

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808567.9

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/715 C07K 16/28

A01K 67/027 A61K 48/00

A61K 38/17 A61K 38/10

A61K 31/70 A61K 39/395

G01N 33/68 C12Q 1/68

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426467A

[22] 申请日 2001.4.23 [21] 申请号 01808567.9

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 25 [33] EP [31] 00108075.3

[86] 国际申请 PCT/EP01/04553 2001.4.23

[87] 国际公布 WO01/80873 英 2001.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.24

[71] 申请人 普利瓦制药工业股份有限公司

地址 克罗地亚萨格勒布市

[72] 发明人 塔特娅娜·纳兰达 伦纳特·奥尔松

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 邓 琪

权利要求书 4 页 说明书 41 页 序列表 2 页
附图 8 页

[54] 发明名称 血栓生成素受体调节肽

[57] 摘要

本发明涉及一个新的能够治疗血小板减少症的诊断和治疗合成物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、 一种具有生物活性的 TPO（血栓生成素）受体调节子的寡肽，其特征在于它包含有 15-18 个氨基酸，通式为：

$X_1 G T L E L X_2 P X_3 S R Y R L Q L X_4$ ，其中

X_1 为 A R G 或缺失，

X_2 为 R 或 A

X_3 为 R 或 A 和

X_4 为 R A R 或缺失，

或其生物等价物。

2、 如权利要求 1 所述的寡肽，其特征在于所述寡肽选自由 SEQ ID No.1—6 定义的任何氨基酸序列组成的组，或其生物等价物。

3、 一种寡肽，其特征在于包含由 SEQ ID No.7 定义的氨基酸序列。

4、 一种核酸序列，其特征在于编码了根据权利要求 1，2 或 3 的寡肽。

5、 一种载体，其特征在于包含权利要求 4 的核酸序列。

6、 如权利要求 5 所述的载体，其特征在于该载体是细菌、病毒、哺乳动物或酵母载体。

7、 如权利要求 5 或 6 所述的载体，其特征在于它进一步包含能够在合适的宿主细胞中直接表达核酸序列的 5'和/或 3'调控元件。

8、 一种宿主细胞，其特征在于它包含权利要求 5 到 7 中任一项所述的载体，在合适的条件下能够表达权利要求 1 或 2 所述的寡肽。

9、 如权利要求 8 所述的宿主细胞，其特征在于它是哺乳动物、酵母或细菌细胞。

10、 一种遗传改变细胞的方法，其特征在于该方法通过转染包含根据权利要求 5 到 7 中任一项所述的载体的细胞。

11、 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于细胞通过化学或电诱

导转染的技术被转染，特别是电穿孔或细胞融合，逆转录病毒或病毒介导的转基因、脂质体介导的转基因或粒子攻击法。

12、一种制造能够制备权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽的非人的哺乳动物的方法，其特征在于权利要求 4 的核酸序列被转入非人的哺乳动物的细胞中。

13、一种非人的哺乳动物，其特征在于在其生殖细胞和/或体细胞中包含权利要求 4 所述的核酸序列，特别是包含权利要求 8 或 9 的宿主细胞。

14、如权利要求 13 所述的非人的哺乳动物，其特征在于是啮齿动物或灵长类动物。

15、一种制备权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽的方法，其特征在于包含用权利要求 5-7 中任一项所述的载体转染细胞，在能够表达并从细胞或培养液中回收寡肽的培养液里培养细胞。

16、一种抗体，其特征在于该抗体与权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽特异结合。

17、如权利要求 16 所述的抗体，其特征在于该抗体是单克隆或多克隆抗体，或其片段。

18、一种抗体，其特征在于与权利要求 16 或 17 的抗体特异结合。

19、一种制药合成物，其特征在于用于治疗血液病，特别是血小板减少症，包含权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽，权利要求 4 所述的核酸序列，权利要求 5 到 7 中任一项所述的载体，权利要求 8 或 9 所述的宿主细胞，或权利要求 16、17 或 18 所述的抗体，有选择地和制药可接受的载体连接。

20、一种诊断合成物，其特征在于用于诊断血液病，特别是血小板减少症，包含权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽，权利要求 4 所述的核酸序列，权利要求 5 到 7 中任一项所述的载体，权利要求 8 或 9 所述的宿主细胞，或权利要求 16、17 或 18 所述的抗体，有地择的和制药可接受

的载体连接。

21、 如权利要求 19 或 20 所述的制药或诊断合成物，其特征在于进一步包含血栓生成素。

22、 如权利要求 19 到 21 中任一项所述的制药或诊断合成物，其特征它为片剂、药丸、胶囊、颗粒、栓剂、粉末、小块、脂质体、包衣、供注射、注入、口服给药的溶液、糖浆、悬浮液、乳液、喷雾、吸入剂、气雾剂、糊剂、软膏或药水的形式。

23、 权利要求 1, 2 或 3 的寡肽，权利要求 4 的核酸序列，权利要求 5 到 7 中任一项的载体，权利要求 8 或 9 的宿主细胞，和/或权利要求 16、17 或 18 的抗体的应用，其特征在于用于制备诊断或治疗血液病，特别是血小板减少症所用的药物。

24、 如权利要求 23 所述的应用，其特征在于该药物进一步包含血栓生成素。

25、 一种调节 TPO-R（血栓生成素—受体）活性的方法，其特征在于权利要求 1, 2 或 3 的寡肽或权利要求 16、17 或 18 的抗体在血栓生成素存在或不存在的情况下用于调节 TPO-R。

26、 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于调节是活性的增加或降低。

27、 一种筛选药物的方法，其特征在于筛选对诊断或治疗血液病，特别是血小板减少症有效的药物，包含筛选潜在的药物，它们能够与权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽竞争以结合 TPO-R 或活化细胞外信号途径。

28、 一种治疗方法，其特征在于治疗对用血栓生成素激动剂治疗易感的疾病患者，包含给予患者治疗有效的剂量的权利要求 1, 2 或 3 所述的寡肽和/或野生型 TPO-Rp。

29、 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于该疾病是由骨髓移植、放疗、化疗、过敏反应引起的或先天性的血液病或血小板减少症。

30、 如权利要求 28 或 29 所述的方法，其特征在于进一步包含用

血栓生成素给药。

31、 一种野生型 TPO-Rp，编码野生型 TPO-Rp 的核酸序列，包含该核酸序列的载体，包含该载体的宿主细胞和/或与野生型 TPO-Rp 特异结合抗体的应用，其特征在于用于制备诊断或治疗血液病，特别是血小板减少症的药物。

32、 一种从包含 TPO-R 的来源中检测或分离 TPO-R 的方法，其特征在于包括在 TPO-R 能与所述寡肽特异结合，并从包含 TPO-R 的来源中分离出来的情况下，将权利要求 1，2 或 3 的寡肽应用于包含 TPO-R 的来源。

33、 从混合物中检测和/或分离权利要求 1 到 3 所述的寡肽的免疫测定，其特征在于将权利要求 16 或 17 所述的抗体应用于该混合物，检测和/或分离与抗体结合的寡肽。

血栓生成素受体调节肽

技术领域

本发明涉及一个有生物活性的寡肽——血栓生成素（TPO）受体调节化合物，编码该寡肽的核酸序列，包含核酸序列的载体，包含载体的宿主细胞，寡肽的抗体，包含寡肽、核酸序列、抗体以及宿主细胞的制药和诊断合成物，以及遗传性改变细胞的方法，调节 TPO 受体（TPO-R）活性的方法和筛选更多 TPO 受体调节化合物的方法。

背景技术

血小板减少症是一种广泛存在的、严重的并且威胁生命的疾病，既可作为一种原发的血液疾病发生，也可以作为一种被诱导的疾病发生。严重血小板减少症的病人有自发性大出血的危险。被诱导的血小板减少症可能是由于诸如骨髓移植，肿瘤化疗，放射或过敏反应导致。约 50% 诊断出的新的癌症患者经历过某种形式的化疗并接受过血小板输血。血小板减少症影响了至少 25% 接受化疗的患者。因为重复循环的剂量加强的化疗使防止流血，并且帮助修复损伤血管的血小板衰竭，所以为了使血小板数恢复，癌症治疗常常被中断。如果血小板数不能恢复，会延迟和/或限制后续化疗循环的使用，使治疗成功的机会减小。

血小板减少症的治疗基本是通过输入新鲜的血小板制剂进行的，通过注射或者口服，这些制剂可以将血小板数量增加到正常水平，但是这样的制剂非常昂贵，并且还不能作为成熟的药提供。每年仅仅在美国，就有约 8 百万单位的血小板输入患者体内以降低严重出血的危险。至少 30% 的输血导致并发症，通常是发热反应，偶然是菌血症，移植一对一宿主疾病，或者急性肺部损伤。对于 15-25% 要求重复血小板输入的患者，由于 HLA 异

源免疫，增加的血小板应答是不够的。另外，血小板输血非常昂贵。特别的，化疗诱导的血小板减少症目前采用血小板输入和/或延迟化疗直到血小板数增加进行控制。但是，输血可能使患者有感染以血液为传染源的疾病的危险，如乙肝、丙肝、艾滋病感染、人 T 淋巴病毒或者免疫反应，如发烧。降低化疗的剂量和延迟或停止治疗理论上可能使癌细胞生长或者蔓延。因此，设计一种治疗血小板减少症的有效药物是一种紧迫的需要，这需要对血小板减少症的分子和生化原理有细致的了解。

巨核细胞是起源于骨髓的细胞，负责产生循环的血小板。尽管在大多数物种中，仅仅是骨髓细胞的一小部分，但是它们的体积超过典型骨髓细胞的 10 倍。巨核细胞进行核内有丝分裂，它们复制核但是不分裂细胞，因此产生多倍体细胞。血小板数降低使核内有丝分裂率增加，更高倍数的巨核细胞形成，巨核细胞的数量可能增加到三倍。相反，血小板数增加，核内有丝分裂率降低，较低倍数的巨核细胞形成，巨核细胞的数量可能明显降低。

循环的血小板的量调节核内有丝分裂率和骨髓巨核细胞数量的精确的生理反馈机理还不知道。涉及调节这个反馈环的循环血栓形成因子目前被认为是 TPO。它是一个糖蛋白，至少有 2 种形式，分子量分别为 25 和 31KDa，有一个常见的 N 末端，调节血红细胞的产生。在体内和体外，TPO 都显示为巨核细胞生成的主要调节子。TPO 通过结合 c-mpl(以下也称为 TPO-R)开始它的生物效应，它是造血蛋白受体超家族的成员。更特异的，在涉及血小板减少症的情况下，TPO 显示为主要的体液调节子。在一些研究中 TPO 显示为能使血小板增加，增大，增加受体动物血小板的同位素渗入。特别地，TPO 被认为通过几条途径影响巨核细胞生成：(1) 它使巨核细胞的大小和数量增加；(2) 在巨核细胞中，它以多倍体的形式使 DNA 含量增加；(3) 它增加了巨核细胞核内的有丝分裂；(4) 它使巨核细胞进一步成熟；和 (5) 它以小乙酰胆碱酯酶一阳性细胞形式以及在骨髓里，使前体细胞的百分率增加。

因为血小板对凝血是必需的，当它的数量很低的时候，患者有死于悲剧性大出血的严重危险，TPO 在对各种血液疾病，例如，主要由于血小板缺乏引起的疾病的诊断和治疗有潜在的有用的应用。另外，目前的研究提供了一个用于治疗血小板减少症（特别是化疗、放疗或者骨髓移植治疗癌症或淋巴瘤导致的血小板减少症）的 TPO 疗法的有效的投射的基础。

(McDonald(1992) Am. J. Ped. Hematology/Oncology 14:8-21) .

编码 TPO 的基因已经被克隆，并确定了特征。(Kuter 等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 91:11104-11108; Barley 等(1994) Cell 77:1117-1124;; Kaushansky 等(1994) Nature 369:568-571; Wendling 等 (1994) Nature 369:571-574; 和 Savage 等(1994) Nature 369:533-538)。

重组血栓生成素（以下也称为 rTPO）是目前获得的特异设计的唯一可能有效地用于治疗血小板减少症的化合物。它在血小板减少症里表现为一种血小板诱导物药物。已经显示外源的单剂量的 rTPO 的应用普遍与血小板数的增加相关。在一些情况下，它可以提高巨核细胞的应答，因此导致血栓形成的并发症。这表明，尽管在众所周知的激动剂（凝血酶、胶原质）不存在的情况下，血小板减少症不会导致血小板聚集，但是它使血小板对于这些药剂的聚合效应变得敏感。这样的“引火药”也在体内被证实。来源于经过治疗的血小板减少症的动物的血小板对刺激血小板聚集的物质有高敏感性。因此 TPO 可能使血栓形成情况加剧，所以在 TPO 应用于患者之前，它的危险性应该被仔细评估。同时，成熟的血小板将血栓生成素从溶液中移去，在患血小板减少症的动物体内，血浆的血栓生成素浓度在血小板输入不久后下降，只是在血小板数重新下降以后血栓生成素浓度才上升。血小板可以将 TPO 从循环中移去的发现至少有 2 个临床作用：i)血小板输入可能减弱巨核细胞的恢复； ii)TPO 和存在的血小板的结合可能减弱外源 TPO 对骨髓抑制治疗的反应。但是，因为存在的血小板持续结合 TPO，血浆血栓生成素浓度的增加被延迟，直到许多天以后血小板减少症介入。另外，一种去尾的重组血栓生成素形式被假设为一个单一的 PEG 共轭部分，

在一些情况下，这些治疗与血小板减少症和抗体中和的发展相关。

除了重组血栓生成素以外，另外的一些重组细胞因子（IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、GM-CSF、钢因子和原形成素—IL-3-血栓生成素融合蛋白）在体内和体外的巨核细胞系的细胞中有直接和间接的刺激作用。但是，大部分这类物质对脊髓抑制治疗后血小板的恢复没有有益的影响，或者有不能接受的毒作用。相反的，IL-11 证明为有效的和相对安全的。IL-11 用于接受化疗的癌症患者的降低血小板输入的要求。对于癌症患者，当每天皮下注射 IL-11，能诱导血小板数量的增加。但是，主要是由于血浆体积扩大导致这个药物有副作用（前房节律不整、心悸、外周浮肿、头疼、呼吸困难、贫血、肌痛、增重、厌食、反胃）。在一些癌症患者中，发现了抗体的形成（在那些考虑的中和之下）。IL-11 看上去只对严重和治疗受限制的血小板减少症患者，或者那些要求预先血小板输入的患者适合。它不适用于常规减轻血小板减少症。

人类 TPO-R 的 DNA 序列和编码的肽序列已经被描述（Vigon 等（1992）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5640-5644）。TPO-R 是造血蛋白生长因子受体家族的成员。这个家族的特征是一个普遍的细胞外结构域的结构，包括 N 端部分的 4 个保守的半胱氨酸残基。

TPO-R 基因克隆的提供有助于发现这个重要受体的激动剂。重组受体蛋白的提供使能够在各种任意的或者半任意的肽多样性产生系统中研究受体—配体反应。

WO 99/42127 公开了一个 TPO-受体肽（以下称为 TPO-Rp 野生型），由 23 个氨基酸组成，对应于人类 TPO-Rp 氨基酸 444—466。公开了通过应用 TPO-Rp 于受体调节 TPO-R 活性的方法。但是，专门治疗血小板减少症的方法没有公开。

不同的作者报告了 TPO-R 的缺失突变有利于结构—功能关系的分析：Dorsch 等 *J. Exp. Med.* (1997) 186, 1947-1955, Drachman 和 Kaushansky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94, 2350-2355, Porteu 等, *Mol. Cell. Biol.* (1996),

2473-2482 和 Takatoku 等, J.Biol.Chem, (1997)272,7259-7263。

更多的血栓生成素受体激动剂肽被了解, 比如 Kimura 等(J. Biochem. (1997) 122,1046-1051, Biochem. Mol. Biol. Int. (1998) 44,1203-1209)公开了一个从任意噬菌体肽库获得的 15 氨基酸的肽, 它刺激了血栓生成素依赖细胞的增生和鼠骨髓细胞分化为巨核细胞。Cwirla 等公开了一个 14 氨基酸的血栓生成素受体激动剂肽, 从人骨髓细胞在体外刺激巨核细胞的增生和成熟。(Science (1997) 276, 1696-1699)。

这些 TPO-R 或者激动剂肽的缺失突变是否被证明能够作为血栓生成素的模拟物具有潜在的能开发成为稳定和制药有效的药物的能力并没有被公开。

发明内容

因此, 本发明要解决的技术问题是提供一个有效的化合物, 它有助于诊断和治疗血液病, 比如先天的和诱导的血小板减少症, 特别是化疗、过敏和放射诱导的血小板减少症, 而同时无毒并稳定。

本发明通过提供一个分离并纯化的具有 TPO-R 调节子生物活性的寡肽解决了以上的问题, 这个寡肽包含, 特别在本质上, 更优先的由 15-18 个氨基酸组成, 具有通式:

$X_1GTLELX_2PX_3SRYRLQLX_4$, 其中

X_1 是 ARG 或缺失。

X_2 是 R 或 A

X_3 是 R 或 A, 以及

X_4 是 RAR 或缺失。

在本发明的一个特别优先的实施例中, 该寡肽包含, 特别本质上, 更优的由一个氨基酸序列组成, 这个氨基酸序列被定义为 SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5 或 6 的任何一个, 它们完全符合本发明。

尤其, 本发明基于一个发现, 即以上的寡肽调节 TPO-R 的活性, 特别

是强烈的与 TPO-R 结合，激活 TPO-R，并提高内源 TPO 的利用。本发明的寡核苷酸因此显示至少两个不同的活性，即 (i) 对 TPO-R 活性的调节效用，比如激动效用，如 TPO-模拟效用，或者拮抗效用，以及(ii) 和 TPO 的协作效用，特别是当两个化合物都在极限下的浓度时，协作作用特别重要，因为它比仅仅使用 TPO 更具有临床优势。

此外，本发明的寡肽显示了非常高的效能和效率，也就是，在 nM 到 μ M 的范围里都有活性。本发明的寡肽可以单独应用或者与 TPO 结合使用。与 TPO 相反，本发明的寡肽不导致 TPO 受体的下调，因此不导致 TPO 敏感性下降。相反，外源 TPO 给药可能导致这样的 TPO 受体下调，因此敏感性或忍耐诱导下降。此外，本发明的寡肽对 TPO-R 有高度选择性，并且显示例如与密切相关的红细胞生成素受体没有交叉反应性。

本发明的寡肽与 TPO-R 的结合位点和 TPO 与 TPO-R 的结合位点完全不同。本肽不妨碍 TPO-R 与 TPO 的结合，两种化合物都能和同一个受体分子结合。至于活性，这些结合特性导致 TPO 和本寡肽的协同反应，这在细胞信号测定中被观察到，当本寡肽和 TPO 分别为极限下的浓度时，通过测定底物磷酸化，获得约 20%最大信号的信号。但是当两者同时存在时，也为极限下的浓度，可得最大信号。当 TPO 在一个很高的剂量时，本发明的寡肽倒转了 TPO-R 的下调节。在高浓度 TPO 中加入本寡肽导致 TPO-R 的信号传导。尽管与 TPO-R 特异结合，本发明的寡肽能够诱导受体最适合结合的构像，并且这样激活了信号途径中的底物。因此，除了它自身对 TPO-R 信号途径的激动效应，本寡肽当和天然的激素 TPO 结合时，扩大了 TPO 活性的范围，在化合物极限下浓度时，与 TPO 协同作用；在高激素浓度时，倒转了“钟形”曲线效应。

本发明进一步显示野生型 TPO-Rp 也具有特异治疗血液病，特别是血小板减少症的活性作用。这样，本发明的寡肽以及野生型 TPO-Rp，单独使用或者与 TPO 或血小板结合使用，对于诊断，特别是治疗血液病表现出特别的作用，例如由于血小板紊乱引起的疾病，和所有各种类型的血小板减

少症。由于本发明的寡肽在制药合成中的小体积和高稳定性，尤其在应用于口服的情况下，它们还有优势。它们进一步显示了在体内的高稳定性。

不被理论束缚，本发明的寡肽似乎能特别的调节 TPO-R 的活性。就是说，和 TPO 的结合导致了受体二聚化，并且激活了细胞内的信号途径。在这期间，发生受体的特异磷酸化，该受体与 JAK 激酶家族的激酶（JAK2 和 TYK2）相关，以及后续的转录因子 STAT5 的磷酸化和二聚化。活化的 STAT5 蛋白进入细胞核，与刺激细胞增生和增加血小板数量的目标基因的启动子区域结合。但是，尽管以上的野生型机制可能也对本寡肽有效，不能排除本寡肽有不同的机制，例如，通过结合受体单体，模拟受体的第二根链，或者与那些受体上天然 TPO 不结合的位点结合。事实上，本寡肽似乎与天然 TPO 有不同的作用位点。

本发明也涉及一个野生型 TPO-Rp 的替换突变衍生物 Y14F，也就是野生型 TPO-Rp14 位的酪氨酸被苯丙氨酸替换。这样改变了的肽可能对诸如肽降解的研究特别有价值，因为这样的肽在它的 N 或者 C 端可以特异的用碘处理。

本发明的寡肽和野生型 TPO-Rp 对防止和治疗由 TPO 调节的疾病有作用，特别是对于治疗血液病，包括但不限于血小板紊乱、由过敏反应、化疗、放疗或者骨髓移植引起的血小板减少症，以及先天性血小板减少症。因此，本发明也提供了一个用于治疗以上疾病的方法，其中患血小板紊乱的患者对用 TPO-R 调节化合物治疗易感，特别是当 TPO 激动剂接受或输入一个治疗有效的本发明的寡肽和/或野生型 TPO-Rp 的剂量或数量时。

本发明还提供了一个制药合成物，包括一个或多个这里描述的寡肽和/或野生型 TPO-Rp 和一个生理上能接受的载体。这些制药合成物有各种形式，包括口服形式、可吸入粉末和溶液，以及可注射和可注入的溶液。

在本发明的一个特优实施例中，这样的合成物和方法也包括 TPO 结合野生型 TPO-Rp 和/或本发明的寡肽的应用。

下列定义是为了说明和明确本发明所描述的各种术语的意义和范围。

术语“转化”或“转染”定义为使一个宿主细胞包含一个目的核酸分子的行为，包括天然的 TPO-Rp 核酸序列或者编码不是细胞原始的一部分的，或不在天然部位，不是天然拷贝数的或使用已知方法定向的本发明寡肽的核酸序列。

经过“可操作的连接”指一个基因和至少一个调控序列结合，当以一个合适的分子(例如转录激活蛋白)与调控序列结合的方式时，能够进行正义或反义表达。

术语“载体”指一个重组 DNA 结构，可能是从任何来源导出的质粒、病毒或自主复制序列、噬菌体、或核酸序列，线性或环状，单链或双链 DNA 或 RNA，其中一些核酸序列被连接或重组进一个特定结构，它能够引入一个用于一个被选择的基因产物的启动子片段和 DNA 序列，从正义或反义方向，与一个合适的的 3'非翻译序列进入细胞。

“质粒”是遗传元件，可以不成为它们宿主细胞染色体的一部分而稳定遗传。它们可以包含 DNA 或 RNA，可能是线性的或者环状的。质粒编码分子在细胞复制时保证了它们的复制和稳定遗传，而且可能编码了大量具有制药、农业和环境重要性的产物。他们还可以编码对抗生素有抗性的基因。质粒在分子生物学中，作为克隆和表达重组基因的载体被广泛运用。这里公开的起始质粒可以通过商业途径、公开途径得到，或者可以从可得的质粒通过常规使用的已知的公开的步骤构建。根据本发明可以使用的许多质粒和其他克隆和表达载体都是已知的，并且通过本领域的技术可以得到。另外，这些技术可以构建任何数量的其它适用于本发明的质粒。在本发明中，这些质粒和其他载体的性质、构建和使用对于本发明公开的技术是很明显的。

“宿主细胞”指一个经过遗传改变的细胞，它通过嵌合的、异源的或自体的核酸序列的迁移进行遗传改变，或者它的子代细胞仍然包含这个序列。这些细胞也称为“转基因细胞”。在自体的核酸序列被迁移的情况中，序列在宿主细胞中，在另外的遗传环境中或者在另外的方向上与天然发生的相

比有更高的拷贝数。

通过“固体支持”一个不溶的介质指无论是天然生物的，比如但不仅限于一个细胞或抗菌素微粒，或合成的，比如但不仅限于丙烯酰胺衍生物、纤维素、尼龙、硅土和或磁性的微粒，可溶的分子可以与它连接或结合。

术语“抗体”指一个多肽，由一个或多个免疫球蛋白基因或它的一部分编码。它特异结合和识别被分析物（抗原）。被识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ξ 和 μ 恒定区基因，以及无数的免疫球蛋白可变区基因。抗体以例如完整的免疫球蛋白或一些由不同的肽酶产生的特有的片段的方式存在。“抗体”也指经修改的抗体（如寡聚的，还原的，氧化的和标记的抗体）。这里使用的术语“抗体”，也包括通过那些整个抗体的修改或用重组 DNA 方法从头合成的抗体片段。术语“抗体”包括完整的分子和片段，这里，如 Fab、 $F(ab')_2$ 和 Fv，它们可以和抗原决定基结合。这些抗体片段保留了选择性结合它的抗原或受体的一些能力，定义如下：

1) Fab，包含一价抗体—结合的抗体分子片段。可以通过整个抗体用木瓜蛋白酶消化获得，产生一个完整的轻链和一个重链的一部分。

2) Fab' ，抗体分子的一部分，可以通过整个抗体用胃蛋白酶处理然后还原得到，产生一个完整的轻链和一部分重链；每个抗体分子得到 2 个 Fab' 片段。

3) $(Fab')_2$ ，抗体的片段，可以通过整个抗体用胃蛋白酶处理然后不经过还原得到。 $F(ab')_2$ 2 个 Fab' 由 2 个二硫键连接的二聚体。

4) Fv，定义为遗传工程片段，包含轻链的可变区域和重链的可变区域，表达为 2 条链；以及

5) 单链抗体（“SCA”），定义为遗传工程分子，包含轻链的可变区域，重链的可变区域，通过一个合适的多肽连接物连接，作为一个遗传融合单链分子。

合成这些片段的方法在本领域已知。（比如参见，Harlow 和 Lane，抗体：实验室手册，冷泉港实验室，纽约（1988））。

指定的免疫测定时，特异的抗体优先与特定的蛋白结合，不和大量存在于样品中的其它蛋白结合。在这样的情况下，与蛋白特异结合要求一个对特定蛋白特异的抗体。不同的免疫测定方式被用于选择对一个特定蛋白有特异免疫反应性的抗体。比如，固相 ELISA 免疫测定常规地用于选择对特定蛋白有特异免疫反应性的单克隆抗体。见 Harlow 和 Lane (1988) 抗体，实验室手册。冷泉港出版社，纽约。它描述了免疫测定的形式和能够用于决定特异免疫反应性的条件。

术语“免疫测定”指利用抗体或抗原与分析物，也可以是一个抗体或抗原特异结合的测定。免疫测定的特征是运用特定的抗体或抗原特异结合性质对被分析物进行检测、分离、定位和/或定量。抗原或者抗体可以被标记以能够被检测。

根据本发明，术语“治疗”指一个药物或药剂的预防和/或治疗作用。也就是说，定义为一个包含治疗或诊断有效的化合物和至少一个添加剂，例如载体结合的合成物。

“激动剂”指一个有生物活性的配体，与它的互补的有生物活性的受体结合，并激活受体，导致受体的一个生物应答或提高受体的生物活性。一个 TPO 激动剂与 TPO 受体 (TPO-R) 结合。TPO 激动剂可能表现为类似 TPO 模拟物。但是，TPO 激动剂也可能通过不同于那些 TPO 的结合位点或机制激活或有助于激活 TPO-R。

“拮抗剂”指一个有生物活性的配体，与它的互补的有生物活性的受体结合，并抑止、降低或消除 TPO-R 的活性，例如通过不同或相似于那些 TPO 的结合位点或机制的方式。

术语“制药可接受的盐”指无毒的碱金属、碱土金属和铵盐，通常使用的包括铵、钡、钙、锂、镁、钾、鱼精蛋白锌盐和钠盐。它们都用本领域已知的方法制备获得。这个术语也包括无毒，即制药可接受的酸添加盐，通常通过将本发明的寡肽和合适的有机或无机酸反应，例如醋酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、柠檬酸盐、延胡索酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、

本发明中，术语“抗原决定基”指一个抗原上的任何抗原决定簇，抗体的抗体结合部位结合于此。抗原决定基通常包括表面化学活性基团分子，如氨基酸或者糖侧链，而且通常有特异的三维结构和特异电荷特征。

本发明的蛋白及其片段的单克隆抗体也可以通过本领域已知的技术获得。通过运用杂交瘤细胞技术制备单克隆抗体的基本方法已经被知道。不死的抗体产生细胞系可以通过细胞融合制备，也可以通过其他技术获得，如 B 淋巴细胞和致瘤 DNA 的直接转化，或 Epstein-Barr 病毒转染。见例如：M. Schreier 等，“杂交瘤细胞技术”（1980）；Hammerling 等，“单克隆抗体和 T-细胞杂交瘤”（1981）；Kennett 等，“单克隆抗体”（1980）；也见美国专利号 4,341,761；4,399,121；4,427,783；4,444,887；4,452,570；4,466,917；4,472,500；4,491,632 和 4,496,890。目的蛋白，特别是 TPO-Rp 或本发明的寡肽及其片段的一组单克隆抗体可以通过不同的特性进行筛选，即同型、抗原决定基、亲和力等。可选择的，编码目的单克隆的基因可以通过 PCR 技术（这种技术在本领域已知）从杂交瘤细胞中分离、克隆，并在特别的合适的载体中表达。运用单个蛋白和其直接对应的免疫亲和技术，单克隆抗体在纯化中有作用。本发明的抗体，无论是多克隆或是单克隆都有另外的作用，他们可以作为免疫测定、RIA、ELISA 等的试剂。另外，他们可以被用于从细胞抽提液或细胞中检测和/或分离本发明的寡肽。这些抗体，例如，可以用于建立基于组织培养的测定，以发现或修饰调节 TPO-R 活性的新化合物，如模拟 TPO 活性。

人化的或嵌合的抗体可以包含来源于两个不同物种的部分（如人的恒定区和鼠的结合区域）。来源于两个不同物种的部分可以通过传统化学技术结合在一起，或用遗传工程技术制备成单个融合蛋白。编码嵌合抗体两个部分蛋白的 DNA 可以作为单个融合蛋白表达。

在一群异源蛋白和其他生物制剂存在的情况下，当抗体能够进行一个结合反应，而这个反应对鉴定某个蛋白是否存在是决定性的，称这个抗体与一个蛋白“特异结合”或对这个蛋白“有特异的免疫反应性”。因此，在

乳酸盐、月桂酸盐、马来酸盐、乙-苯磺酸盐、油酸盐、草酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、戊酸盐等。

术语“制药可接受的酸添加盐”指保留了生物有效性和自由碱性性质的盐，它们是非生物的还是其它不需要的，由无机酸，如氢溴酸、盐酸、硝酸、磷酸、硫酸，和有机酸如醋酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、利尿酸、延胡索酸、乙醇酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、苦杏仁酸、薄荷烷磺酸、草酸、丙酸、p-甲苯亚磺酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、酒石酸等形成。

术语“制药可接受的酯”指酯键水解后，其成分保留了生物有效性和其组成性质的，即羧酸或乙醇以及非生物的还是其它不需要的酯。本发明也计划利用这些既是以上描述的酯，也同时是其制药可接受的酸添加盐的合成物。

本发明的盐可以通过将自由的寡肽和一个合适的碱溶解在水或水/乙醇溶剂或其它合适的溶剂中获得，然后通过蒸发溶液、冷冻和冻干或向含有寡核苷酸盐的水或乙醇溶液加入其它的溶剂（如二乙醚）分离本发明获得的盐，包括不可溶盐的分离。至于盐的形成，通常由1或最多2摩尔碱基，即阳离子，和1摩尔自由寡肽组成。为了制备碱寡肽盐，优先的使用碱金属碳酸盐或碳酸氢盐。制备的肽盐可以自由溶解于水。因此，本发明也涉及制备寡肽盐的工艺。

本发明中，碱基被认为作为可以在溶液中，特别是在水或乙醇溶液中，形成阳离子的物质。

术语“制药可接受的氨基化合物”指氨基键水解后，其成分保留了生物有效性和羧酸或胺性质的，以及非生物的还是其它不需要的氨基化合物。这些氨基化合物代表性的由相应的羧酸和胺构成。本发明也计划利用这些既是以上描述的氨基化合物，也同时是其制药可接受的酸添加盐的合成物。

制备制药可接受的酯和氨基化合物的技术比如公开在 March Advanced Organic Chemistry, 3rd Ed., John Wiley & Sons, 纽约 (1985) p.1152. 制药可接受的酯和氨基化合物可用作药物前体，公开在 Bundgaard, H., ed., (1985) 药

物前体的设计，Elsevier Science Publishers，阿姆斯特丹。

术语“制药或治疗可接受的载体”指不妨碍活性成分的生物活性有效性的，并且对宿主或患者无毒的载体媒介。

本发明的寡肽和合成物应用的“治疗或制药有效的量”指足够诱导目的生物效果的寡肽和合成物的量。这个效果可以是征兆、现象的缓和，或导致疾病，或任何其它生物系统中预期的改变。在本发明中，效果将在一优选实施例中涉及 TPO 模拟活性，即选择的防止、消除和/或降低血小板减少症的征兆，比如提高血小板的数量，和/或防止血小板数量的降低。

本发明的寡肽的氨基酸残基被传统地缩写如下：苯丙氨酸为 Phe 或 F；亮氨酸为 Leu 或 L；异亮氨酸为 Ile 或 I；蛋氨酸为 Met 或 M；缬氨酸为 Val 或 V；丝氨酸为 Ser 或 S；脯氨酸为 Pro 或 P；苏氨酸为 Thr 或 T；丙氨酸为 Ala 或 A；酪氨酸为 Tyr 或 Y；组氨酸为 His 或 H；谷氨酰胺为 Gln 或 Q；天冬酰胺为 Asn 或 N；赖氨酸为 Lys 或 K；天冬氨酸为 Asp 或 D；谷氨酸为 Glu 或 E；半胱氨酸为 Cys 或 C；色氨酸为 Trp 或 W；精氨酸为 Arg 或 R；以及甘氨酸为 Gly 或 G。

这样，比如连续的 ARG，为一个有丙氨酸、精氨酸和甘氨酸组成的三肽，而连续的 RAR 是精氨酸、丙氨酸和精氨酸。

本发明不仅涉及特别异在 SEQ ID No. 1-6 中提到的寡肽，还涉及其生物等价物，即有不同结构但表现出相似或可比的生物效应的代替物，特别是其衍生物，它有相似或可比的结构和/或功能，并作为 TPO-R 调节子。这些生物等价物，特别是其衍生物，可能和本发明的寡肽在对水解或蛋白质水解的易感性上和/或其它生物性质上，如对 TPO 受体亲和力的增加有所不同。因此，本发明也涉及了例如制药可接受的本发明的寡肽盐、氨基化合物或酯。

因此，除了包含天然存在的氨基酸的寡肽，也提供了肽模拟物或肽类似物。肽类似物通常作为与那些模板氨基酸性质类似的非肽药物。这些类型的非肽化合物被称为“肽的模拟物”或“肽模拟物”。与治疗有用的肽结

构相似的肽的模拟物可以用于制备等价物或提高治疗或预防疾病的效果。通常的，肽模拟物与典型多肽结构相似（典型多肽指具有生物或制药活性的多肽），如天然存在的受体结合多肽，但有一个或更多的肽连接键选择性地通过本领域已知的方法被以下的连接键替换，包括： $-\text{CH}_2\text{-NH-NH-}$ 、 $-\text{C-CH}_2\text{-S-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $-\text{CH=CH-}$ （顺式和反式）， $-\text{COCH}_2\text{-}$ 、 $-\text{CH(OH)-CH}_2\text{-}$ 和 $-\text{CH}_2\text{-SO-}$ 。特别的非肽连接键是 $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 。相比多肽，这样的肽的模拟物可能有显著的优势，体现在包括，例如：提高化学稳定性，提高制药特性（半衰期、吸收、效能、效率等），改变了专一性以更节约地制备（如广谱的生物活性），降低抗原性等。肽模拟物的标记通常涉及与一个或多个标记直接的或者通过间隔区（如氨基）与肽模拟物上的非干扰位点共价连接。肽模拟物通过大量结构-活性数据和/或分子模型被预测。这样的非干扰位点通常是不和那些与肽模拟物结合使产生治疗效果的大分子（如免疫球蛋白超家族分子）形成直接接触的位点。衍生作用如肽的模拟物的标记不能实质地干扰它预想的生物或制药活性。通常，受体结合肽的肽的模拟物与受体结合有高亲和力，并具有可检测的生物活性，即激动或拮抗一个或更多的受体介导的表型的改变。

本发明中，一个或更多的 L-氨基酸替换为同型的 D-氨基酸（如 D-赖氨酸代替 L-赖氨酸）可能被用于产生更多稳定的肽。

另外，本发明涉及一种寡肽，它包含有以上通式确定的一致序列或实质上相同的已知序列地变体，它可以通过本领域已知的方法产生，比如加入内在的半胱氨酸残基能够形成分子内二硫键，使肽环化。

本发明不仅涉及以上线性化形式的寡肽，当然也涉及环化的寡肽，比如通过第一个和最后一个氨基酸的氨基键形成的环化。

“合成的或者不是天然发生的氨基酸”指在体内不是天然存在的，但可以和本发明的寡肽合成一体的氨基酸。其它优先的合成氨基酸包括那些氨基酸，其氨基基团通过一个以上的碳原子（如 β -丙氨酸或 γ -氨基丁酸）与羧基基团分离。特别优先的合成氨基酸包括天然发生的 L-氨基酸的 D-氨

基酸，L-1-萘-丙胺酸，L-2-萘丙胺酸，L-环己基丙胺酸，L-2-氨基异丁酸，蛋氨酸的亚砷和砷衍生物。

“可检测的标记”指一类物质，当与寡肽、寡肽模拟物和/或本发明的抗体物质共价结合的时候，在体内或体外系统里能够检测体内的寡肽和寡肽的模拟物，例如寡肽或寡肽的模拟物被给予的患者。合适的可检测标记在本领域已知，例如通过放射性同位素和荧光标记（如荧光素）。

可检测的标记与寡肽或寡肽模拟物的共价结合通过本领域已知的传统方法完成。比如，当¹²⁵I放射性同位素应用于可检测的标记，¹²⁵I与寡肽或寡肽模拟物的共价结合可以通过与氨基酸酪氨酸结合进入寡肽或寡肽的模拟物，然后用碘处理寡肽。同样，³²P可以作为磷酸部分通过例如肽或肽模拟物的羟基基团，和寡肽或寡肽的模拟物结合。

本发明的寡肽可以通过本领域已知的传统方法制备，例如通过使用标准固相技术。标准的方法包括，但不限于，专用的固相合成，部分固相合成方，片段浓缩，经典固相合成，以及重组DNA技术。本发明的寡肽因此可以直接通过重组技术来制备（见Sambrook等，分子克隆：实验室手册，CSHL出版社，冷泉港，纽约1989），或作为融合蛋白，例如对于一个特异结合对中的一个蛋白，通过亲和试剂可以纯化融合蛋白，然后，通常在得到目标肽的位点用蛋白水解切开。

寡肽可能扩展以提供方便的结合位点（如半胱氨酸或赖氨酸），提高稳定性，结合特定受体，提供位点一直接反应，提供简便的纯化，改变物理性质（如可溶性，电荷等），稳定构像等。通过连接基团或通过半胱氨酸（二硫键）或肽键共价连接，寡肽可以作为融合蛋白加入非野生型侧面区域。寡肽可以通过各种具有两种不同功能的试剂连接，如马来酸酯苯甲酸，甲基二硫代乙酸，巯基苯甲酸，S-吡啶二硫代丙酰胺等。为了促进目标寡肽的抗体的制备，寡肽可以在氨基酸链的N或C末端或者当中加入单个氨基酸。例如，本发明的寡肽可以和一个产生免疫性的蛋白共价连接，如锁眼帽贝血青蛋白，卵清蛋白等。

本发明的寡肽可以与其它肽和蛋白连接表达，使得在中间或者在 N 或 C 末端成为链的一部分。这样的融合寡肽被称为融合或共轭肽。不同的表达后可以进行修饰，包括糖基化。例如，通过应用合适的编码序列，法呢基化或异戊二烯基可以被提供，这样目标肽就可以和一个末端的脂类基团结合，并且可以插入脂膜，如脂质体。本发明的寡肽可以 PEG 化，这里聚乙烯基团提高了其在血液中的寿命。本发明的寡肽也可以和血清蛋白（如白蛋白）连接。寡肽可以通过蛋白融合或通过连接其它蛋白结合，如 IgG 同型的 Fc，以提高互补结合，或和一个毒素，如蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素，或其类似物，特别是 A 链。寡肽可能和用于位点直接反应的抗体连接。本发明因此也提供了包含本发明的寡肽的共轭肽。

本发明的寡肽可以作为具有相似生物活性的非肽化合物的结构模型。本领域的各种技术可以用于构建与本寡肽有相同或相似预期生物活性的，但是在溶解度、稳定性和对水解和蛋白酶水解的敏感度上有更多更好活性的化合物。这些技术包括用由磷酸盐、氨基化合物、碳酸盐、磺酰胺、二级胺和 N-甲基氨基酸组成的骨架代替肽骨架。

因此，本发明也涉及重组制备本发明的寡肽。

因此，本发明涉及编码 SEQ ID No.1-7 的寡肽的核酸序列。由于遗传密码的简并，这些寡肽包含多于 6 种不同的核酸序列。当然，本发明也涉及通过例如核酸增加、缺失、插入或倒置以上核酸的突变的序列，只要具有本发明预期的 TPO-R 调节子作用。

本发明也涉及包含以上核酸序列的载体，可以使用传统的材料和技术导入宿主系统，并表达。DNA 元件，如启动子、增强子、聚腺苷化位点、转录中止信号等，应该和核酸序列关联，以启动并调控表达。使用的特异调控元件将依赖于被选择的用于表达的宿主系统是否被期望分泌寡肽或共轭肽。在一优选实施例中，本发明的载体为细菌、病毒、哺乳动物或酵母的载体，在一特优实施例中包含以上确定的能够在合适的宿主细胞里直接表达的核酸序列的 5'和/或 3'调控元件。

各种载体被用来作为在宿主细胞中导入本发明寡肽并表达的媒介物。已知这些载体在不同的宿主细胞类型中有作用，包括，例如哺乳动物表达载体 pSG5 (Stratagene), p-RKI (Genetics Institute), P-SVK3 (Pharmacia), p-EUK-CI (Clontech), pCDM (Invitrogen), pc DNA1 (Invitrogen), 和细菌表达载体 pFLAG-1 (IBI), 所有的 pET 系统质粒(Novagen), pTrcHis (Invitrogen), pGEX 系列(Pharmacia)和 pKK 233-2 (Clontech). 这些载体可以在宿主细胞中作为附加体存在，或者可以促进该核酸序列整合到宿主细胞基因组上，或两者皆有。载体也包括其它有用的特征，如使成功引入载体的细胞能够被选择或检测的基因。

适合本发明的核酸序列表达的宿主细胞包括，但不仅限于原核的和真核的宿主，如枯草杆菌、大肠杆菌、酵母、非洲爪蟾卵母细胞、昆虫细胞、植物细胞和各种哺乳动物细胞类型，包括特别的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞、Hela 细胞、L(tk-)细胞、原始培养、Cos17 细胞、Cos1 细胞、幼仓鼠肾细胞和 CV1 细胞。

本发明的宿主细胞也包括提供糖基化。

本发明也涉及通过转染上述确定的载体遗传地改变细胞的方法。转染可以通过传统的方法，如生物的、物理的、化学的或电诱导转染实现。特别是电穿孔、细胞融合、逆转录酶病毒或病毒介导基因转移、脂质体介导基因转移或粒子轰击法。

本发明也涉及制备非人的能够在其细胞里产生本发明的寡肽的哺乳动物的方法，这里，本发明的核酸序列被导入一个非人的哺乳动物细胞，特别不晚于 8-细胞-，优先 1-细胞-阶段，然后在合适的条件下培养，以得到成熟的分化了的动物。这样的动物可以在它们的生殖细胞或体细胞，特别是在它们的染色体中包含本发明的核酸序列，能够表达本发明的寡肽。本发明的一个特优实施例在于哺乳动物是啮齿动物或灵长类动物。这样的方法使各种方式的基因治疗成为可能，如体细胞基因治疗或生殖细胞基因治疗。

本发明也包括特别是对转基因动物，更特别的是哺乳动物，最特别的灵长类和小鼠及其细胞的遗传控制。这些动物的至少一些细胞中包含比如在调控元件的控制下被转染的本发明的核酸序列的正义或反义结构，这对研究和诊断目的是有用的，因为改变了 TPO-R 的活性。通过用本发明的正义或反义的核酸序列，如倒置、缺失、插入、添加等的改变使转基因动物中的 TPO-R 改变，并得到这样的被遗传控制的动物是可能的。在本发明的一个实施例中，本发明的载体或寡核苷酸被转染并整合到非人的哺乳动物细胞的染色体上，以表达能够调控 TPO-R 活性的寡肽。在本发明的另一个实施例中，本发明的载体和寡核苷酸通过同源重组，转染并插入基因组，特别是外源 TPO-R 基因，以制备动物表达改变了的 TPO-R。因此，本发明也涉及被遗传改变的动物，特别是相比野生型动物，表现了改变的 TPO-R 功能的转基因动物。这样的在哺乳动物中，特别是在非人的哺乳动物细胞中的功能改变是由于导入了本发明的反义或正义结构可能包含了核酸序列改变和/或是由于外源核酸序列对 TPO-R 的控制。依靠这些改变，如插入其它突变，或根据本发明设计的没有突变的 TPO-R_p 编码序列的正义或反义的拷贝，或外源基因的改变，可能能够获得对上述定义的目的有用的动物。本发明因此也涉及单个包含上述定义的改变的非人的哺乳动物细胞或细胞培养。

本发明也涉及一个制备本发明的寡肽的方法，包括根据该方法转染载体进入细胞，在培养基中，在能表达寡肽的条件下培养细胞，并且用传统技术从细胞或培养基中回收寡肽。

本发明也涉及特别与本发明的寡肽结合的单克隆或多克隆抗体或其片段。这些抗体可用于检测和分离本发明的寡肽及其结构类似物，甚至 TPO-R 本身。如果寡肽或 TPO-R 存在于包含 TPO-R 或寡肽的来源中，如细胞、部分细胞、细胞器官，检测或分离前进一步的操作是必须的，例如破坏生物材料，如酶的细胞溶菌作用的传统方法。

本发明也涉及特异识别和结合上述抗体的单克隆或多克隆抗体。

本发明也涉及从包含寡肽的混合物中检测和/或分离本发明的寡肽的免疫测定：加入本发明的抗体到混合物中，寡肽被检测和/或分离。相反的，免疫测定可以通过利用本发明的寡肽作为探针检测本发明的抗体。

本发明的寡肽在体外作为独特的分析 TPO 生物作用的工具，包括评估涉及 TPO 制备和受体结合过程的许多因素。本发明的寡肽也对开发其他结合和激活 TPO-R 的化合物有作用，因为该寡肽提供了很多结构与激活关系的重要信息。

本发明的寡肽也在筛选进一步的 TPO 受体激动剂的测定中作为竞争性结合物。本发明的寡肽可不经改变而使用，或者可以经修饰共价或非共价地与直接或间接提供可检测信号的标记部分连接。直接标记标记基团包括如：放射性标记、酶如过氧化物酶和碱性磷酸酯酶以及能够检测荧光强度、波长变化或荧光极化的荧光标记。间接标记包括使一个组件与生物素连接，然后与偶合了上述标记基团的抗生物素蛋白结合。在化合物和固体支持物结合的情况下，这些化合物还包括间隔物。

基于它们结合 TPO 受体的能力，本发明的寡肽可以用于检测在膜上、细胞组织上、代谢区上、活细胞上、固定细胞上、生物流体中、组织匀浆中、纯化的天然生物物质中、原始抽提物中等的 TPO 受体的试剂。例如，通过标记该寡肽，可以确定表面是否有 TPO-R。进一步，基于它们结合 TPO-R 的能力，本发明的寡肽可以用于原位染色法、FACS（荧光-激活细胞分类）、Western blotting，ELISA 等。另外，基于它们结合 TPO-R 的能力，本发明的寡肽可用于分离和纯化 TPO-R 的方法，或分离和纯化在细胞表面上或被渗透的细胞里表达 TPO-R 的细胞。

本发明也涉及了本发明的寡肽用传统方法被固定后（如在固体支持物上），用于筛选和分离过程。在本发明的一个实施例中，特别是本发明的筛选测定，寡肽不扩散地与一个含有被分离样品接收区域的不溶性支持物（如微量滴定盘）结合。该不溶性支持物可以用任何能够结合寡肽或受体，能够与可溶性物质分开，而且与筛选方法相容的合成物制造。这些支持物的

表面是固体的或多孔的，以及任何可行的形状。合适的不可溶性支持物包括微量滴定盘、膜和珠。典型的由玻璃、塑料制成，如聚苯乙烯、多聚糖、尼龙或硝酸纤维素。

当然，本发明也涉及上述分离和筛选方法：用寡肽和/或抗体进行高通量抗体筛选和/或分离方法，例如在没有用固定试剂的溶液中。

本发明的寡肽也可以作为商业化的试剂用于各种药物研究和诊断。这样的应用包括但不限于：（1）在许多功能测定中，作为 TPO 或潜在的 TPO 激动剂的活性定量检测标准；（2）用于维持 TPO 依赖细胞系的增生和生长；（3）通过共结晶方法用于 TPO-受体的结构分析；（4）用于研究 TPO 信号传导/受体激活的机制；以及（5）其它研究和诊断应用，在这些应用中，TPO-受体很好的被活化，或者通过 TPO 或其激动剂已知的量这样的活化容易被测定。

本发明的寡肽可用于体外巨核细胞和它们祖先的增大，与细胞因子（如 TPO）共同作用或单独使用。化疗和放疗通过杀死快速分裂的，较成熟的巨核细胞群导致了血小板减少症。但是，这些治疗方法也可以降低不成熟的、有丝分裂活性较低的巨核细胞前体细胞。因此，在本发明的一个实施例中，本发明寡肽能够使血小板减少症得到改善通过经过化疗或放疗的患者和患者自身的细胞经过体外培养获得的巨核细胞和未成熟的前体细胞进行比较被证明。

本发明的寡肽和/或野生型的 TPO-Rp 和/或与其特异结合的抗体也可以作用于动物，包括哺乳动物，如啮齿动物和灵长类动物，包括人，以调节，特别是在体内激活 TPO-R 和/或增加或维持现存的血小板数量。这样，本发明包含 TPO 相关疾病的治疗方法，包括给予足够量的本发明的寡肽，以调节体内 TPO-R 的作用。例如，给予本发明的寡肽和合成物可以治疗各种血液疾病，包括但不限于血小板紊乱和血小板减少症，特别是当与骨髓移植、放疗和化疗相关的情况下。这样的给药也包括 TPO 的应用。

因此，本发明也涉及调节特别是增加或减少 TPO-R 活性的方法，这里

无论 TPO 的存在与否，本发明的寡肽或与其特异结合的抗体都可应用于 TPO-R。这样的方法可以是体内或体外的方法。

在一个优选实施例中，本发明的寡肽和合成物预防地在化疗、放疗或骨髓移植之前或同时，或在这样的辐照(exposure) 之后给药。

因此，本发明也提供制药合成物，包括作为一种活性成分，至少有一个本发明的寡肽和/或 TPO-Rp 野生型寡肽，与一个制药载体或稀释液相连。本发明的合成物可以系统地或局部地给药，特别是通过血管内口的、肺部的、注射的，如肌肉的、腹膜内的、静脉内的（IV）或皮下的注射或吸入，如通过一个提炼的粉末形式，通过皮肤的、鼻的、阴道的、直肠的，或给药的舌下途径，也可以用适合每个给药途径的服用药形式。本发明的寡肽和/或 TPO-Rp 野生型寡肽可用于制药可接受的盐、酸添加盐、酯、氨基化合物和/或自由碱基的形式的合成物，优先为制药有效的剂量。

用于口服给药的固体服用药形式包括胶囊、lingualettes、片剂、药丸、粉末、脂质体、小块、时间延迟的包衣、颗粒。在这样的固体服用药形式中，活性化合物和至少一种惰性制药可接受的载体，如乳糖、蔗糖或淀粉混合。这样的固体服用药形式也可以包含除了惰性稀释剂的其它物质，例如润滑剂如硬脂酸镁。在胶囊、片剂和药丸的情况下，服用药形式也包含膨胀剂和/或缓冲剂，以及食用香料。片剂和药丸可以另外加入肠衣制备。

用于口服给药的液体服用药形式包括制药可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆，和本领域通常使用的包含惰性稀释剂的万用药，如水。除了这样的惰性稀释剂，合成物也可以包含佐剂，如改变渗透压的盐、pH-调节化合物、皮肤渗透剂、湿润剂、乳化剂和悬浊剂和甜味剂、食用香料和香味剂。

根据本发明，用于注射给药的制药合成物包括消过毒的水或非水溶液、悬浮液或乳液。非水溶液或介质包括例如丙二醇、聚乙二醇、植物油，如橄榄油和谷类油、胶质、和可注射的有机酯，如乙烷基油酸盐。这样的服用药形式也可能包括佐剂，如防止、湿润、乳化和分散剂。它们可以通过，

例如用阻止细菌的过滤器过滤，将消毒剂与合成物结合，放射照射合成物、或加入合成物消毒。它们也可以在用之前用无菌水，或其它一些无菌的可注射的介质制备。

注射的形式包含生理可接受的介质，如水、盐水、PBS、乙醇溶液、己二酸乙二醇溶液和类似物。可溶于水的防腐剂将被采用，包括亚硫酸氢钠、三磷酸钠、抗坏血酸盐、杀藻胺、氯丁醇、硫柳汞、苯汞基硼酸盐、parabens、苄基乙醇和苯基乙醇。这些试剂的含量可以以个人质量的约 0.001 到约 5%，更好的从约 0.001 到约 2% 存在。合适的可被采用的可溶于水的缓冲剂是碱或碱土碳酸盐、磷酸盐、重碳酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐、醋酸盐、琥珀酸盐和类似物，如钠磷酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐、醋酸盐、重碳酸盐和碳酸盐。添加剂，如羧甲基纤维素可以作为载体，含量从质量的约 0.001 到约 5%。形式的变化依赖于形式的目的，可以使用特别的形式以调节受体活性，实现计划的治疗等。

用于直肠或阴道给药的合成物优先为栓剂，除了活性物质，还可以包含赋形剂，如可可油或栓剂蜡。用于鼻腔或舌下给药的合成物也用本领域已知的标准赋形剂制备。

包含本发明寡肽和/或野生型 TPO-Rp 的合成物可以用于预防和/或治疗。在用于治疗中，对于治愈或者至少部分减轻病症和其并发症的足够量，即治疗有效剂量的合成物给予已经患如以上描述的疾病的患者。

在预防应用中，包含本发明寡肽和/或野生型 TPO-Rp 的合成物给予对于特定疾病易感或有危险的患者。这样的剂量定义为“预防有效剂量”。在这个应用中，精确的剂量依赖于患者的健康状况和体重。

本发明的制药合成物也可以以沉淀物的形式给药，如缓释合成物。这样的缓释合成物包含存在于基质上例如由胶原质制成的微粒。

有效治疗所需的本发明的 TPO 激动剂的量依赖于许多不同的因素，包括给药方法、靶位点、患者的生理状况和其它给予的药物。

当每天给药的剂量范围为哺乳动物体重的约 0.03mg 到 10mg/kg，特别

是约 0.03mg 到 1mg/kg 时，本发明的寡肽和/或野生型 TPO-Rp 在治疗 TPO 介导的情况下有效。特异的剂量由特定的治疗情况、给药途径控制，以及通过主治医师根据各种因素，如情况的严重程度、年龄、基本状况等判断。

本发明的寡肽和/或野生型 TPO-Rp 可以单独给药或和 TPO 一起给药。由于 TPO 提高了本寡肽的效率，后者的剂量可能降低 50% 或 25% (与 TPO 应用的调节剂量相反)。

本发明的合成物，优先的水溶性的合成物，可以进一步包含一个可注射入体液的，在本发明的每一单位剂量浓度下不显示出实质制药活性的水溶性蛋白。(以下称为“水溶性蛋白”)。这样的水溶性蛋白中，优先为血清白蛋白、球蛋白、胶原质和/或胶质。这个蛋白可以以一个普遍使用的剂量加入到可注射的制药合成物中。这样，例如水溶性蛋白和本发明的寡肽的比重为约 0.0001: 1 到 100: 1，优先为约 0.001: 1 到 10: 1，或更优先的约 0.01: 1 到约 1: 1。

继续的，本发明也涉及上述的寡肽本身和包含它们的合成物，特别的，以干燥和/或纯化的形式或在水或水/乙醇溶液中存在。由可溶性合成物或本发明的肽盐制备的溶液的 pH 应该不对制药活性多肽的活性产生任何不利的影 响，但是处在一个通常注射可接受的范围；进一步，这样的 pH 不能导致溶液粘度产生很大的改变，也不能形成沉淀或沉淀类似物。因此，溶液的 pH 应该优选为 4-7，更优为 5-6，特别是 5.3-5.5。

当本发明的水溶性合成物转换为用于给药的水溶液时，制药活性寡肽或其盐在所述溶液中的浓度应优选为约 0.0000001 到 10%(w/v)，更优的约 0.000001 到 5%(w/v)，或最优的约 0.00001 到 1%(w/v)。

本发明的合成物应该优选的具有一个包含本发明制药活性寡肽的单位剂量形式，并且如果需要，加入其它添加剂，如上述提到的水溶性蛋白。这样，例如，上述提到的 2 或 3 个成分溶解或悬浮在无菌水或无菌生理盐水中，装入安瓿剂或管形瓶。在这种情况下，制备方法可以包括混合制药活性寡肽盐溶液和进一步，如果需要添加剂溶液，或加入粉末状的添加剂

到制药活性寡肽盐溶液或任何其它适当的结合过程。给药形式也通过加入无菌水或无菌生理盐水到含有制药活性寡肽盐的冻干或真空的粉末，如果需要添加剂，就共同存在。单位给药形式可以包含一个或更多的传统添加剂，如 pH 调节试剂（如氨基乙酸、盐酸、氢氧化钠）、局部麻醉剂（如利多卡因氢氯化物、氯代丁醇）、同中子素化试剂（如氯化钠、甘露醇、山梨醇）、乳化剂、吸收抑制剂（如 Tween[®]60 或 80）、滑石、淀粉、乳糖和黄芪胶、硬脂酸镁、甘油、丙烯乙二醇、防腐剂，苜基乙醇、甲基羟基安息香酸盐和/或发烟硫酸二十烷醇氢。这个单位给药形式可以进一步包含制药可接受的成分，如聚乙烯乙二醇 400 或右旋糖苷。

本发明的合成物根据传统方法混合这些成分制成。混合本发明合成物的目的应该是维持制药活性寡肽的活性，而且气泡反应在过程中应最小化。同时或以任何顺序，将各种成分放在一个容器里（如瓶子或圆桶里）。容器里的空气可以是，例如，无菌洁净的空气或无菌的氮气。合成的溶液可以被转移到小瓶或安瓿中，可以进一步冻干。

本发明的合成物的液体形式或冻干粉末形式可以溶解或分散到生物可降解的聚合体溶剂中，如聚（乳酸-乙醇酸）共聚物、聚（羟基丁酸）、聚（羟基丁酸-乙醇酸）共聚物或它们的混合，然后可能被定型到，如，薄膜、微胶囊（微球体）、或毫微胶囊（毫微球体）中，特别是以软或硬的胶囊形式。

另外，装入脂质体胶囊，包括磷脂、胆固醇或它们的衍生物的本发明的合成物可以进一步分散到生理盐水或溶于生理盐水的透明质酸溶液中。

软胶囊可以用本发明的合成物的液体形式填充。硬胶囊可以用本发明的合成物的冻干粉末填充，或者本发明的合成物的冻干粉末可以包含在片剂里，分别用于直肠给药或口服。

当然，本发明的合成物可以以预先填充注射器的形式提供自我给药。

本发明也涉及本发明寡肽和野生型 TPO-Rp，编码这些寡肽的核酸序列，本发明的载体，本发明的宿主细胞和/或本发明的抗体用于制备诊断或

者治疗血液病，特别是血小板减少症的药物。

最后，本发明涉及用于诊断血液病，特别是血小板减少症的诊断合成物。包括本发明的寡肽和野生型 TPO-Rp，编码这些寡肽的核酸序列，本发明的载体，本发明的宿主细胞和/或本发明的抗体，选择性的和可接受的载体连接。在本发明一个特优实施例中，用以上的方法标记可以用于本发明诊断合成物的上述提到的试剂。因此，本发明标记的寡肽，标记的核酸序列，标记的细胞和/或标记的抗体可用于特异检测 TPO-R 相关的情况，特别是疾病。相似的，就如上面解释的，标记的试剂可用于鉴定和分离潜在的更多的药物。

尽管以上只特别描述了本发明优选实施例，在不背离本发明的精神和可能的范围的情况下，修改和改变本发明是可以的，本发明进一步的优选实施例列举在权利要求中。

SEQ ID No. 1 到 7 代表本发明的寡肽的氨基酸序列。

根据在全长（也被称为野生型）TPO-Rp 中的位置，肽的长度用第一个和最后一个氨基酸数字确定。WO 99/42127 中公开了关于 TPO-Rp 野生型的氨基酸序列和它的制备，完全和目前的知识一致。单个氨基酸的替换用传统的命名法命名，如“R9A”——描述了 TPO-Rp 野生型中的原始第 9 位的精氨酸残基被替换成丙胺酸。

附图说明

图 1 本发明的寡肽对用卡铂处理（180mg/kg）的小鼠的作用，

图 2 本发明的寡肽对用卡铂处理（200mg/kg）的小鼠的作用，

图 3 到 6 根据 HPLC 图谱进行稳定性研究的结果，

（图 3 第 0 天，30nmole 干粉重新制成 1mM 溶液中，

图 4A 第 2 天，样品以 1mM 溶液贮存，

图 4B 第 2 天，样品以干粉贮存，

图 5A 第 9 天，样品以 1mM 溶液贮存，

图 5B 第 9 天, 样品以干粉贮存,

图 6A 第 14 天, 样品以 1mM 溶液贮存,

图 6B 第 14 天, 样品以干粉贮存。

具体实施方式

实施例 1:

TPO-Rp (野生型和本发明的寡肽) 在治疗卡铂诱导的血小板减少症中的作用: I

方法:

体内实验的模型早前已经被报导(Akahori 等 (1996) 干细胞 14:678-689, Akahori 等 (1996) Br. J. Haematol. 94:722-728, Shibuya 等 (1998) 血液 91:37-45, Andrews 等(1996) 干细胞 14:661-677)。下面简要说明了引入的改进和修改。

定量给药时间表

每个测试组 (PBS、TPO 或 TPO-Rp) 用腹腔内注射的方式以单日剂量给药。日剂量开始于第 0 日, 持续整个试验期 (第 10 日)。在第 0 日和第 4 日两次腹腔内注射卡铂, 每次 90mg/kg(组 11 为 PBS)。

血液取样

第 0 日 (基础的)、第 8、11、14、18 日的血液进行采集。血液通过从小鼠 (8 周大的雄鼠 C57BL/6Y) 尾部取样获得, 然后烧灼。每个小鼠 80 μ l 的血液采样到肝素化的血液收集管中。80 μ l 的血液然后与 160 μ l 包含足够 EDTA (0.225%) 的盐水混合, 以防止凝血。

通过小鼠的卡铂诱导的血小板减少症, 检测体内 SEQ ID No.2(TPO-Rp, 1-18, R9A, R11A)和 No. 4 (TPO-Rp, 4-18, R9A, R11A)的 TPO-Rp 的效果和野生型肽(TPO-Rp 野生型, 氨基酸序列: A R G G T L E L R P R S R Y R L Q L R A R L N)的效果。卡铂用于诱导血小板减少症。为了能够用与临床情况尽可能相似的模型实验, 一个先前报道过的卡铂模型被认真研究并进行了修

改。(Akahori 等 (1996) 干细胞 14:678-689, Akahori 等 (1996) Br. J. Haematol. 94:722-728, Shibuya 等 (1998)血液 91:37-45, Andrews 等(1996) 干细胞 14:661-677)。另外, 为了用对给予的药物显示最高反应, 而同时最小压力的动物进行实验(见上述方法), 使动物出血的方法也被认真研究。卡铂的剂量被增加到了 180mg/kg, 分两次腹腔内注射, 分别在第 0 天(一半剂量)和第 4 天(另一半剂量)。在第 8 天, 卡铂诱导了严重的血小板减少症。

使用的动物组显示在表 I.

表 I “体内”研究的实验组

组	总剂量	动物
1	卡铂 ^a +TPO-Rp 野生型 0.03 mg/kg/day	8
2	卡铂 ^a +TPO-Rp 野生型 0.30 mg/kg/day	8
3	卡铂 ^a +TPO-Rp 野生型 0.90 mg/kg/day	8
4	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.03 mg/kg/day	8
5	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.30 mg/kg/day	8
6	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.90 mg/kg/day	8
7	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.03 mg/kg/day	8
8	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.30 mg/kg/day	8
9	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.90 mg/kg/day	8
10	卡铂 ^a +TPO 2.4 µg/kg/day	8
11	无卡铂	8
12	卡铂 ^a 单独	12

^a第 0 日和第 4 日两次注射卡铂, 每次 90mg/kg。

图 1 显示了在卡铂处理的小鼠中血小板数量的剧烈下降, 并且概述了上述提到的不同实验组的实验结果。结果用个体动物基础值的百分数变化表达。图 1 显示, 剂量为 300µg/kg/天和 30µg/kg/天的野生型肽 TPO-Rp 显著提高了血小板数量。需要指出, 在这样很高的卡铂剂量时, 先前使用有

第 0 日（基础的）、第 8、11、14、18 日的血液进行采集。血液通过从小鼠（8 周大的雄鼠 C57BL/6Y）尾部取样获得，然后烧灼。每个小鼠 80 μ l 的血液采样到肝素化的血液收集管中。80 μ l 的血液然后与 160 μ l 包含足够 EDTA（0.225%）的盐水混合，以防止凝血。

卡铂的剂量被增加到了 200mg/kg，作为积累剂量，分两次腹腔内注射，分别在第 0 天（一半剂量）和第 4 天（另一半剂量）。在第 7 天，卡铂诱导了严重的血小板减少症。

使用的动物组显示在表 II.

表 II “体内”研究的实验组

组	总剂量	给药日期
1	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	0 到 13
2	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	0
3	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	0 和 4
4	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	0, 4 和 8
5	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	0, 4, 8 和 12
6	卡铂 ^a +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/day	8 和 14
7	卡铂 ^a +TPO, 2.4 μ g/kg/day	0 到 13
8	卡铂 ^a +TPO, 10 μ g/kg/day	0 到 13
9	卡铂 ^a +TPO, 10 μ g/kg/day	8 到 14
10	无卡铂	—
11	卡铂 ^a 单独	0 和 4

^a第 0 日和第 4 日两次注射卡铂，每次 100mg/kg。

结果：

图 2 概述了所有卡铂处理的小鼠实验组（RCH-01303 代表 SEQ ID No.2 的寡肽）的实验结果。结果用个体动物基础值的百分数变化表达。

图 2 显示，剂量为 300 μ g/kg/天的肽增加了血小板数量。需要指出，为了检测在血小板减少症时化合物的能力，而这是非常普遍的临床情况，相

效的浓度的 TPO (2.4 μ g/kg/天) 不能防止血小板的降低。图 1 也显示缩短的 TPO-Rp 肽 (SEQ ID No.2), 即 1-18 残基和 R9A, R11A, 在剂量为 300 μ g/kg/天和 30 μ g/kg/天时, 对卡铂诱导的血小板减少有很强的保护作用。这两个剂量的保护作用同样显著; 但是基于存活率 (见下), 最低剂量 30 μ g/kg/天有特别的意义, 而剂量 300 μ g/kg/天和 TPO-Rp 野生型效果可比。最高的肽剂量 0.9mg/kg/天在血小板保护方面显示了很低的效果, 这可能是由于肽的聚合造成。图 1 也显示了 SEQ ID No.4 的 TPO-Rp 肽最短的序列, 即 4-18 残基和 R9A, R11A, 在卡铂处理的小鼠中显示了对血小板水平有一定作用。所有的肽, 野生型 TPO-Rp、TPO-Rp1-18(R9A, R11A) 和 TPO-Rp 4-18 (R9A, R11A) 对其它血液成分没有明显作用。进一步, 治疗没有对动物的体重有影响。

检测被处理的动物的存活率是很重要的。通过 CHI-平方分析进行统计评估, TPO-Rp, 1-18 (R9A, R11A) 肽表现出了最好的效果和因此最高的存活率。根据统计, 用野生型处理的小鼠也表现出了显著的存活率。

上述所有内容清楚地指出: 肽 TPO-Rp 1-18 (R9A, R11A) 显著地使卡铂诱导的血小板减少症恢复, 并且显示出使该化合物在“体内”的活性提高了 10 倍。

实施例 2

TPO-Rp (野生型和本发明的寡肽) 在治疗卡铂诱导的血小板减少症的作用: II

方法: 定量给药时间表

每个测试组用腹腔内注射的方式以单日剂量给药。日剂量开始于第 0 日, 持续整个试验期 (第 13 日)。最小限度的剂量分别在指定时间给予: 第 0 和 4; 第 0、4 和 8; 第 0、4、8 和 12; 第 8 天到第 14 天。在第 0 日和第 4 日两次腹腔内注射卡铂, 每次 100mg/kg。

血液取样

比实施例 1 增加了卡铂的剂量。使用浓度为 $2.4\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 的 TPO 激素——同实施例 1，在卡铂剂量为 $180\text{mg}/\text{kg}$ 时，也不能防止血小板的下降。在更高的剂量 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 时，TPO 显示了一定的有统计学意义的效果。但是，在这个特定的卡铂模型下，由 SEQ ID No.2 的寡肽引起的效果要比由 TPO 引起的强。

图 2 概述了测定降低寡肽剂量可能性的实验结果。浓度为 $0.3\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 的寡肽只在第 0 天、第 0 和 4 天、第 0、4 和 8 天、第 0、4、8 和 12 天给药。值得注意的，对于卡铂处理的小鼠，似乎只要肽在第 0 和 4 天给药就足够显示保护作用。第 11 和 14 天显示了具有统计意义的保护作用水平。有趣的是那些最小剂量处理的组表现出很大的不同的应答。这种情况并不少见，正如已知的个体对于相同治疗的反应是不同的。无论如何，只要在第 0 和 4 天给药，由 SEQ ID No.2 的寡肽引起的效果就具有统计学意义了。同样的，在第 0、4 和 8 天或第 0、4、8 和 12 天对血小板减少症显示了显著的效果。最小剂量的效果可以与连续给予本寡肽（从第 0 天到第 13 天）相比。这样的降低剂量但是有同样治疗效果的可能性，可以明显的成为一个临床上的优势。

对野生型 TPO-Rp 和本发明的寡肽的研究指出，这里肽反应机制和自然存在的激素反应机制不同。有显示，对于第一次接受化疗，并且几天后用 TPO 处理的患者，TPO 没有效果，因此，提出了下面的实验。

一组被卡铂处理过的，从第 0 天开始给予化疗试剂的动物，从第 8 到 14 天接受 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$ 剂量的 TPO。相似的，另外一组，SEQ ID No.2 的寡肽以 $0.3\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 从第 8 到 14 天给予卡铂处理过的，从第 0 天开始给予化疗试剂的动物。结果也显示在图 2 中。TPO 对血小板减少症没有显示出明显的作用。相反，尽管是在治疗开始以后给予的，TPO-Rp (SEQ ID No.2) 显示了血小板的恢复。寡肽处理的动物的血小板水平统计上的显著增加，显示保护作用不仅存在于治疗开始的时候给药。这个发现不仅显示了本发明的寡肽在治疗开始后防止卡铂破坏作用的能力，也表明该寡肽和 TPO 有不

同的作用机制。这样，两个效果——(i)最小剂量给药时间表和(ii)不同的作用机制——提供了大量的优势。

实施例 3

体外寡肽的药物代谢动力学

方法：

用人血清（包含 200 个患者的血清组）和鼠血浆（包含 50 个动物的血浆组）研究野生型 TPO-Rp，TPO-Rp 1-18（R9A, R11A, SEQ ID No.2）和 TPO-Rp 4-18（R9A, R11A, SEQ ID No.4）的降解特征。为了检测降解，使用了 ^{125}I 标记的肽（标记在 Y14 上）。只有完整的肽和标记的降解产物能通过 HPLC 分析检测。因此，在不同点进行这样的分析清楚地检测了指定肽的降解时间。设定 37°C 保温。本实验里，标记肽的浓度约为 $1\ \mu\text{M}$ 。

结果：

鼠血浆组的肽降解结果显示在表 III。在鼠血浆中，TPO-Rp 的半衰期看上去为约 12 分钟。SEQ ID No.2 的 TPO-Rp1-18 显示出较短的半衰期，为约 1.1 分钟，而 SEQ ID No.4 的寡肽显示了很短的半衰期，约 0.5 分钟。

表 III 体外肽在 37°C 时的稳定性

肽	鼠血浆组	人血清组
野生型 TPO-Rp	12.1	1.9
TPO-Rp (1-18; R9A, R11A)	1.1	9.6
TPO-Rp (4-18; R9A, R11A)	0.5	4.9

人血清组的肽降解结果也显示在表 III。与鼠血浆相反，在人血清中，TPO-Rp 的半衰期约为 1.9 分钟。TPO-Rp4-18（R9A, R11A）被证明有稳定性，半衰期约为 4.9 分钟。寡肽 1-18（R9A, R11A）有相当长的半衰期，约 9.6 分钟，稳定性是野生型寡肽的 5 倍。这体现了一个显著的改进，而大多数肽具有相对短的 2-3 分钟的半衰期。应该注意，相比野生型 TPO-Rp，

TPO-Rp 1-18 R9A, R11A 在体内显示了活性的提高, 尽管鼠血浆中它的半衰期比较短。

对小鼠中 TPO-Rp 1-18 R9A, R11A (3mg/kg) 体内降解的研究显示, 经过给予静脉内的大丸剂, 血液中的半衰期计算为 7.3 分钟。

实施例 4

肽的稳定性

方法:

基于 UV 检测从反相柱系统 C8 MICROSORB MV 柱 (Rainin 仪器公司) 中被洗脱时的样品, HPLC 方法被运用。两个缓冲体系开始为 9.5% 5mM TFA (缓冲液 A) 和 5% ACN (缓冲液 B), 样品注入后, B 的百分比快速上升到 10%, 然后在 10 分钟里渐渐增加到 35%。样品洗脱过程后, 缓冲液 B 增加到 90% 简单清洗柱。

结果:

将野生型 TPO-Rp, TPO-Rp1-18(R9A, R11A, SEQ ID No.2)和 TPO-Rp4-18 (R9A, R11A, SEQ ID No.4) 这三种肽在以下温度贮存: 室温 (约 20 °C), 4°C 和 -20°C, 它们的稳定性通过 HPLC 分析显示。肽以 1mg 干粉或 1mM 水溶液的形式贮存, 没有其它赋形剂。在第 0 天建立了这三个肽的 HPLC 洗脱图谱后, HPLC 洗脱图谱在第 2, 9, 14 天重新测试。

图 3 显示了 30nmole 野生型 TPO-Rp 和较短的寡肽在研究开始时的 HPLC 图谱, 这里 1mM 肽溶液从干粉制备得到。图 4 显示了肽以 1mM 溶液形式贮存, 研究第 2 天的 HPLC 图谱 (图 4A, 或图 4B 干粉形式)。第 9 天肽的稳定性研究显示在图 5A 和 5B 中, 肽的 HPLC 图谱没有显示改变, 因此, 说明了贮存在室温, 4°C 和 -20°C 时肽都具有高稳定性。值得注意的, 图 6A 和 6B 中, 即第 14 天肽的稳定性研究中, 野生型 TPO-Rp 和本发明的两个寡肽显示了不变的 HPLC 图谱。当以 1mM 溶液或干粉在室温, 4°C 和 -20 °C 贮存时, 没有检测到降解的信号。可以得出 TPO-Rp 和本发明的寡肽可

以以 1mM 水溶液或干粉在室温，4°C和-20°C贮存 2 周，而没有降解的信号。

进一步用 HPLC 研究表明，野生型寡肽 TPO-Rp 和 SEQ ID No.2 肽用 1mM 水、盐水或盐水加 0.1%人白蛋白溶液制备，在室温，4°C和-20°C中保存 1, 3 和 4 周，，没有显示降解的信号。

实施例 5

TPO-Rp1-18 R9A, R11A 的形成和制备过程

5A) 媒介溶液

成分	%w/v	mg/ml	4L 批
醋酸钠，三水合物，USP， 10mM(F.W.136.08)	0.136	1.361	5.444g m
注射水，USP q.s.	100	1mL	4 升
pH*	5.3±0.2		
*(如果需要，用 10N HCL 和随后的 1N HCL 或 1N NaOH 溶液调节 pH)			
甘露醇，USP	5.0	50	200gm

制备过程:

1. 将 90% (3.6 升) 注射水 (WFI) 加入合适的玻璃容器。
2. 将 5.444gm 醋酸钠，三水合物加入 #1。
3. 如果需要，#2 的 pH 用 10N HCL (近似于 600ul) 和另外的 1N HCL 或 1N NaOH 溶液调节到 pH5.3±0.2。
4. 加入 200gm 甘露醇，溶解到 #3。温和搅拌混合直到完全溶解。
5. 加入足够的量 WFI 到 #4，到终体积为 4 升。温和搅拌直到均匀。
6. 在无菌情况下，用 0.2 微米膜过滤溶液 #5 到无菌的容器中。
7. 溶液 (100mL/小瓶) 在无菌情况下注入 7 个根据无菌过程准

备的 I 型小瓶。在另外两个相似的无菌小瓶（10mL/小瓶）中注入开始和保留的样品。然后封上特氟纶灰色丁基塞子和铝箔。

5B) 可注射的溶液(1mg/mL)

成分	%w/v	mg/ml	600mL 批
TPO-Rp1-18 R9A, R11A (无水自由基) 粉末*	0.1	1	0.66gm*
媒介见 5A	100	1mL	600mL

注意：（对 5B, 5C, 5D）

TPO-Rp1-18 R9A, R11A 以无水醋酸盐的形式提供。量的计算如下：

肽粉末的量（无水醋酸盐）=

$\frac{\text{要求的自由基的量}}{\% \text{肽含量}}$

%肽含量

*基于肽的 90.7%的含量

制备过程：

1. 加入精确量的媒介溶液（600mL）到合适的玻璃容器。
2. 加入精确量的寡肽粉末（0.66gm 粉末），并溶解到 #1，混合均匀。
3. 如果需要，测量 #2 溶液的 pH 并调节到 pH5.3±0.2。
4. 在无菌情况下，通过 0.2 微米膜过滤 #3 溶液（Milipore Durapore 膜或等价物）。
5. 溶液（75mL/小瓶）在无菌情况下注入 7 个根据无菌过程准备的 I 型小瓶。在另外两个相似的无菌小瓶（10mL/小瓶）注入开始和保留的样品。然后封上特氟纶灰色丁基塞子和铝箔。

5C) 可注射的溶液(5mg/mL)

成分	%w/v	mg/ml	600mL 批
TPO-Rp1-18 R9A, R11A (无水自由 基) 粉末*	0.5	5	3.3gm*
媒介见 5A	100	1mL	600mL

制备过程：见 5B，根据上表修改相应的量。

5D) 可注射的溶液(9mg/mL)

成分	%w/v	mg/ml	650mL 批
TPO-Rp1-18 R9A, R11A (无水自由 基) 粉末*	0.9	9	6.45gm*
媒介见 5A	100	1mL	650mL

制备过程：见 5B，根据上表修改相应的量。

实施例 6

方法：

“体外”信号研究

细胞处理：在 RPMI 1640 培养液（1x 青霉素/链霉素、2mM 谷氨酸盐、10%胎牛血清（Hyclone）和 1ng/ml GM-CSF，离心并重悬浮到含有 3%血清且不含有 GM-CSF 的培养液中）中，使 TF-1 生长到细胞密度为 1×10^6 细胞/ml。细胞在 37°C 饥饿 14-18 小时，离心并重悬浮到不含血清和 GM-CSF 的培养液上，使密度为 1×10^6 细胞/ml。2ml 的细胞悬液在 37°C 用 TPO 的寡肽处理（如每个实验所指导的）30 分钟（5%CO₂）。每 Falcon 管加入 10ml 冰预冷的细胞洗涤缓冲液，在 4°C 以 3000rpm 快速离心。培养液被仔细吸出，用 PBS 重复洗涤 2 次。

以后的步骤在冰上操作。吸出培养液，每管再加入 0.6ml 的 2x 溶菌缓冲液。吸管吹打，然后转移到 Eppendorf 管中，置于冰上约 30 分钟，14000xg

离心 10 分钟。上清（溶菌液）用于免疫沉淀反应。

免疫沉淀反应：每个免疫沉淀反应使用 20-40 μ L 的 GammaBind G 琼脂糖浆。在 Fppendorf 管中用 0.5x 溶菌缓冲液洗涤蛋白 G 珠数次，每个免疫沉淀反应加入 1-4 μ g 的 PY-99 抗体（Santa Cruz-Biotechnology）。室温下，端到端转动管子保温 2 小时。加入溶菌液，然后 4 $^{\circ}$ C 下转动管子保温过夜。用 1x 溶菌缓冲液洗涤 3 次，然后立刻加入 pH6.5 的 0.5M 的 Tris。加入 50 μ L SDS-样品缓冲液，将样品加到胶前，先煮沸 3 分钟。

Western blot 分析：约 10 μ L/样品在 8%聚丙烯酰胺小胶上跑，然后转移到 PVDF 膜（Millipore），在固定缓冲液中固定 1 小时，1: 1000 稀释，和 α STAT5 抗体一起在 4 $^{\circ}$ C 下保温过夜。洗涤膜，1: 2000 稀释，与合适的碱性磷酸酯酶连接的第二抗体一起室温保温 2 小时。PVDF 膜用 Blotto 冲洗，并用 NBT/BCIP（Cappel）开发。

结果：

实验评估了经过 HPLC 分析没有显示明显降解的寡肽（见实施例 4）是否仍保持生物活性。

用体外信号测定检测了本发明的寡肽和野生型 TPO-Rp 的活性。运用以上确定的标准程序，用经过 HPLC 分析的肽样品刺激 TF-1 细胞。STAT5(通过 TPO-R 信号传导途径激活的 JAK2 激酶的底物)的磷酸化和相应的活化被测定。在稳定性研究的第 18 天，浓度 3 μ M 的肽被测定；在稳定性研究的第 30 天，浓度 50nM 和 5 μ M 的肽被测定。所有的肽在独立的实验中被评估 3 或 4 次。收集所有的数据，扫描 Western blot，对 STAT5 的磷酸化强度定量。

所有实验（mean +/- SEM）的数据在表 IV 到 IX 中列出（见下）（W：水，S：血清，H：0.1%HSA）。结果说明在不同的贮存条件下，肽的活性有些不同。在“第 18 天”的稳定研究中显示，室温贮存时，TPO-Rp(1-18, R9A, R11A)肽的活性明显减弱。当化合物贮存在 4 $^{\circ}$ C 和 -20 $^{\circ}$ C 时，活性保持。尽管用水或盐水制备的肽溶液能够保持活性，加入 0.1%HSA 使化合物的活性显

著的最好。这个结论被第30天稳定研究的结果确认。溶解于水的 SEQ ID No.2 的肽贮存在-20℃时，保持活性。当贮存在盐水，或加入 0.1% HSA 的盐水中时，溶液在室温、4℃和-20℃时，都保持活性。比较第30天的稳定研究，当以水溶液的形式贮存在-20℃时，野生型 TPO-Rp 的活性表现出明显的降低。

上述稳定性研究揭示了 TPO-Rp(1-18, R9A, R11A, SEQ ID No.2)是一个比较稳定的分子，在任何溶剂中，当贮存在-20℃时，可以保持一个月的活性。有趣的是，尽管在任何溶剂或温度情况下，肽没有降解的图谱，但是活性测定显示了一些不同。

实施例 7

缩短的 TPO-Rp 寡肽的生物活性

方法：

SEQ ID No 1-7 的寡肽通过固相合成和后续的 HPLC 纯化到 90-95% 的纯度。寡肽的确定通过质谱和氨基酸分析检测。所显示的 MW 是从质谱分析得到 (M+H⁺) (SEQ ID No.1: 2141, No.2: 1971, No.3: 1857, No.4: 1687, No.5: 2240, No.6: 2069, No.7: 2736, 野生型: 2755)。

绘制了本发明的寡肽的剂量-反应曲线，并且比较了它们的活性和野生型 TPO-Rp 的活性。

肽剂量反应活性基本的通过体外信号测定评估。测定 STAT5 能因此活化的磷酸化。STAT5 是 JAK2 激酶的一个底物，通过 TPO-Rp 信号传导激活。每个寡肽的活性在一个很宽的浓度范围中被检测。检测浓度为 0.3, 3, 10, 30nM 的肽和 0.1, 0.3, 3 和 30 μM 的 TPO-Rp。每个实验中，比较通过测量 STAT5 磷酸化获得的寡肽的活性与得到的 10ng/ml TPO 的活性，即比较 TPO-R 活性和信号最强的激素水平。所有的肽在独立的实验中被评估 4-5 次。收集所有的数据，Western blot 被扫描，STAT5 磷酸化的强度被定性。

结果：

每个寡肽的活性用他们最高活性的百分比表示。因此，100%活性为在寡肽浓度为 30 μ M 时，得到的 STAT5 蛋白磷酸化值。

结果清楚的指出相比野生型 TPO-Rp，所有的寡肽有保留的活性。表 X（见下）概括了所有被检测的寡肽近似的 EC₅₀ 的值。

第一组寡肽（A1-L18，SEQ ID No 1 和 2）显示不仅活性能够与野生型 TPO-Rp 相比，R9A,R11A 形式（约 EC₅₀10nM）的效能也提高了。值得注意的，当进行丙胺酸行走和结构分析时，寡肽的这个部分被显示对 TPO-Rp 活性是关键。活性的增加可能是由于寡肽结构、稳定性或两者共同的改进。

最短的寡肽，15 氨基酸长（G4-L18，SEQ ID No 3 和 4）的两种形式都保留了与野生型 TPO-Rp 可比的活性。第三组寡肽（G4-R21，SEQ ID No. 5 和 6）的两种形式都显示了和与野生型 TPO-Rp 相同的活性。

实施例 8

对鼠进行 SEQ ID No. 2 的寡肽的 28 天的静脉毒性研究。

SEQ ID No. 2 的肽的局部和系统的毒性用 Crl: CD®(SD)IGS BR 大鼠通过这个 28 天静脉研究被定性。通过后继的 28 天的恢复时间，评定从高剂量组的效果中的恢复情况。通过在侧面尾部静脉的大丸药静脉注射，肽给予三个毒理组（组 2，3 和 4），以及 3 个毒动力学组（组 2A，3A 和 4A）。剂量分别是 5，15 和 45mg/kg/天，至少连续 28 天。一个同时存在的媒介组（组 1）基于可比较的服法，接受 5%甘露醇溶液，10mM 醋酸钠。媒介和 45mg/kg/天的组各包括 15 个雄的和 15 个雌的，5mg/kg/天和 15mg/kg/天组各包括 10 个雄的和 10 个雌的，3 个毒动力学组各包括 9 个雄的和 9 个雌的。对所有组的剂量都是 5ml/kg。

观察毒理组的所有动物在用药前、刚用药后、用药一小时后和恢复期一天一次的毒性的临床征兆。进行详细的身体检查，每周记录个体的体重和食物量。评估在用药前、处理阶段的中点、初步尸检和恢复尸检时的临

床病理学参数（血液学、血清化学和验尿）。收集试验前和预定的尸检时的骨髓涂片。在初步尸检时，收集血清，用于抗体确定。在用药开始前、研究的第 3 周和恢复期，研究的第 7 周进行眼科的检查。对所有的动物进行完全的尸检。在初步尸检和恢复尸检时，对选择的器官进行称重。在初步尸检时收集的选择性的组织用显微镜检验。

在第 0、6、14、20 和 27 天，收集分配到毒动力学组中的一组分开的动物的血清样品，用于检测血浆水平。

用肽处理对于存活率、体重、食物量、临床病理参数、器官重量和骨髓细胞没有影响。没有发现肽相关的眼科的、肉眼可见的、显微镜可见的变化。

当被给予了 SEQ ID No. 2 的肽，雄的和雌的大鼠在 28 天里表现出了很好的耐受。基于雄鼠的前列腺的重量降低，雌鼠的没有可观察出来的效果的水平（NOEL）为 45mg/kg/天。

实施例 9:

对猴进行 SEQ ID No. 2 的寡肽的 28 天的静脉毒性研究。

用猕猴进行 28 天的静脉研究，使对 SEQ ID No. 2 的肽的局部和系统的毒性定性。在 28 天的恢复期中，肽作用的可逆性被评估。连续 28 天，肽通过隐静脉的大丸药静脉注射给药，剂量分别是 5, 15 和 30mg/kg/天。雌猴按计划比雄猴晚一天开始给药。一个对照的媒介组基于可比较的服法，接受 5 %甘露醇溶液，10mM 醋酸钠。媒介对照组和 30mg/kg/天的组各包括 5 个雄猴和 5 个雌猴。5mg/kg/天和 15mg/kg/天组各包括 3 个雄猴和 3 个雌猴。对所有组的剂量都是 5ml/kg。

用实施例 8 描述的方法观察的所有猴子。

在第 0、7、14、21 和 27 天，收集来自 3 个猴/性别/组的血清样品，以确定 SEQ ID No. 2 的肽的血浆浓度，并计算毒动力学参数。

本研究中没有死亡。在肽的静脉注射后，在大多数剂量组的大多数猴

子中发生了一个临床征兆的改变。在雄性 5mg/kg/天给药的情况下，没有化合物—相关的临床征兆。在雄性 15mg/kg/天给药的情况下，发生了面部潮红（3/3）和流涎症（1/3）。在雄性 30mg/kg/天给药的情况下，发生了面部潮红（4/5），身体表面潮红（3/5），流涎症（3/5），呕吐（1/5）和肌肉紧张性降低（1/5）。在雌性 5mg/kg/天给药的情况下，发生了面部潮红（2/3）。在雌性 15mg/kg/天给药的情况下，发生了面部潮红（3/3），身体表面潮红（2/3）和流涎症（1/3）。在雌性 30mg/kg/天给药的情况下，发生了面部潮红（5/5），身体表面潮红（4/5），流涎症（4/5），呕吐（2/5）和肌肉紧张性降低（1/5）。所有的临床征兆降低，在给药一个小时以后消失。在恢复期中，没有这些临床征兆发生。

用肽处理，对于体重、临床病理参数（血液学、血清化学和验尿），生理参数（体温、心脏频率、血压和呼吸频率），心电图评估和器官重量没有影响。没有发现与肽相关的眼科的、肉眼可见的、显微镜可见的变化。与肽相关的发现对于雄猴和雌猴没有明显的不同。

当被给予了 SEQ ID No. 2 的肽，28 天里，雄猴和雌猴在最大剂量为 30mg/kg/天时，表现出了很好的耐受。基于刚被给药后面部潮红，雄猴的没有可观察出来的效果的水平（NOEL）为 5mg/kg/天。雌猴的 NOEL 没有被建立。因为临床征兆和肌肉虚弱（在研究的第 1 天仅发现在 1/5 雄猴和 1/5 雌猴）是暂时的，并且没有其他测试效果被发现，两个性别的可观察出来的效果的水平（NOAEL）都建立在 30mg/kg/天。

实施例 10

SEQ ID No. 2 的肽对组胺释放的作用。

SEQ ID No. 2 的肽对组胺释放的作用在体外的外周血液单核细胞（PBMC）中被测定。

检测从 4 个不同的受检者中得到的 PBMC。含有 3 μ M 到 10mM 的不同浓度的 SEQ ID No. 2 的肽的白血球悬浮液被保温。人的抗 IgE 抗体以及缓

冲液仅分别作为阳性和阴性对照。组胺的释放量用 ELISA 定量 (IBL, 目录号 RE59221)。测定的敏感度为 2.4ng/mL。

选择从 3 μ M 到 10mM 的浓度范围评估了在不同的从静脉注射得到的肽的水平下组胺的释放。因此, 假设分布量为每 kg 组织 400ml, 浓度 30mg/kg 对应刚注射后的约 38 μ M。在细胞外液中已知肽自由分布。因此, 肽的最高浓度 10 mM 比细胞外液的最高浓度高约 100 倍。

在最高浓度 10 mM 时, 肽导致一个相对小, 但是显著的 15ng/ml 的组胺释放。这个值比阳性对照 (抗-IgE) 低了 10 倍。浓度低于等于 3.3 mM 的肽在人 PBMC 中, 对组胺释放没有作用。范围包含了所有治疗的体内浓度。在体外最高肽浓度 10mM 时, 观察到一个小的, 但是显著的组胺释放。浓度比任何治疗剂量明显高。

实施例 11

分析猴和大鼠的血清样品, 以检测在实施例 8 和 9 中已被检测的猕猴和大鼠中 IgG 的存在。在 32 个猴血清样品和 80 个大鼠血清样品中, 没有能检测到抗 SEQ ID No. 2 的肽的抗体。

<400> 5
Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg
1 5 10 15

Ala Arg

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Gly Thr Leu Glu Leu Ala Pro Ala Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg
1 5 10 15

Ala Arg

<210> 7
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Ala Arg Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Phe Arg Leu
1 5 10 15

Gln Leu Arg Ala Arg Leu Asn
20

卡铂处理的8周大的雄鼠C57BL/6J中，TPO/Rp (1-18; 9, 11Ala) 对血小板的作用。

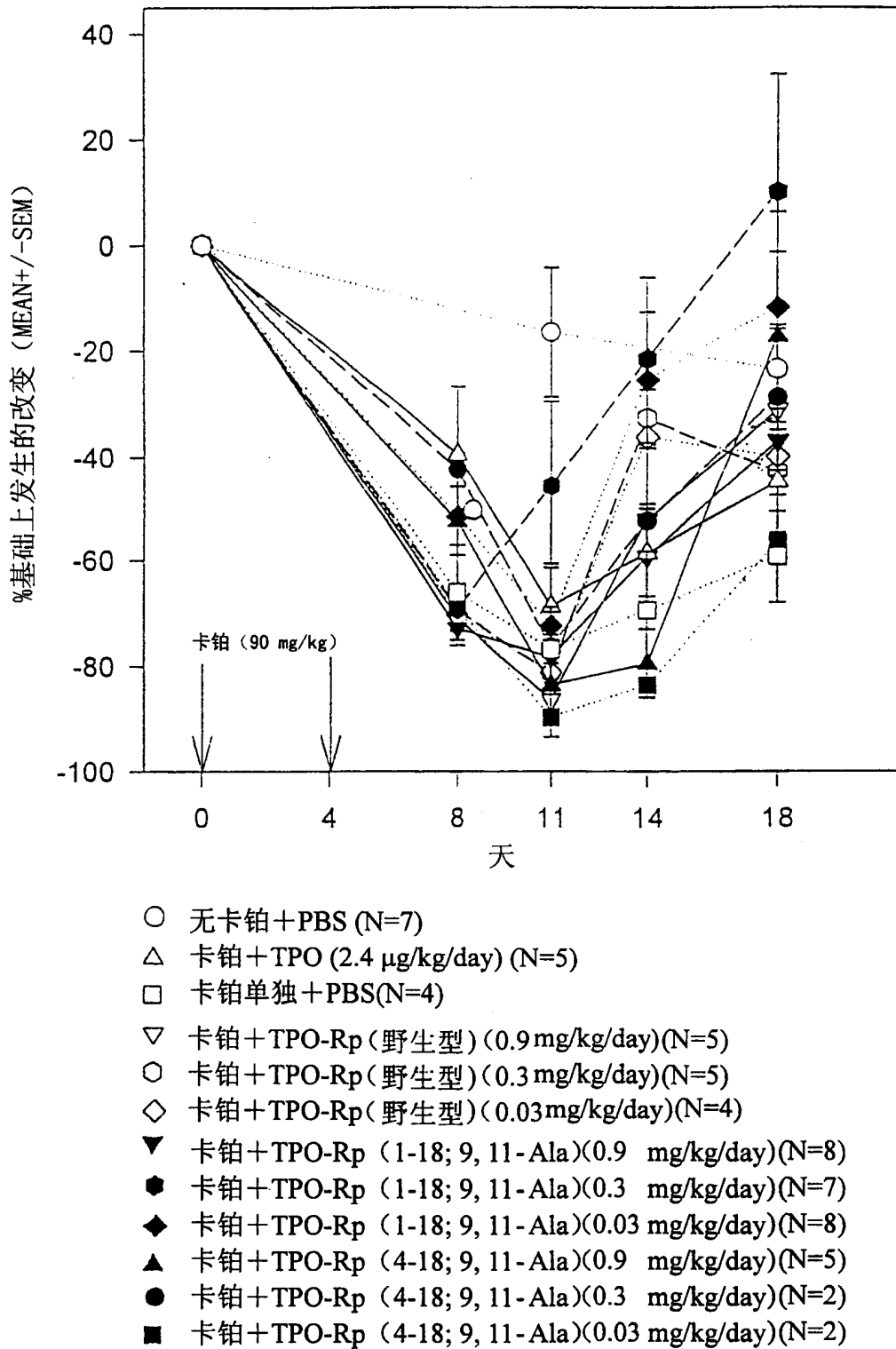
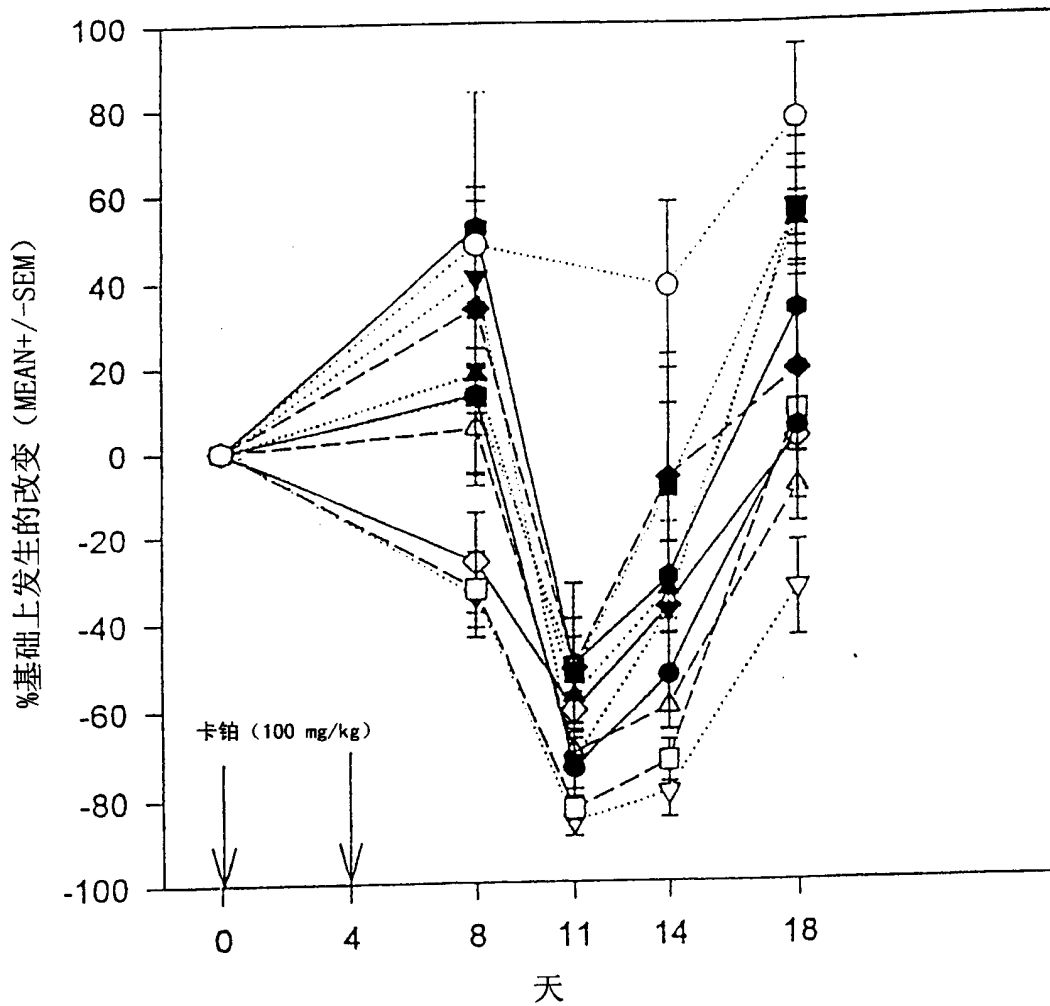


图1

卡铂处理的8周大的雄鼠C57BL/6J中，TPO/RCN01303对血小板的作用。



- 无卡铂 (N=11)
- △ 卡铂+TPO(10 μ g/kg/day)(N=10)
- ▽ 卡铂+TPO(2.5 μ g/kg/day)(N=10)
- ◇ 卡铂+RCN01303(0.3mg/kg/day)(N=8)
- 卡铂单独(N=13)
- ▼ 卡铂+RCN01303 (0.3mg/kg; 第0天) (N=7)
- 卡铂+RCN01303 (0.3mg/kg; 第0和4天) (N=5)
- ◆ 卡铂+RCN01303 (0.3mg/kg; 第0、4和8天) (N=4)
- ▲ 卡铂+RCN01303 (0.3mg/kg; 第0、4、8和12天) (N=7)
- 卡铂+TPO (10 μ g/kg; 第8到14天) (N=6)
- 卡铂+RCN01303 (0.3mg/kg; 第8到14天)

图2

TPORp和类似物的稳定性研究—第0天

30nmole干粉重新制成1mM溶液中

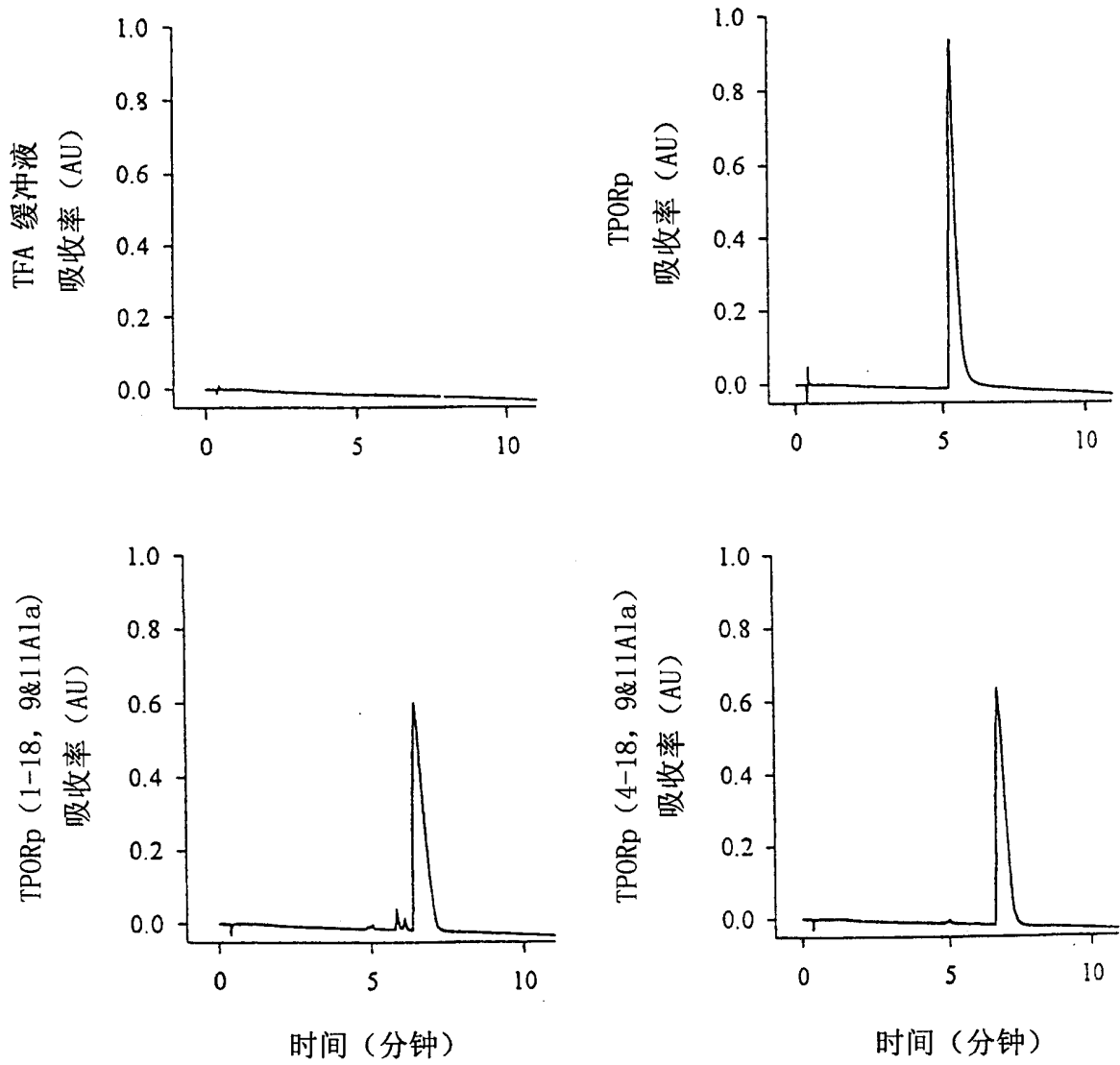


图3

TPORp和类似物的稳定性研究--第2天

样品以1mM溶液贮存

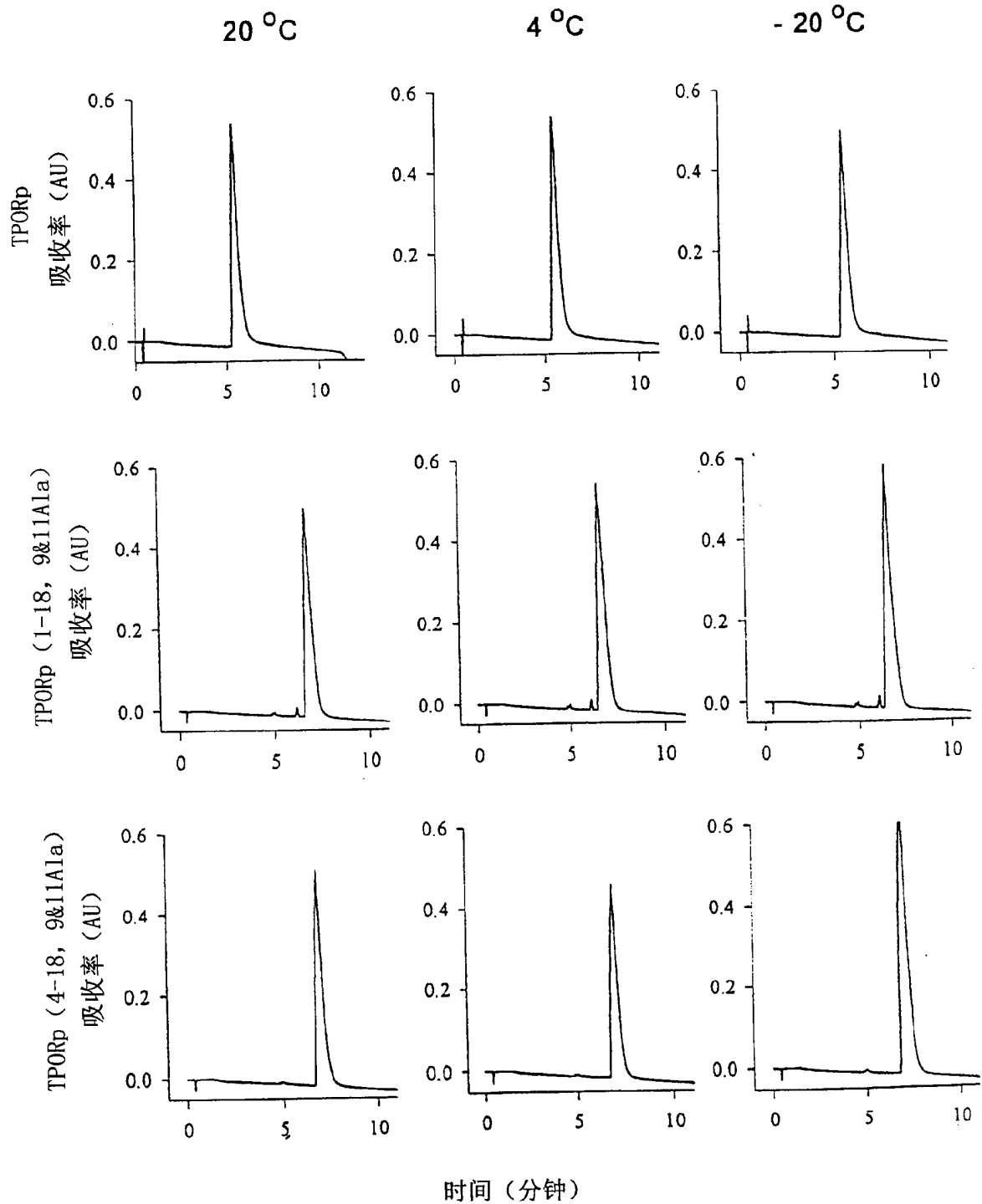


图4A

TPORp和类似物的稳定性研究--第9天

样品以1mM溶液贮存

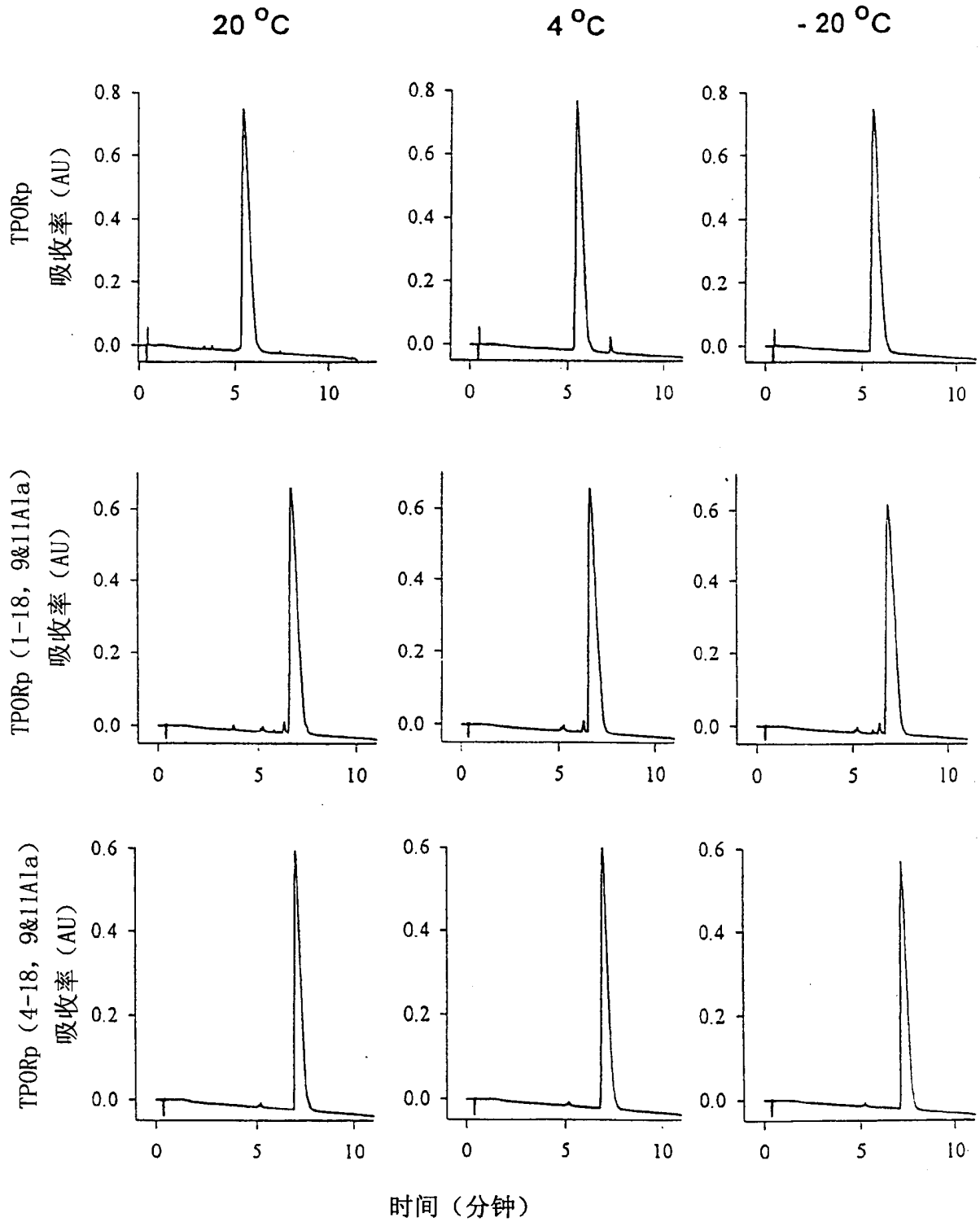


图5A

TPORp和类似物的稳定性研究--第9天

样品以干粉贮存

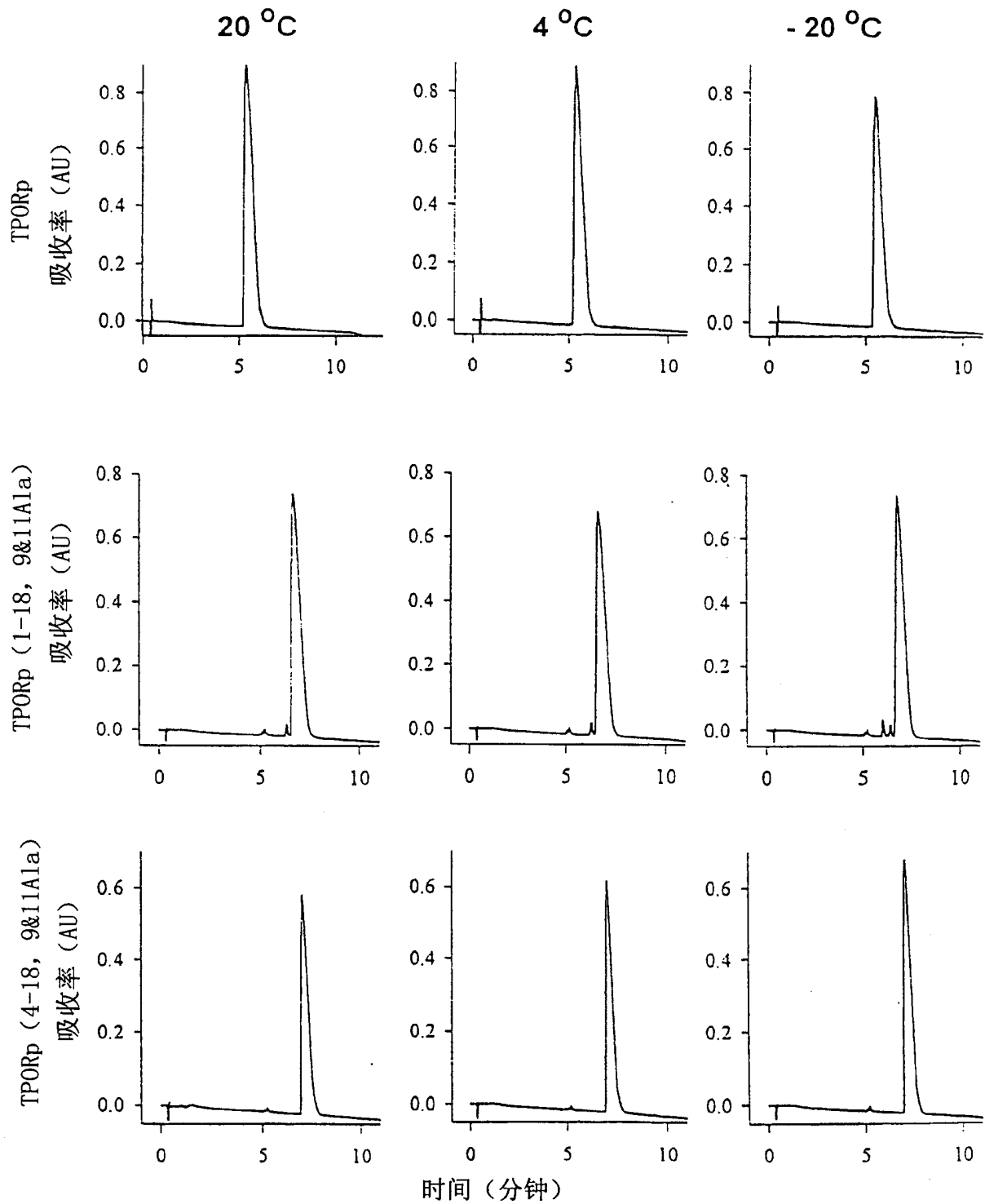


图5B

TPORp和类似物的稳定性研究--第14天

样品以1mM溶液贮存

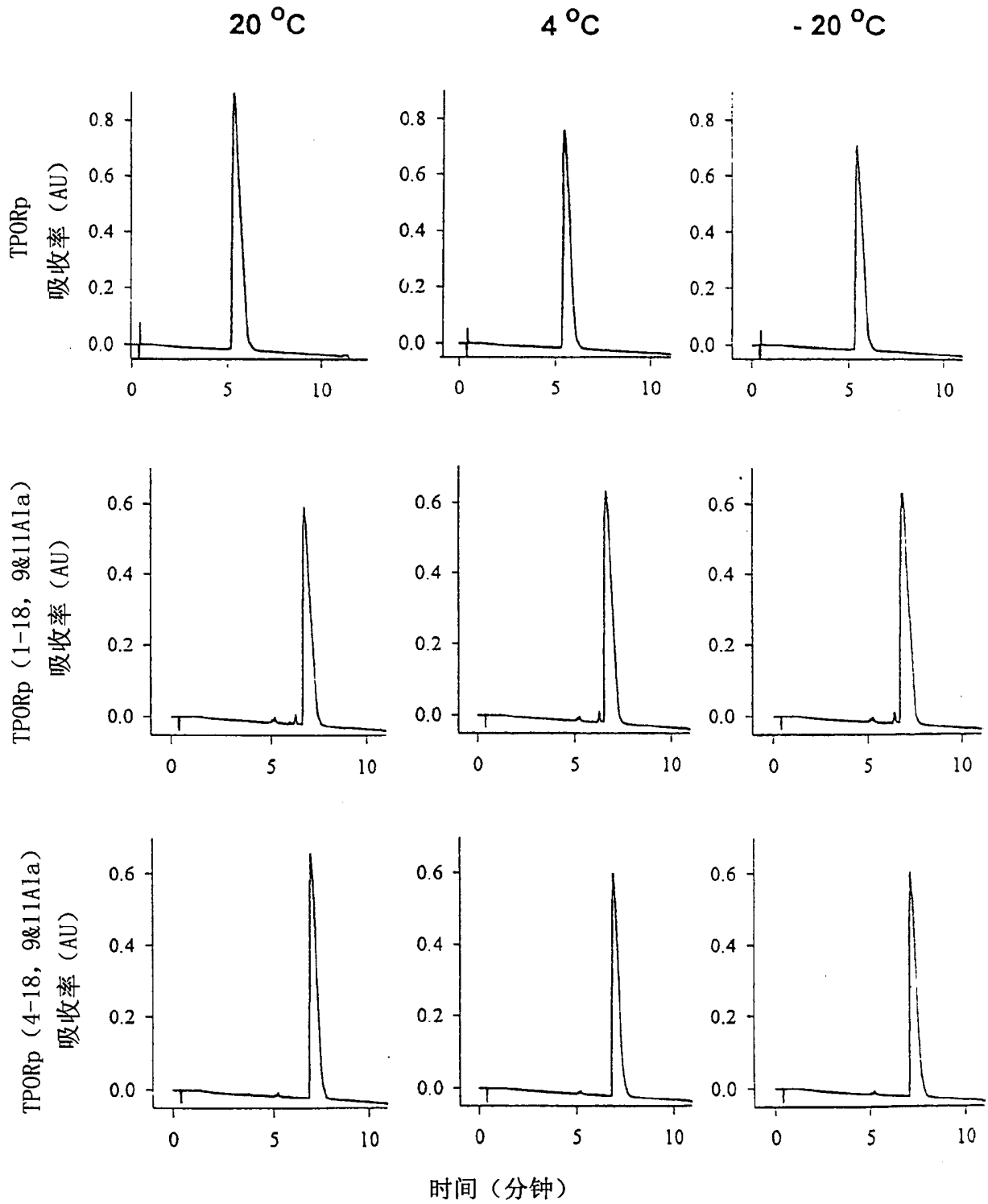


图6A

TPORp和类似物的稳定性研究--第14天

样品以干粉贮存

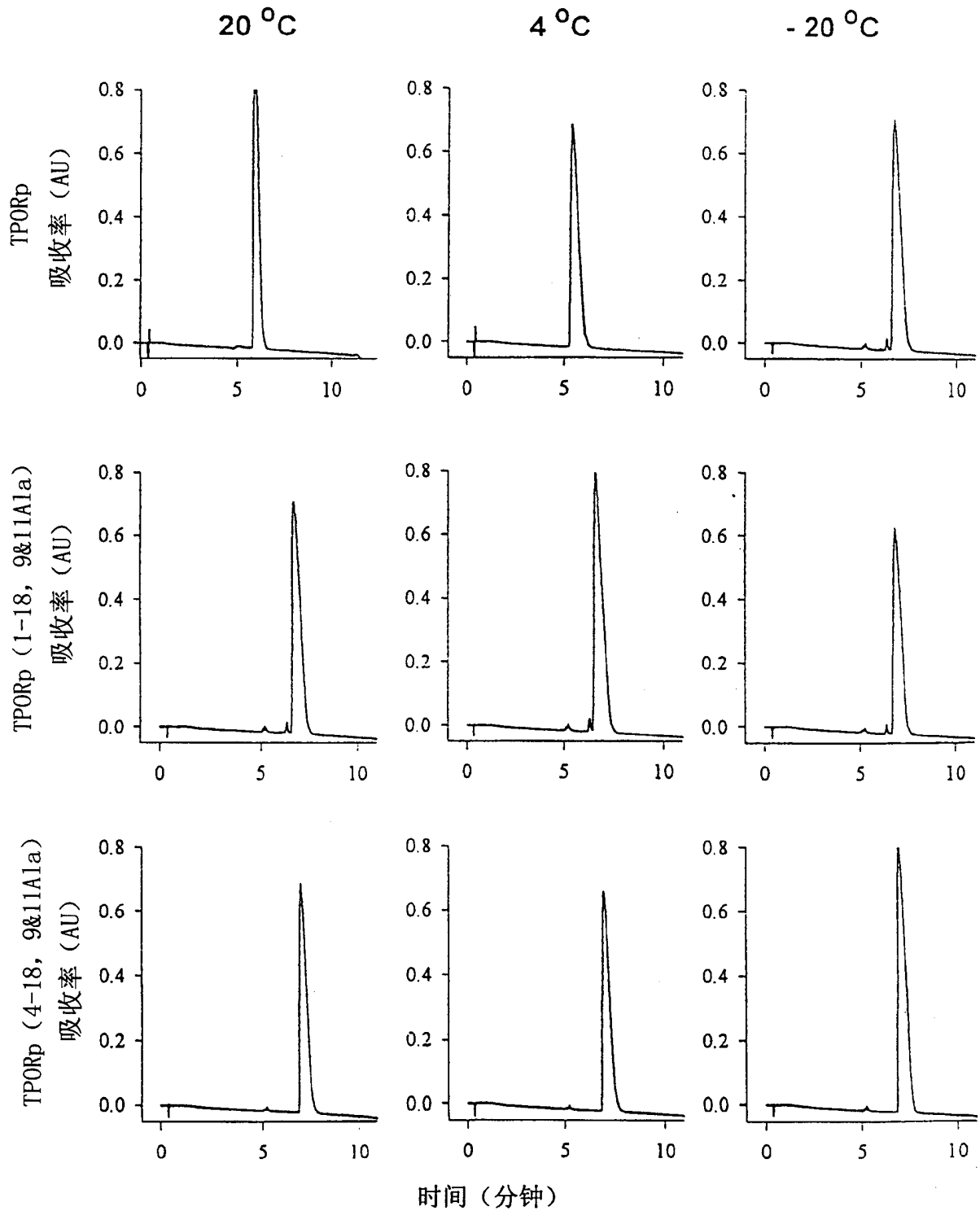


图6B