Trp



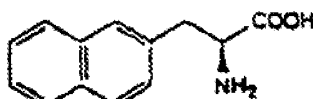
D-Trp



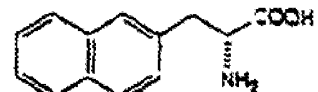
L-1-Nal



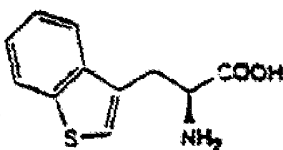
D-1-Nal



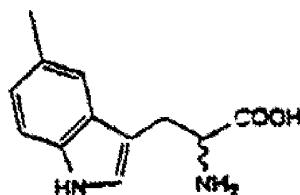
L-2-Nal



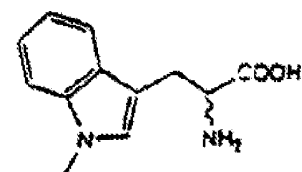
D-2-Nal



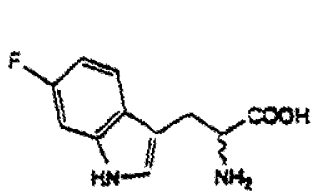
L-(Benzidril)Alanina



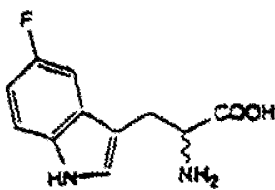
DL-5-Mme-Trp



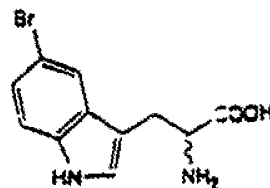
DL-I-Me-Trp



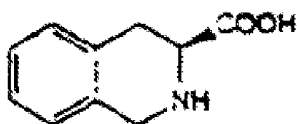
DL-6-F-Trp



DL-5-F-Trp



DL-5-Br-Trp



L-Tic

Substituições de Glicina



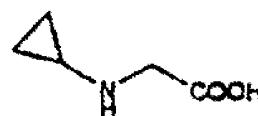
Glicina



Sarcosina

 β -AlaninaÁcido γ -aminobutírico

N-Pentilglicina



N-Ciclopropilglicina

EXEMPLO 11

Para avaliar a exequibilidade de ratinhos como uma espécie de teste conveniente, foram realizadas várias experiências *in vitro*, concebidas para medir a actividade dos compostos de teste no receptor do ratinho. Primeiro,

células de medula, recuperadas a partir de fêmures de um ratinho Balb/C de 8 a 9 semanas, foram incubadas durante 7 dias em cultura líquida com rhuTPO ou com várias concentrações dos péptidos de teste. No final do período de incubação, as culturas foram concentradas por Cytospin, coradas para acetilcolinesterase (AChE, um diagnóstico de megacariócitos de ratinho), e contadas por análise microscópica. rhuTPO a um (1) nM originou o crescimento excessivo de células não aderentes muito grandes (>40 μm) que coram para AChE. Estas células parecem ser megacariócitos maduros. A partir de uma sementeira inicial de 10^6 células/mL de medula total (em culturas de 50 mL) desenvolveram-se 1 a 2 x 10^6 megacariócitos estimados. Esta resposta a TPO foi designada como "máxima". As culturas de controlo não contendo factores de crescimento adicionados produziram muito poucas células positivas para AChE. Vários dos compostos de péptido foram testados a concentração elevada neste ensaio e os resultados estão resumidos na Tabela 12. O péptido A ac 10 μM produziu uma resposta máxima da medula de ratinho. Esta descoberta foi a primeira evidência de que esta família de péptidos é activa no receptor de murino. Numa segunda experiência, as células de medula foram recolhidas e cultivadas num meio semi-sólido (metilcelulose) não contendo factores, contendo rhuTPO a 1 nM, ou Péptido A a 10 μM . Após 7 dias em cultura, as colónias de célula grande (presumidas como sendo megacariócitos) foram contadas e agrupadas em colónias pequenas (3-5 células) ou colónias grandes (maiores do que 6 células). Os resultados são apresentados na Tabela 13. TPO e os péptidos de teste produziram ambos substancialmente

mais colónias de ambos os tamanhos do que as culturas de controlo negativo. Isto indica que os péptidos mimetizam TPO na sua capacidade para estimular a expansão da população de células precursoras de Mk.

Para obter uma comparação mais quantitativa da actividade dos compostos de teste nos receptores de murino e humanos, o receptor de muTPO foi clonado e transfectado para células BaF3. Foi isolada uma população de células dependentes de TPO.

TABELA 12

Péptido	Resposta à concentração testada (nM)	
D	100 000	nenhuma
C	40 000	Máxima**
C + S.A.*	1 000	Máxima**
S.A. isolado	1 000	Nenhuma
B	100 000	Mínimo
A	10 000	Máximo**
TPO (R&D)	1 000	"Máximo"
<p>*estreptavidina complexada com péptido biotinilado - concentração de complexo putativo 1:4.</p> <p>** comparado com TPO humano recombinante</p> <p>**25-30% células coradas com AGE em cytopspin</p> <p>Culturas sem factor - ca. 5% de células de coloração com ACHE (celularidade baixa)</p>		

TABELA 13

Composto		3-5 Células grandes	6-12 Células grandes
Sem factores	1	2	1
Sem factores	2	1	1
1 nM TPO	#1-1	15	6
1 nM TPO	#1-2	12	1
1 nM TPO	#2-1	16	8
1 nM TPO	#2-2	13	3
Péptido 10 μ M	#1-1	25	10
Péptido 10 μ M	#1-2	22	8
Péptido 10 μ M	#2-1	22	7
Péptido 10 μ M	#2-2	21	10

Lisboa, 4 de Junho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Composto que se liga a receptor de trombo-poietina, possuindo o referido composto

- (1) um peso molecular inferior a 8 000 daltons, e
- (2) uma afinidade de ligação ao receptor de trombo-poietina como expresso por uma IC₅₀ não superior a 100 mM

em que o referido composto compreende uma sequência de aminoácidos:

X₈GX₁X₂X₃X₄X₅WX₇ Em que X₈ é qualquer um dos 20 L-aminoácidos codificados geneticamente; X₁ é P; X₂ é T; X₃ é L; X₄ é R; X₅ é E ou Q; X₇ é I ou L.

2. Composto da reivindicação 1, em que o referido composto compreende uma sequência de aminoácidos:

X₉X₈GX₁X₂X₃X₄X₅WX₇ em que X₈ é A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T, ou V; e X₉ é A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T, ou V.

3. Composto da reivindicação 2, em que X₈ é D, E, ou K; e X₉ é A ou I.

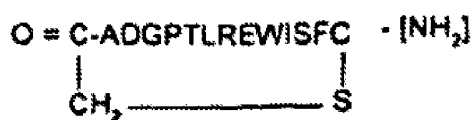
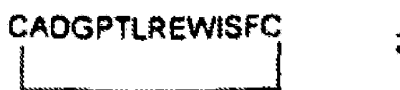
4. Composto da reivindicação 3, em que o

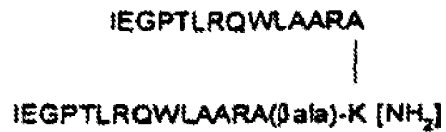
referido composto é seleccionado a partir do grupo consistindo em GGCADGPTLREWISFCGG; GNADGPTLRQWLEGRRPKN; GGCADGPTLREWISFCGGK; TIKGPTLRQWLKSREHTS; SIEGPTLREWLTSTRTPHS; LAIEGPTLRQWLHGNGRDT; CADGPTLREWISFC; e IEGPTLROWLAARA.

5. Composto que se liga a receptor de trombo-poietina, possuindo o referido composto:

- (1) um peso molecular inferior a 8 000 daltons, e
- (2) uma afinidade de ligação ao receptor de trombo-poietina como expresso por uma IC_{50} não superior a 100 mM, em que o referido composto compreende uma sequência de aminoácidos: GGCTLREWLHGGFCGG.

6. Composto que se liga ao receptor de trombo-poietina, em que o referido composto é seleccionado a partir do grupo consistindo em





7. Composição farmacêutica compreendendo o composto da reivindicação 1, em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

8. Utilização de um composto de qualquer uma das reivindicações 1-6 na preparação de um medicamento para activar o receptor de trombopoietina num humano.

9. Utilização de um composto de qualquer uma das reivindicações 1-6 na preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio hematológico.

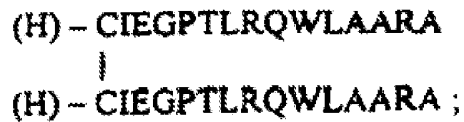
10. Utilização como reivindicado na reivindicação 9, em que o distúrbio é um distúrbio de plaquetas ou trombocitopenia.

11. Utilização como reivindicado na reivindicação 10, em que o distúrbio é trombocitopenia resultante de quimioterapia, terapia por radiação, ou transfusões de medula óssea.

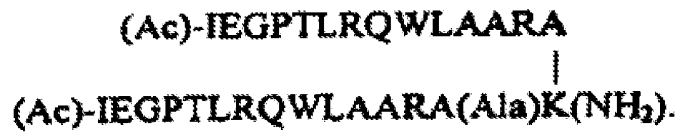
12. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, em que o composto está ligado covalentemente a um polímero não proteico.

13. Composto de acordo com a reivindicação 12, em que o polímero não proteico é seleccionado a partir da lista: polietilenoglicol, polipropilenoglicol, e polioxialquenos.

14. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que o referido composto é seleccionado a partir do grupo consistindo em



e



Lisboa, 4 de Junho de 2008

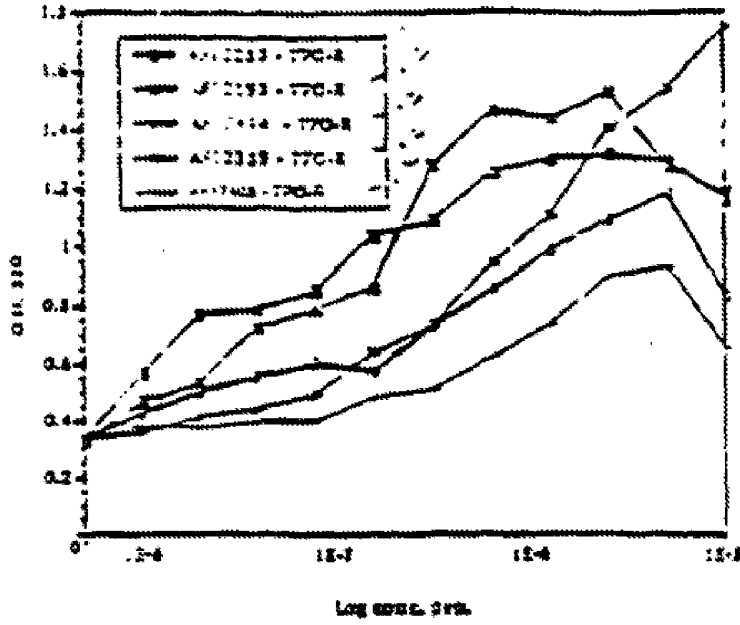


FIG. 1A

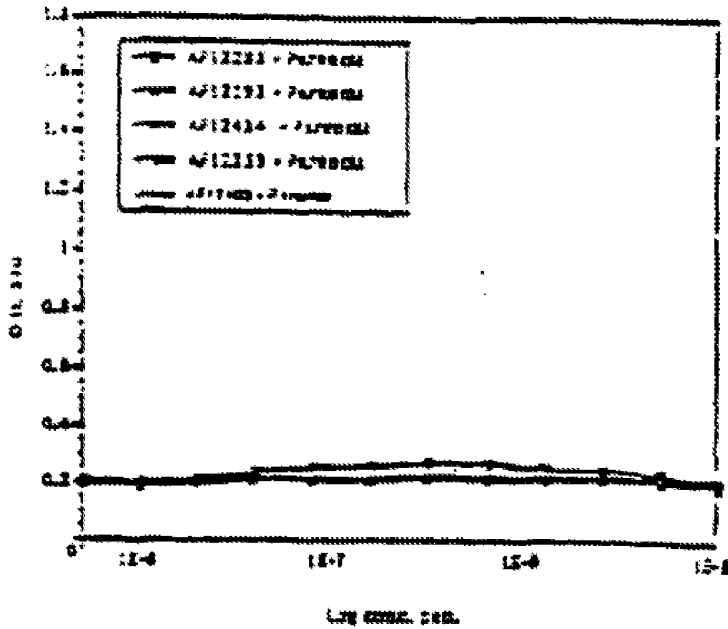


FIG. 1B

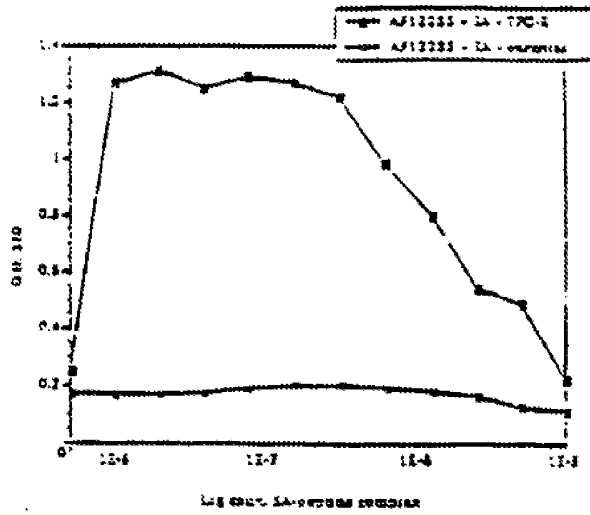


Fig. 2A

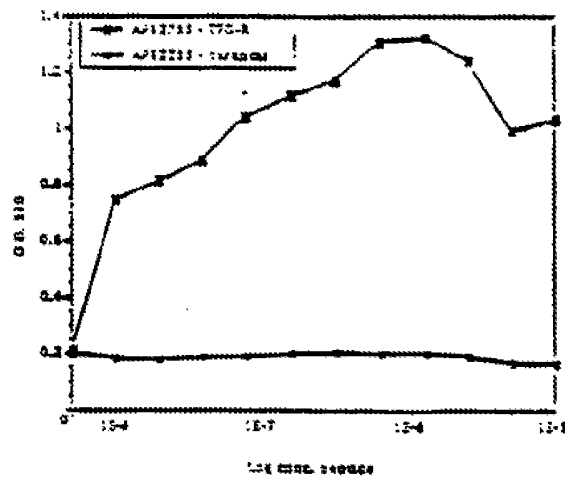


Fig. 2B

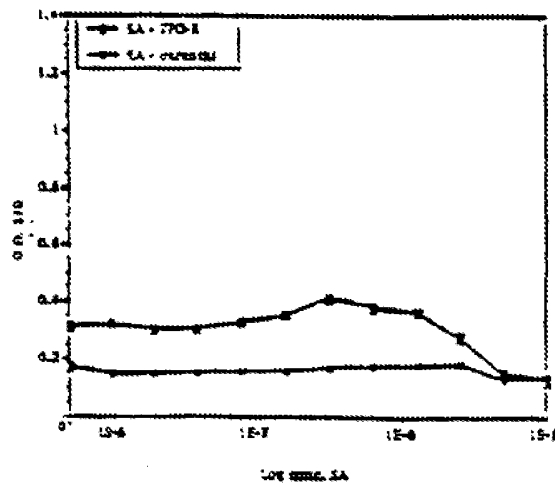


Fig. 2C

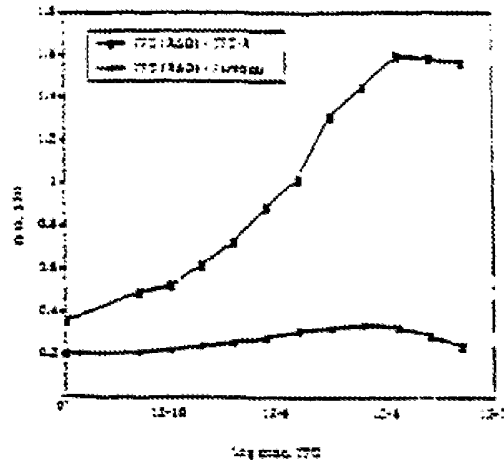


Fig. 3A

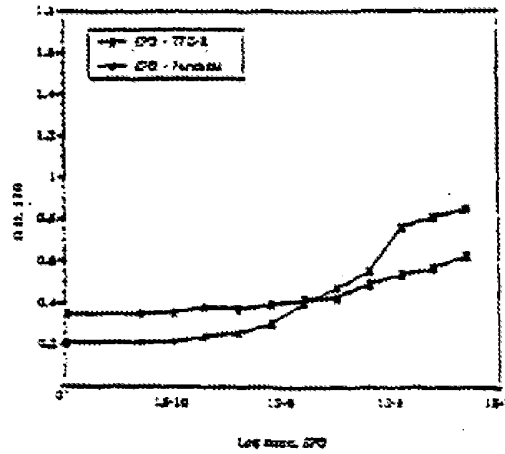


Fig. 3B

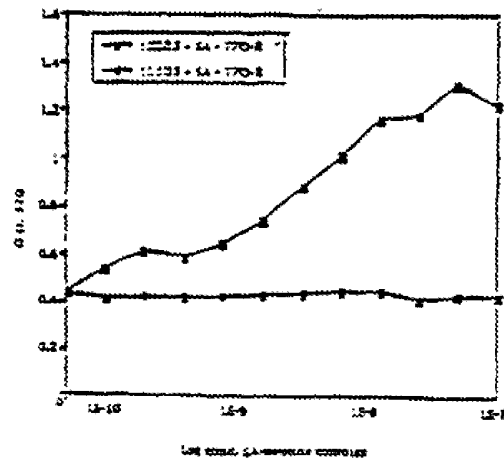


Fig. 3C

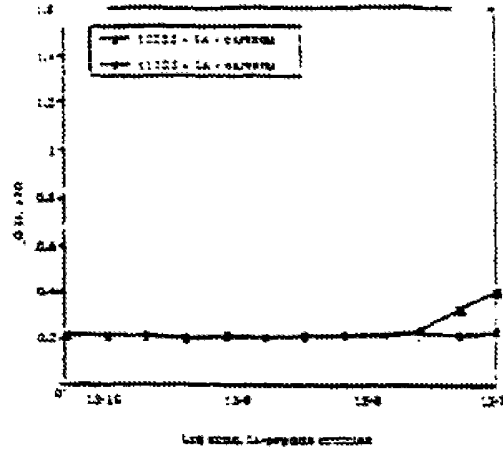


Fig. 3D

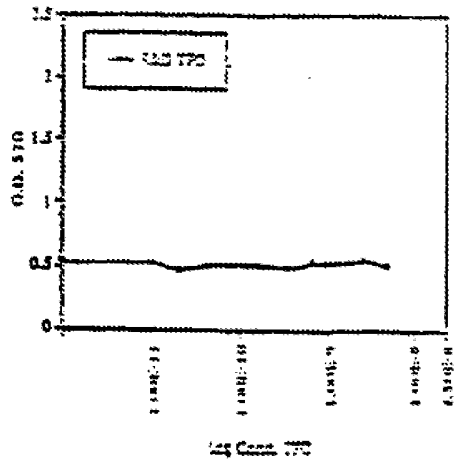


Fig. 3E

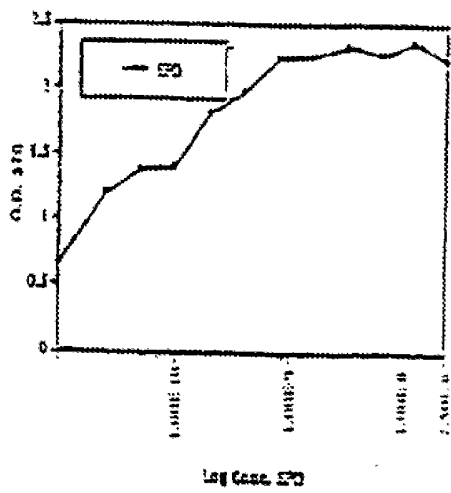


Fig. 3F

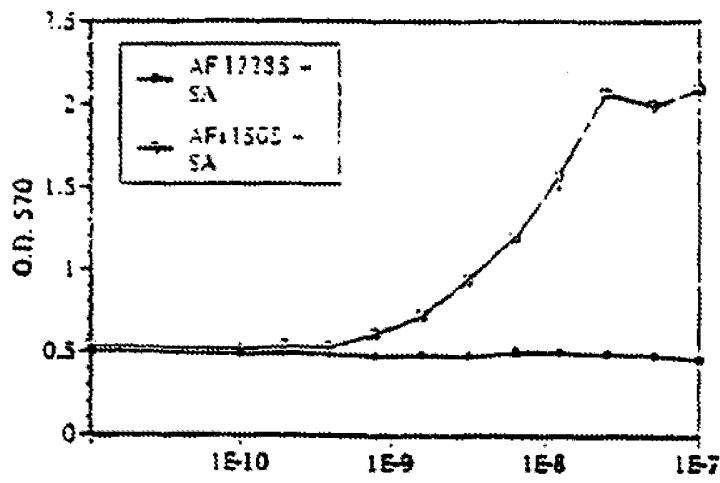
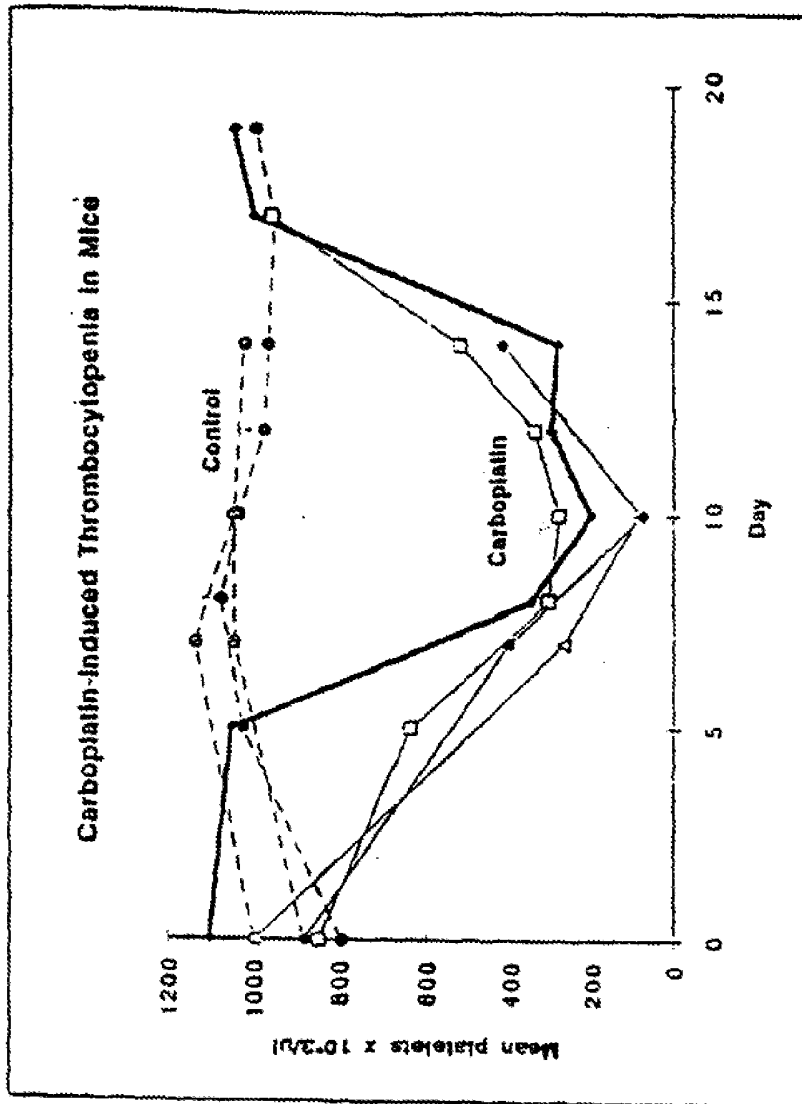


Fig. 3G

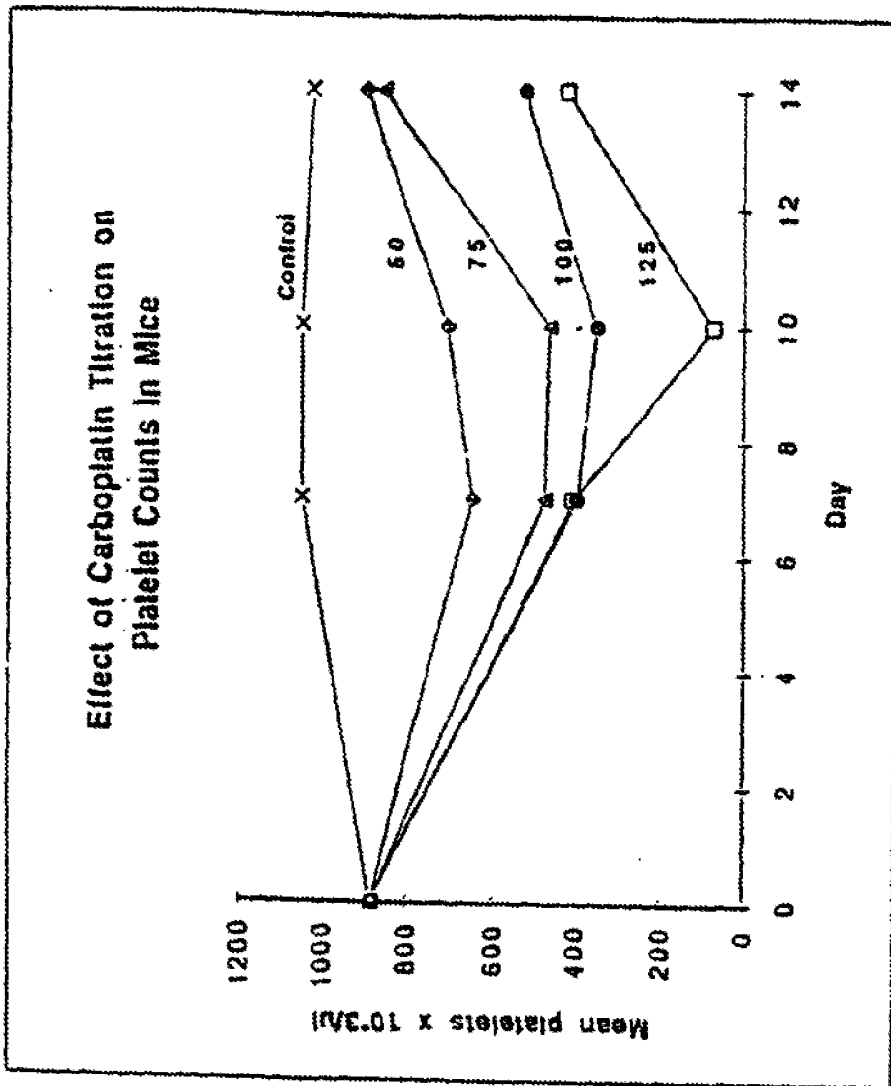
Log conc. complejo S.A.-péptido

Fig. 7



BALB/c mice received carboplatin (125 mg/kg, ip) on Day 0.
Dashed lines represent controls from three experiments.
Solid lines represent carboplatin-treated groups in three experiments.
The heavy solid lines represent historical data from Ulrich, et al.

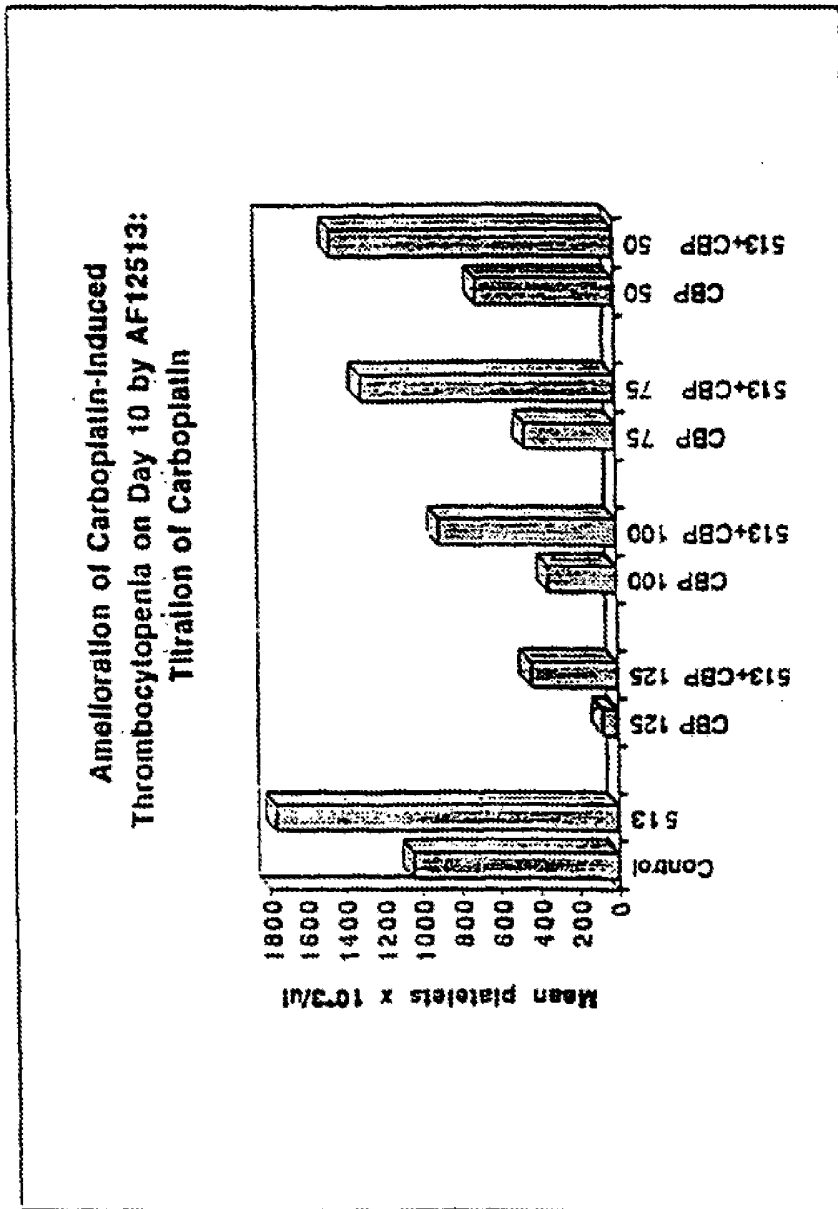
FIG. 8



Carboplatin (mg/kg, ip) was given on Day 0.

3/96 Chris Boytos

Fig. 9



Carboplatin (CBP; 125-50 mg/kg. ip) was given on Day 0.
AF12513 (513; 1000 mg/kg. ip) was given on Days 1-9.

3/96 Chris Doylos

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * US 5270170 A
- * US 5338865 A
- * US 71857791 A
- * US 54110890 A
- * US 30026294 A
- * US 14477593 A
- * WO 9511992 A
- * US 14689693 A
- * US 07946239 B
- * US 07792522 B
- * US 5143854 A
- * WO 9015070 A
- * US 62412090 A
- * US 80572791 A
- * US 946239 A
- * US 76252291 A
- * US 9015070 W
- * US 5242090 A
- * US 805727 A
- * US 94733992 A
- * US 49246290 A
- * US 07624120 B
- * US 07805727 B
- * US 4640835 A
- * US 4496689 A
- * US 4301144 A
- * US 4670417 A
- * US 4791192 A
- * US 4179337 A
- * US 4612132 A
- * US 943605 A
- * US 08081577 B
- * US 08119700 B
- * US 3645090 A
- * US 3940475 A
- * WO 9505843 A, DiGiusto
- * WO 9325221 A, Bernstein
- * WO 9417784 A, Pitt
- * EP 613683 A, Pitt

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * KUTER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11104-11108
- * MARKER. *J. Clin. Invest.*, 1968, vol. 47, 458-465
- * METCALF. *Nature*, 1994, vol. 369, 519-520 [0003]
- * MCDONALD. *Am. J. Ped. Hematology/Oncology*, 1992, vol. 14, 8-21
- * KUTER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11104-11108
- * BARLEY et al. *Cell*, 1994, vol. 77, 1117-1124
- * KAUSHANSKY et al. *Nature*, 1994, vol. 369, 568-571
- * WENDLING et al. *Nature*, 1994, vol. 369, 571-574
- * SAUVAGE et al. *Nature*, 1994, vol. 369, 533-538
- * BARTLEY. *Cell*, 1994, vol. 77, 1117-1124
- * VIGON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5640-5644
- * BAZAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6934-6938
- * SOUYRI et al. *Cell*, 1990, vol. 63, 1137-1147
- * METHIA et al. *Blood*, 1993, vol. 82, 1395-1401
- * CWIRLA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6378-6382
- * FODOR et al. *Science*, February 1991, vol. 251, 787-773
- * DOWER ; FODOR. *Ann. Rep. Med. Chem.*, 1991, vol. 26, 271-280
- * BUNDGAARD, H. *Design of Prodrugs*. Elsevier Science Publishers, 1985
- * MARCH. *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, 1985, 1157
- * MARK et al. *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, 1980
- * *Design of Prodrugs*. Elsevier Science Publishers, 1985
- * MARCH. *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, vol. 1385, 1152 ;
- * FAUCHERE. *J. Adv. Drug Res.*, 1996, vol. 15, 29
- * VEBER ; FREIDINGER. *TINS*, 1985, 392
- * EVANS et al. *J. Med. Chem.*, 1987, vol. 30, 1229
- * SPATOLA, A.F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*. Marcel Dekker, 1983, 267

- SPATOLA, A.F. Vega Data. *Peptide Backbone Modifications*, March 1983, vol. 1 (3)
- MORLEY. *Trends Pharm Sci*, 1980, 463-468
- HUDSON, D. et al. *Int J Pept Prot Res*, 1979, vol. 14, 177-185
- SPATOLA et al. *Life Sci*, 1986, vol. 38, 1243-1249
- HANN. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, vol. 1, 307-314
- ALMQUIST et al. *J. Med. Chem.*, 1980, vol. 23, 1392-1398
- JENNINGS-WHITE et al. *Tetrahedron Lett*, 1982, vol. 23, 2533
- HOLLADAY et al. *Tetrahedron Lett*, 1983, vol. 24, 4401-4404
- HRUBY. *Life Sci* 1982, vol. 31, 189-199
- RIZO ; GIERASCH. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387
- CWIRLA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 87, 6378-6382
- FODOR. *Science*, February 1991, vol. 251, 767-773
- DOWER ; FODOR. *Ann. Rep. Med. Chem.*, 1991, vol. 26, 271-180
- CARAS ; WENDELL. *Science*, 1989, vol. 243, 1196-1198
- LIN et al. *Science*, 1990, vol. 249, 677-679
- MOSSMANN. *J. Immunol. Methods*, 1983, vol. 65, 55
- DEXTER et al. *J. Exp. Med.*, 1981, vol. 152, 1036-1047
- MERRIFIELD. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, vol. 85, 2149
- BODONSZKY et al. *Chem. Ind.*, 1966, vol. 38, 1597
- PIETTA ; MARSHALL. *Chem. Commun.*, 1970, 650
- GISIN. *Helv. Chim. Acta.*, 1973, vol. 56, 1467
- STEWART. *Solid Phase Peptide Syntheses*. Freeman and Co, 1969
- MORGAN ; GAINOR. *Ann. Rep. Med. Chem.*, 1989, vol. 24, 243-252
- HRUBY et al. *Biochem J.*, 1990, vol. 268(2), 299-262
- CHO et al. *Science*, 1993, vol. 261, 1303-1305
- WEINSTEIN ; BORIS. *Chemistry & Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*. Marcel Dekker, Inc, 1983, vol. 7, 267-357
- BARKER et al. *J. Med. Chem.*, 1992, vol. 35, 2040-2049 ;
- OR et al. *J. Org. Chem.*, 1991, vol. 56, 3146-3149
- MCDONALD. *Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology*, 1992, vol. 14, 8-21
- TICE ; BIBI. *Treatise on Controlled Drug Delivery*. Marcel Dekker, 1992, 315-339
- Goodman and Gilman's: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon, 1990
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, 1985
- STEWARD ; YOUNG. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chemical, 1984
- DOWER. *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, 6127