



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1871022 B

(45) 授权公告日 2011.07.06

(21) 申请号 200480031452.0

A61P 7/04 (2006.01)

(22) 申请日 2004.08.13

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/498,740 2003.08.28 US

US 6251864 B, 2001.06.26, 权利要求书和说明书全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 田甜

2006.04.24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/026422 2004.08.13

(87) PCT申请的公布数据

W02005/023834 EN 2005.03.17

(73) 专利权人 奥索-麦克尼尔药品公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 B·R·麦唐纳德 J·K·维斯

E·J·尤尔科

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 邹雪梅

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 4 页

(54) 发明名称

结合血小板生成素受体的肽和化合物

(57) 摘要

公开了结合并激活血小板生成素受体(c-mpl或TPO-R)或用作TPO激动剂的肽和化合物。

1. 一种结合血小板生成素受体的化合物,其中所述化合物为 (H-IEGPTLRQ(2-NaI) LAARX₁₀)₂K-NH₂, 其中 X₁₀ 为肌氨酸。
2. 权利要求 1 的化合物,其中所述化合物与亲水聚合物共价连接。
3. 权利要求 2 的化合物,其中所述亲水聚合物的平均分子量在 500 至 40,000 道尔顿之间。
4. 权利要求 2 的化合物,其中所述亲水聚合物的平均分子量在 5,000 至 20,000 道尔顿之间。
5. 权利要求 2 的化合物,其中所述亲水聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乳酸和聚乙醇酸。
6. 权利要求 5 的化合物,其中所述化合物与聚乙二醇共价连接。
7. 权利要求 1 的化合物,其中所述化合物的各二聚亚单元与亲水聚合物共价连接。
8. 权利要求 6 的化合物,其中聚乙二醇选自单甲氧基聚乙二醇 (MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯 (MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯 (MePEG-TRES) 和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM)。
9. 权利要求 7 的化合物,其中所述亲水聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乳酸和聚乙醇酸。
10. 权利要求 9 的化合物,其中所述化合物与聚乙二醇共价连接。
11. 权利要求 10 的化合物,其中所述聚乙二醇的平均分子量在 5,000 至 20,000 道尔顿之间。
12. 权利要求 11 的化合物,其中聚乙二醇选自单甲氧基聚乙二醇 (MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯 (MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯 (MePEG-TRES) 和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM)。
13. 一种药物组合物,所述组合物包含权利要求 1-12 任一项的化合物和药物可接受的载体。
14. 权利要求 1-12 任一项的化合物用于制备激活细胞中血小板生成素受体的药物的用途。
15. 权利要求 14 的用途,其中所述细胞包括人巨核细胞、血小板或 CD34⁺ 细胞。
16. 权利要求 14 的用途,其中所述细胞包括 TPO- 依赖性细胞。
17. 权利要求 1-12 任一项的化合物用于制备治疗患血小板减少的药物的用途。
18. 权利要求 17 的用途,其中所述血小板减少归因于化疗或放疗。
19. 权利要求 18 的用途,其中在所述化疗或放疗之前给予所述患者 TPO 拮抗剂。
20. 权利要求 17 的用途,其中所述血小板减少归因于骨髓输入。
21. 权利要求 1-12 任一项的化合物用于制备预防性治疗有血小板减少患者的药物的用途。
22. 权利要求 21 的用途,其中在骨髓移植、化疗或放疗之前给予所述化合物。

结合血小板生成素受体的肽和化合物

[0001] 相关申请的相互参照

[0002] 本申请要求 2003 年 8 月 28 号提交的美国申请序列号 60/498,740 的优先权。

发明领域

[0003] 本发明提供了结合并激活血小板生成素受体 (c-mpl 或 TPO-R) 或用作 TPO 激动剂的肽和化合物。本发明可应用于生物化学和医疗化学领域,具体地说提供 TPO 激动剂用于治疗人类疾病。

[0004] 发明背景

[0005] 巨核细胞是骨髓来源的细胞,负责生产循环血的血小板。尽管在大多数物种中它们占少于 0.25% 的骨髓细胞,其容积是典型骨髓细胞的 10 倍以上。参见 Kuter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11104-11108(1994)。巨核细胞进行称为核内有丝分裂的过程,在该过程中它们复制它们的核但是没有进行细胞分裂,因此产生了多倍体细胞。为响应血小板计数的下降,核内有丝分裂速率增加,形成更高多倍体的巨核细胞,巨核细胞数可以增至 3 倍。参见 Harker, J. Clin. Invest., 47:458-465(1968)。相反的,为响应血小板计数的提高,核内有丝分裂速率下降,形成较低多倍体的巨核细胞,巨核细胞数可减少 50%。

[0006] 循环血小板的数量调控核内有丝分裂速率和骨髓巨核细胞数量的确切生理学反馈机制还不清楚。现在认为涉及调节该反馈回路的循环血小板生成因子是血小板生成素 (TPO)。更具体的是,已经显示 TPO 是涉及血小板减少的情况中的主要体液调控因子。参见,例如, Metcalf, Nature, 369:519-520(1994)。几项研究显示, TPO 增加血小板计数,增加血小板大小,促进同位素掺入接受动物的血小板。具体地说, TPO 被认为通过某些途径影响巨核细胞生成:(1) 它增加巨核细胞的尺寸和数量;(2) 它以多倍体形式增加巨核细胞中的 DNA 含量;(3) 它增加巨核细胞的核内有丝分裂;(4) 它促进巨核细胞的成熟;(5) 它增加骨髓中小乙酰胆碱酯酶阳性细胞形式的前体细胞的百分比。

[0007] 血小板是凝血必需的。当它们的数量非常低时,患者有死于灾难性出血的严重风险,因此 TPO 在诊断和治疗各种血液疾病(例如主要由于血小板缺陷的疾病)中具有潜在的有价值应用。正在进行的 TPO 临床试验已表明可安全地给予患者 TPO。另外,近来的研究也为治疗血小板减少中 TPO 疗法的有效性预测 (projection) 提供了基础,尤其是在治疗癌症或淋巴瘤中由化疗、放疗或骨髓移植导致的血小板减少。参见例如 McDonald, Am. J. Ped. Hematology/Oncology, 14:8-21(1992)。

[0008] 已克隆并鉴定编码 TPO 的基因,参见 Kuter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11104-11108(1994); Barley 等, Cell 77:1117-1124(1994); Kaushansky 等, Nature 369:568-571(1994); Wendling 等, Nature, 369:571-574(1994); 和 Sauvage 等, Nature 369:533-538(1994)。血小板生成素是至少具有两种形式的糖蛋白,表观分子量为 25kDa 和 31kDa, N 末端氨基酸序列相同。参见 Bartley 等, Cell, 77:1117-1124(1994)。血小板生成素显示出具有两个明显不同的区域,被潜在的 Arg-Arg 切割位点分开。氨基端区域在人和小鼠中高度保守,并和促红细胞生成素、干扰素 -a 和干扰素 -b 有某些同源性。羧基末端区

域显示出很大的种族差异。

[0009] 已描述了人 TP0-R (也称为 c-mp1) 的 DNA 序列和其编码的肽序列。参见 Vigon 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :5640-5644 (1992)。TP0-R 是血细胞生成素生长因子受体家族的成员, 该家族特征为胞外结构域的共有结构方案, 包括 N 末端部分中 4 个保守的 C 残基和临近跨膜区的 WSXWS 基序 (SEQ ID NO :1)。参见 Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6934-6938 (1990)。该受体在血细胞生成中起着功能性作用的证据包括, 观察到它的表达在小鼠中限于脾、骨髓或胚胎肝脏 (参见 Souyri 等, Cell 63 :1137-1147 (1990)), 在人中限于巨核细胞、血小板和 CD34+ 细胞 (参见 Methia 等, Blood 82 :1395-1401 (1993))。而且, 使 CD34+ 细胞暴露于合成的 mp1 RNA 反义寡核苷酸显著抑制巨核细胞集落的出现, 而不影响红细胞系或髓细胞系集落的形成。某些研究者推测该受体作为同型二聚体发挥功能, 类似于 G-CSF 和促红细胞生成素的受体的情况。

[0010] 可获得 TP0-R 的克隆基因促进了寻找该重要受体的激动剂。可获得重组受体蛋白使受体-配体相互作用的研究可在各种随机和半随机肽多样性产生系统中进行。这些系统公开于美国专利 6, 251, 864、6, 083, 913、6, 121, 238、5, 932, 546、5, 869, 451、6, 506, 362 和 6, 465, 430, 以及 Cwirla 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :6378-6382 (1990), 它们各自通过引用结合到本文中。

[0011] 患血小板减少的患者中血小板水平恢复缓慢是严重的问题, 迫切需要找到能加速血小板再生的血液生长因子激动剂。本发明提供这种激动剂。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及定义的低分子量肽和肽模拟物具有强的 TP0-R 结合特性, 可激活 TP0-R。因此, 该肽和肽模拟物可在治疗由 TP0 介导的疾病 (例如由化疗、放疗或骨髓输入导致的血小板减少) 中用于治疗目的, 在研究造血机制中用于诊断目的以及用于体外扩增巨核细胞和定向祖细胞。

[0014] 适合于治疗或诊断目的的肽和肽模拟物的 IC_{50} 是约 2mM 或更低, IC_{50} 由以下实施例 3 中说明的结合亲和力试验来测定, 其中较低的 IC_{50} 对应于和 TP0-R 的结合亲和力较强。对于药用目的, 肽和肽模拟物的 IC_{50} 优选不超过约 100 μ M, 更优选不超过 500nM。在优选的实施方案中, 肽或肽模拟物的分子量是约 250 至约 8,000 道尔顿。如果本发明的肽寡聚化、二聚化和 / 或用本文描述的亲水性聚合物衍生化, 这种肽的分子量会显著增大, 可在约 500 至约 120,000 道尔顿的范围内的任何地方, 更优选约 8,000 到约 80,000 道尔顿。

[0015] 在用于诊断目的时, 本发明的肽和肽模拟物优选可检测标记标记, 因此, 没有这种标记的肽和肽模拟物作为制备标记肽和肽模拟物的中间体。

[0016] 符合分子量和 TP0-R 结合亲和力的既定标准的肽包含 9 个或更多的氨基酸, 其中氨基酸是天然的或是合成的 (非天然的) 氨基酸。

[0017] 因此, 优选的肽和肽模拟物包括的化合物及其生理可接受的盐具有:

[0018] (1) 小于约 5000 道尔顿的分子量,

[0019] (2) 用 IC_{50} 表示的 TP0 结合亲和力不超过约 100 μ M,

[0020] 其中肽的 0 个至所有 $-C(O)NH-$ 键已被选自以下的键置换: $-CH_2OC(O)NR-$ 键、磷酸酯键、 $-CH_2S(O)_2NR-$ 键、 $-CH_2NR-$ 键、 $-C(O)NR^6-$ 键和 $-NHC(O)NH-$ 键, 其中 R 是氢或低级烷基, R^6 是低级烷基,

[0021] 另外其中所述肽或肽模拟物的 N 端选自 $-NRR^1$ 基团、 $--NRC(O)R$ 基团、 $--NRC(O)OR$ 基团、 $--NRS(O)_2R$ 基团、 $--NHC(O)NHR$ 基团、琥珀酰亚胺基团、苄氧基羰基 $-NH-$ 基团和在苯环上含有 1-3 个取代基的苄氧基羰基 $-NH-$ 基团,所述取代基选自低级烷基、低级烷氧基、氯和溴,其中 R 和 R^1 独立选自氢和低级烷基,

[0022] 再另外其中所述肽或肽模拟物的 C 端具有式 $--C(O)R^2$,其中 R^2 选自羟基、低级烷氧基和 $-NR^3R^4$,其中 R^3 和 R^4 独立选自氢和低级烷基,其中 $-NR^3R^4$ 的氮原子可任选为肽 N 端的胺基,使得形成环肽。

[0023] 在相关的实施方案中,本发明涉及标记的肽或肽模拟物,它们包括共价结合了可检测标记的上述肽或肽模拟物。

[0024] 在一个实施方案中,核心肽化合物包含氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) :

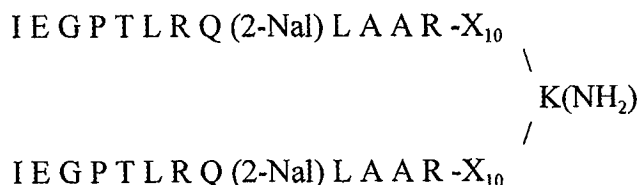
[0025] $X_9X_8GX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$

[0026] 其中 X_9 为 A、C、E、G、I、L、M、P、R、Q、S、T 或 V ; X_8 为 A、C、D、E、K、L、Q、R、S、T 或 V ; X_6 为 β -(2-萘基)丙氨酸残基(本文称为“2-Nal”)。更优选 X_9 为 A 或 I ; X_8 为 D、E 或 K。另外 X_1 为 C、L、M、P、Q、V ; X_2 为 F、K、L、N、Q、R、S、T 或 V ; X_3 为 C、F、I、L、M、R、S、V 或 W ; X_4 为任何 20 种遗传编码的 L-氨基酸 ; X_5 为 A、D、E、G、K、M、Q、R、S、T、V 或 Y ; X_7 为 C、G、I、K、L、M、N、R 或 V。

[0027] 特别优选的肽包含氨基酸序列 (SEQ ID NO :3) : I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R A。

[0028] 在另一个实施方案中,本发明的肽化合物优选二聚化或寡聚化,以增加化合物的亲合力和 / 或活力。优选的二聚化肽化合物的实例包括但不限于 :

[0029]



[0030] 其中 X_{10} 是肌氨酸或 β -丙氨酸残基 (SEQ ID NO :4)。以上的结构也可用以下结构表示 : $(H-I E G P T L R Q (2-Nal) L A A R X_{10})_2K-NH_2$ 。

[0031] 在另一个实施方案中,用于本发明的优选肽包括共价连接 1 个或多个各种亲水聚合物的肽。适合的亲水聚合物包括,但不限于,聚烷基醚例如聚乙二醇和聚丙二醇、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氧化烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素和纤维素衍生物、葡聚糖和葡聚糖衍生物等,如美国专利 5,869,451 中所述,其全部内容通过引用结合到本文中。

[0032] 本文描述的化合物用于预防和治疗由 TPO 介导的疾病,特别是用于治疗血液疾病,包括但不限于由于化疗、放疗或骨髓输入导致的血小板减少。因此,本发明也提供治疗方法,其中患者的病症对使用 TPO 激动剂的治疗敏感,该患者接受或被给予治疗有效量的本发明化合物。

[0033] 本发明也提供包含一种或多种本文所述化合物和生理可接受载体的药物组合物。这些药物组合物可以是各种形式,包括口服形式、可吸入粉末和溶液以及可注射和可输液溶液。

[0034] 附图简述

[0035] 图 1 显示和比较了不同化合物的活性。

[0036] 图 2 显示和比较了不同化合物的活性。

[0037] 图 3 显示和比较了大鼠体内血小板计数的变化,说明了聚乙二醇化化合物的相对功效。

[0038] 图 4 和 5 以剂量依赖的方式分别显示和比较了循环血小板的数目和容积。

[0039] 具体实施方案的描述

[0040] I. 定义和常用参数

[0041] 阐明以下定义以说明和定义用于描述本发明的各种术语的意义和范围。

[0042] “激动剂”指生物学活性配体,它结合其互补生物活性受体并激活后者,引起受体的生物学效应或增强受体现有的生物学活性。

[0043] “药物可接受的盐”指制药工业中常用的无毒碱金属、碱土金属和铵盐,包括钠、钾、锂、钙、镁、钡、铵和鱼精蛋白锌盐,它们可用本领域内已知的方法制备。该术语也包括无毒酸加成盐,其通常通过使本发明化合物与适当的有机酸或无机酸反应制得。代表性盐包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、乙酸盐、乙二酸盐、戊酸盐、油酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘磺酸盐等。

[0044] “药物可接受的酸加成盐”指保留了游离碱的生物学作用和性质,同时没有生物学或其它不良作用的盐,其用无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成,以及用有机酸例如乙酸、丙酸、羟乙酸、丙酮酸、乙二酸、苹果酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、延胡索酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等形成。对于药物可接受的酸加成盐作为前体药物的描述,参见 Bundgaard, H., *supra*。

[0045] “药物可接受的酯”指在酯键水解时保留了羧酸或醇的生物学作用和性质,同时没有生物学或其它不良作用的酯。对于药物可接受的酯作为前体药物的描述,参见 Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam(1985)。这些酯典型由相应的羧酸和醇形成。通常,通过常规的合成技术完成酯形成(参见例如 March, *Advanced Organic Chemistry*, 4th Ed., John Wiley & Sons, New York(1992), 393-396 和其中引用的文献,以及 Mark 等, *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, New York(1980))。酯的醇成分通常包含 (i) C_2-C_{12} 脂族醇,其可含有或不含有一个或多个双键,可含有或不含有支链碳,或 (ii) C_7-C_{12} 芳族或杂芳族醇。本发明也考虑使用既是本文所述的酯同时也是其药物可接受的酸加成盐的成分。

[0046] “药物可接受的酰胺”指在酰胺键水解时保留了羧酸或胺的生物学作用和性质,同时没有生物学或其它不良作用的酰胺。对于药物可接受的酰胺作为前体药物的描述,参见 Bundgaard, H., ed., *Design of Prodrugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam(1985)。这些酰胺典型由相应的羧酸和胺形成。通常,通过常规的合成技术完成酰胺形成(参见例如 March, *Advanced Organic Chemistry*, 4th Ed., John Wiley & Sons, New York(1992), p. 393 和 Mark 等, *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, New York(1980))。本发明也考虑使用既是本文所述的酰胺同时也是其药物可接受的酸加成盐的成分。

[0047] “药物可接受的或治疗可接受的载体”指不干扰活性成分的生物学活性的作用并

且对宿主或患者无毒的载体介质。

[0048] “立体异构体”指与另一种化合物具有相同分子量、化学组成和结构,但是原子排布不同的化合物。即,某些相同化学部分的空间取向不同,因此,当纯的时候,具有旋转偏振光平面的能力。然而,某些纯的立体异构体可具有的旋光性很微小,以至于用现有仪器不能检测到。本发明的化合物可具有一个或多个不对称碳原子,因此包括各种立体异构体。所有立体异构体都包括在本发明的范围内。

[0049] 用于本发明组合物中的“治疗有效量或药学有效量”指足以引起所需生物学效果的组合物量。效果可以是缓解征兆、症状或病因,或生物体系的其它任何所需变化。本发明中,效果典型地包括减轻感染或组织损伤的免疫反应和/或炎症反应。

[0050] 肽中氨基酸残基的缩写如下:苯丙氨酸为 Phe 或 F;亮氨酸为 Leu 或 L;异亮氨酸为 Ile 或 I;甲硫氨酸为 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;甘氨酸为 Gly 或 G。此外, t-Buo 为叔丁氧基, Bzl 为苄基, CHA 为环己胺, Ac 为乙酰基, Me 为甲基, Pen 为青霉胺, Aib 为氨基异丁酸, Nva 为正缬氨酸, Abu 为氨基丁酸, Thi 为噻吩丙氨酸, OBn 为 O-苄基, hyp 为羟脯氨酸。

[0051] 肽类似物常常作为与模板肽具有相似性质的非肽药物用于制药工业中。这些类型的非肽化合物称为“肽模拟物”(Luthman 等, A Textbook of Drug Design and Development, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers(1996); Joachim Grante, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:1699-1720(1994); Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29(1986); Veber and Freidinger TINS, p. 392(1985); 和 Evans 等, J. Med. Chem. 30:1229(1987), 这些文献通过引用结合到本文中)。与治疗有用肽结构相似的肽模拟物可用来产生相当的或增强的治疗或预防效果。通常,肽模拟物在结构上和标准多肽(即具有生物学或药理学活性的多肽,例如天然受体结合多肽)相似,但有一个或多个肽键任选被替代性键(例如 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 等)通过本领域内已知的方法置换,所述方法在以下参考文献中有进一步描述: Spatola, A. F., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983); Spatola, A. F., Vega Data(March 1983), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications(全面综述); Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463-468(1980), (全面综述); Hudson 等, Int. J. Pept. Prot. Res., 14:177-185(1979); Spatola 等, Life Sci., 38:1243-1249(1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314(1982); Almquist 等, J. Med. Chem., 23:1392-1398, (1980); Jennings-White 等, Tetrahedron Lett. 23:2533(1982); Szelke 等, European Appln. EP 45665(1982); Holladay 等, Tetrahedron Lett., 24:4401-4404(1983); 和 Hruby, Life Sci., 31:189-199(1982); 它们各自通过引用结合到本文中。特别优选的非肽键是 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 。这种肽模拟物与多肽实施方案相比具有显著的优势,包括,例如:生产更经济、化学稳定性更好、药理性质增强(半寿期、吸收、效能、效力等)、特异性改变(例如广谱生物学活性)、抗原性降低等。肽模拟物的标记通常涉及直接或通过间隔基团(例如酰胺基团),将一个或多个标记共价结合到肽模拟物上的非干扰位置,这些位置通过定量结构-活

性数据和 / 或分子模型预测。这种非干扰位置通常是不和大分子（例如免疫球蛋白超家族分子）形成直接接触的位置，而肽模拟物结合这些大分子以产生疗效。肽模拟物的衍生化（例如标记）不应该显著干扰肽模拟物的所需生物学或药理学活性。通常，受体结合肽的肽模拟物以高亲和力结合受体，且具有可检测的生物学活性（例如，激动或拮抗一种或多种受体介导的表型变化）。

[0052] 用同型 D- 氨基酸系统性替换共有序列的一个或多个氨基酸（例如用 D- 赖氨酸替换 L- 赖氨酸）可用于产生更稳定的肽。此外，包含共有序列或基本相同的共有序列变异的约束肽 (constrained peptides) 可通过本领域已知的方法产生 (Rizo 等, Ann. Rev. Biochem., 61:387(1992), 通过引用结合到本文中)；例如，通过加入内部半胱氨酸残基，其能形成使肽环化的分子内二硫键。

[0053] “可检测标记”指共价结合到本发明肽和肽模拟物上，允许在已给予肽和肽模拟物的患者体内检测肽和肽模拟物的材料。适合的可检测标记在本领域内已知，包括，以举例的方式，放射性同位素、荧光标记（例如荧光素）等。所采用的具体可检测标记不重要，根据所采用的标记量和所采用的标记量下标记的毒性来选择。根据这些因素选择标记在本领域的技术内。

[0054] 通过本领域内已知的常规方法将可检测标记共价连接到肽或肽模拟物上。例如，当 ^{125}I 放射性同位素用作可检测标记时，可通过将酪氨酸掺入肽和肽模拟物，然后碘化该肽，将 ^{125}I 共价连接到肽或肽模拟物上（参见例如 Weaner 等, Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp. 137-140(1994)。可通过已知化学方法将酪氨酸掺入肽或肽模拟物的 N 端或 C 端。同样的，用常规化学方法，通过例如肽或肽模拟物上的羟基基团，可将 ^{32}P 作为磷酸部分掺入肽或肽模拟物。

[0055] II. 概述

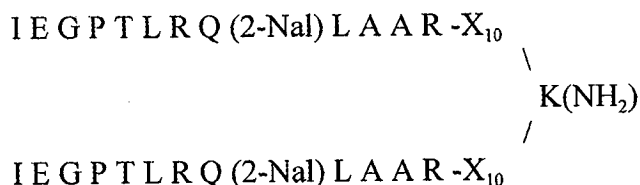
[0056] 本发明提供结合并激活 TPO-R 或表现为 TPO 激动剂的化合物。这些化合物包括“先导”肽化合物和“衍生化”化合物，后者构建为与先导化合物具有相同或相似的分子结构或形状，但是在对水解或蛋白水解的敏感性方面和 / 或在其它生物性质方面与先导化合物不同，例如具有更强的受体亲和力。本发明也提供包含有效量的 TPO 激动剂的组合物，具体地说是用于治疗血液疾病的化合物，该疾病具体地说是与化疗、放疗或骨髓输入有关的血小板减少。

[0057] 已发现核心肽可包含氨基酸序列 (SEQ ID NO:2): $X_9 X_8 G X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$, 其中 X_6 可以是 β -(1-萘基)丙氨酸, X_9 为 A、C、E、G、I、L、M、P、R、Q、S、T 或 V; X_8 为 A、C、D、E、K、L、Q、R、S、T 或 V。更优选 X_9 为 A 或 I; X_8 为 D、E 或 K。另外, X_1 为 C、L、M、P、Q、V; X_2 为 F、K、L、N、Q、R、S、T 或 V; X_3 为 C、F、I、L、M、R、S、V 或 W; X_4 为任何 20 种遗传编码的 L- 氨基酸; X_5 为 A、D、E、G、K、M、Q、R、S、T、V 或 Y; X_7 为 C、G、I、K、L、M、N、R 或 V。

[0058] 然而, 如下所述, 已令人惊讶的发现通过用 β -(2-萘基)丙氨酸置换 X_6 , 化合物提供了比含有 β -(1-萘基)丙氨酸的化合物更强的性质。因此, 特别优选的肽包含氨基酸序列 (SEQ ID NO:3): I E G P T L R Q(2-Nal)L A A R A。

[0059] 在另一个实施方案中, 本发明的肽化合物优选二聚化或寡聚化, 以增加化合物的亲和力和 / 或活性。优选的二聚化肽化合物的实例包括但不限于以下:

[0060]



[0061] 其中, X₁₀ 是肌氨酸或 β-丙氨酸残基 (SEQ ID NO :4)。需要注意的是, 一个 X₁₀ 可以是肌氨酸而另一个 X₁₀ 残基可以是 β-丙氨酸。以上结构也可以用以下表示 : (H-I E G P T L R Q(2-Na1)L A A R X₁₀)₉K-NH₂。

[0062] IC₅₀ 大于约 100mM 的肽和肽模拟物缺乏足够的结合能力而不能用于本发明的诊断或治疗方面。优选地,用于诊断目的的肽和肽模拟物具有的 IC₅₀ 为约 2mM 或更低,用于药物目的的肽和肽模拟物具有的 IC₅₀ 为约 100 μ M 或更低。

[0063] 图1采用标准的相对发光单元检测技术,比较了三个不同批次的未PEG化 I E G P T L R Q(2-Na1)L A A R 和未PEG化 I E G P T L R Q(1-Na1)L A A R。该检测方法采用工程化稳定表达人 TP0 受体的鼠细胞和由 fos 启动子驱动的荧光素酶报道基因构建体。如图1所示,各化合物的活性相似。

[0064] 图2比较了几种不同的PEG化肽的活性(下文将详细描述本发明化合物的聚乙二醇化)。两种PEG化I E G P T L R Q(1-Nal)L A A R化合物显示高活性,和未PEG化肽的活性水平基本相同。其余的线说明不同PEG化批次的二聚化I E G P T L R Q(2-Nal)L A A R的活性。如图2所示,在该模型中,后者的活性比PEG化I E G P T L R Q(1-Nal)L A A R化合物低。

[0065] 图3显示含有 β -(1-萘基)丙氨酸的PEG化肽和含有 β -(2-萘基)丙氨酸的PEG化肽的相对效力。通过大鼠模型,图3显示给予二聚化的PEG化 β -(1-萘基)丙氨酸和 β -(2-萘基)丙氨酸后体内血小板计数的变化。如图3所示,PEG化 β -(2-萘基)丙氨酸的最高剂量所具有的活性和PEG化 β -(1-萘基)丙氨酸的最低剂量相同。效力较弱的化合物可对靶细胞提供更小的剧烈刺激,这可降低过度刺激靶细胞造成副作用的风险,例如下一轮化疗后血小板减少加剧。

[0066] 图4和5显示了正常大鼠中含有 β -(1-萘基)丙氨酸的PEG化肽和含有 β -(2-萘基)丙氨酸的PEG化肽的点头(head-to-head)量效研究结果。图4显示了血小板水平的增加,图5显示了治疗后第6天的平均血小板容积。剂量范围是10-3000 μ g/kg。两种化合物都以剂量依赖的方式增加循环血小板的数量,两种化合物在低至30 μ g/kg的剂量下观察到相对对照组的增加。在最大效应时,这些化合物将血小板计数升到对照值4倍的水平。这些化合物的量效曲线非常相似,提示在该模型中这两种试验品基于这些终点不存在本质差别。

[0067] IV. 制备肽和肽模拟物

[0068] A. 固相合成

[0069] 本发明的肽可用本领域内已知的经典方法制备,例如,通过采用标准的固相技术。标准方法包括完全的固相合成、部分固相合成方法、片段浓缩、经典的液相合成甚至是重组DNA技术。参见,例如, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963), 通过引用结合到本文中。在固相上,典型合成始于肽的C末端,采用 α -氨基保护的树脂。可制备适当的起始材料,例如,将需要的 α -氨基酸结合到氯甲基化树脂、羟甲基树脂或二苯甲基胺树脂。

一种这样的氯甲基化树脂在商标名 BIO-BEADS SX-1 (Bio Rad Laboratories, Richmond, CA) 下销售, Bodonszky 等, Chem. Ind. (London), 38 :1597 (1966) 描述了羟甲基树脂的制备。Pietta 和 Marshall, Chem. Commn., 650 (1970) 已描述了二苯甲基胺 (BHA) 树脂, 这种树脂以盐酸形式由 Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Calif 市售。

[0070] 因此, 借助例如碳酸氢铯催化剂, 按照 Gisin, Helv. Chim. Acta., 56 :1467 (1973) 描述的方法, 通过将 α -氨基受保护的氨基酸偶联到氯甲基化树脂上, 可以制备本发明的化合物。最初偶联后, 通过某些试剂, 包括三氟乙酸 (TFA) 或氢氯酸 (HCl) 在有机溶剂中的溶液, 在室温下将 α -氨基的保护基团除去。

[0071] α -氨基保护基团是已知用于肽的分步合成领域的基团。包括酰基型保护基团 (例如甲酰基、三氟乙酰基、乙酰基)、氨基甲酸芳族酯型保护基团 (例如苄氧基羰基 (Cbz) 和取代的 Cbz)、氨基甲酸脂族酯保护基团 (例如叔丁氧基羰基 (Boc)、异丙氧基羰基、环己氧基羰基) 和烷基型保护基团 (例如苄基、三苯甲基)。Boc 和 Fmoc 是优选的保护基团。在连接过程中侧链保护基团保持完整, 在 N 端保护基团去保护或连接的过程中不裂解。侧链的保护基团必须在最终肽合成完毕时以及在不改变目标肽的反应条件下是可除去的。

[0072] 酪氨酸的侧链保护基团包括四氢吡喃基、叔丁基、三苯甲基、苄基、Cbz、Z-Br-Cbz 和 2,5-二氯苄基。天冬氨酸的侧链保护基团包括苄基、2,6-二氯苄基、甲基、乙基和环己基。苏氨酸和丝氨酸的侧链保护基团包括乙酰基、苯甲酰基、三苯甲基、四氢吡喃基、苄基、2,6-二氯苄基和 Cbz。苏氨酸和丝氨酸的侧链保护基团是苄基。精氨酸的侧链保护基团包括硝基、甲苯磺酰基 (Tos)、Cbz、金刚烷基氧基羰基、~~苯~~酰磺酰基 (Mts) 或 Boc。赖氨酸的侧链保护基团包括 Cbz、2-氯苄氧基羰基 (2-Cl-Cbz)、2-溴苄氧基羰基 (2-BrCbz)、Tos 或 Boc。

[0073] 除去 α -氨基保护基团以后, 按所需的顺序分步偶联余下的被保护氨基酸。过量的各种受保护氨基酸通常和适当的羧基激活剂一起使用, 例如二环己基碳二亚胺 (DCC) 的溶液, 例如在二氯甲烷 (CH_2Cl_2)、二甲基甲酰胺 (DMF) 混合物中。

[0074] 所需的氨基酸序列完成后, 通过用三氟乙酸或氟化氢 (HF) 等试剂处理, 将所需的肽从树脂支持物上解偶联, 这不仅将肽从树脂上分离, 还切除所有余下的侧链保护基团。当使用氯甲基化树脂时, 氟化氢处理导致游离肽酸的形成。当使用二苯甲基胺树脂时, 氟化氢处理直接产生游离肽酰胺。或者, 采用氯甲基化树脂时, 通过用氨处理肽树脂, 解偶联侧链受保护的肽, 得到所需的侧链受保护的酰胺, 或通过用烷基胺处理, 得到侧链受保护的烷基酰胺或二烷基酰胺。随后通过常用的方式用氟化氢处理除去侧链保护, 得到游离的酰胺、烷基酰胺或二烷基酰胺。

[0075] 这些固相的肽合成方法在本领域内已知, 由 John Morrow Stewart 和 Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984) 进一步描述。

[0076] B. 合成的氨基酸

[0077] 也可使用这些方法合成其中本发明任何化合物的 1 个、2 个或更多位置被 20 种天然遗传编码氨基酸以外的氨基酸取代的肽。

[0078] 可以将 20 种遗传编码氨基酸 (或 D-氨基酸) 的天然侧链替换成其它侧链, 例如烷基、低级烷基、环状 4 元、5 元、6 元至 7 元烷基、酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二 (低级烷基)、

低级烷氧基、羟基、羧基及其低级酯衍生物和 4 元、5 元、6 元至 7 元的杂环。具体地说,可采用其中脯氨酸残基的环大小从 5 元改成 4 元、6 元或 7 元的脯氨酸模拟物。环状基团可以是饱和或不饱和的,如果是不饱和的,可以是芳族或非芳族的。杂环基团优选含有一个或多个氮、氧和 / 或硫杂原子。这种基团的实例包括咪唑基、咪唑基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、异噻唑基、异噻唑基、吗啉基 (例如吗啉代)、噻唑基、哌嗪基 (例如 1- 哌嗪基)、哌啶基 (例如 1- 哌啶基、哌啶子基)、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基 (例如 1- 吡咯烷基)、吡咯啉基、吡咯基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、硫代吗啉基 (例如硫代吗啉代) 和三唑基。这些杂环基团可以是取代或未取代的。基团被取代时,取代基可以是烷基、烷氧基、卤素、氧或取代或未取代的苯基。

[0079] 通过磷酸化可容易地修饰本发明的肽 (参见例如 W. Bannwarth 等, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6(17):2141-2146(1996)), 制备本发明化合物的肽衍生物的其它方法描述于 Hruby 等, *Biochem. J.*, 268(2):249-262(1990)。因此,本发明的肽化合物也用作制备具有相似生物学活性的肽模拟物的基础。

[0080] C. 末端修饰

[0081] 本领域技术人员知道,各种技术可用来构造肽模拟物,其与相应的肽化合物具有相同或相似的所需生物学活性,但在溶解性、稳定性、对水解和蛋白水解的敏感性方面前者比肽具有更有利的活性。参见例如 Morgan 等, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252(1989)。下面描述了制备肽模拟物的方法,该模拟物在 N 端氨基基团修饰、在 C 端羧基基团修饰和 / 或将肽中的一个或多个酰胺键改变成非酰胺键。应理解一个肽模拟物结构中可结合 2 种或更多这种修饰 (例如,在肽中修饰 C 端的羧基基团并且在两个氨基酸之间引入 $-CH_2-$ 甲酰胺键)。

[0082] 1. N 末端修饰

[0083] 典型合成的肽为游离酸,但是如前所述,可容易地将肽制备成酰胺或酯。也可修饰本发明肽化合物的氨基端和 / 或羧基端,产生本发明的其它化合物。氨基端修饰包括甲基化、乙酰化、添加苄氧基羰基或用任何封闭基团 (其含有定义为 $RCOO-$ 的羧酸功能团,其中 R 选自萘基、吡啶基、类固醇基和类似基团) 封闭氨基端。羧基端修饰包括用甲酰胺基团置换游离酸,或为了引入结构限制在羧基端形成环状内酰胺。

[0084] 氨基端修饰如上所述,包括烷基化、乙酰化、添加羧苯甲酰基、形成琥珀酰亚胺基团等 (参见例如 Murray 等, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc. (1995))。具体来说, N 末端氨基可如下反应: (a) 通过与酰卤或对称酸酐反应,形成式 $RC(O)NH-$ 的酰胺基,其中 R 的定义如上。典型地,反应可在惰性稀释剂 (例如二氯甲烷) 中,为清除反应中产生的酸,稀释剂优选含有过量的 (例如约 10 当量的) 叔胺如二异丙基乙胺,使约等摩尔或过量的 (例如约 5 当量的) 酰卤和肽接触。其它的反应条件是常规的 (例如室温下 30 分钟)。末端氨基的烷基化提供低级烷基 N- 取代,然后如上所述与酰卤反应,提供式 $RC(O)NR-$ 的 N- 烷基酰胺基团;

[0085] (b) 通过与琥珀酸酐反应形成琥珀酰亚胺。如前,可采用近似等摩尔量或过量的琥珀酸酐 (例如约 5 当量),用本领域内已知的方法将氨基转化成琥珀酰亚胺,该方法包括使用适当惰性溶剂 (例如二氯甲烷) 中的过量 (例如 10 当量) 叔胺如二异丙基乙胺。参见

例如 Wollenberg 等, 美国专利 4, 612, 132, 其通过引用整体结合到本文中。可理解的是, 琥珀基团可用例如常规方式制备的烷基或 $-\text{SR}$ 取代基取代, 在肽的 N 端提供取代的琥珀酰亚胺。以 Wollenberg 等, *supra* 描述的方式, 通过使低级烯烃和马来酸酐反应来制备这种烷基取代基, $-\text{SR}$ 取代基由 RSH 和马来酸酐反应制得, 其中 R 的定义如上;

[0086] (c) 通过在适当的惰性稀释剂 (例如二氯甲烷) 中与近似等量或过量的 $\text{CBZ}-\text{Cl}$ (即苄氧基羰基氯) 或取代 $\text{CBZ}-\text{Cl}$ 反应, 形成苄氧基羰基 $-\text{NH}-$ 或取代的苄氧基羰基 $-\text{NH}-$ 基团, 为清除反应中产生的酸, 稀释剂优选含有叔胺;

[0087] (d) 通过在适当的惰性稀释剂 (二氯甲烷) 中与等量或过量 (例如 5 当量) 的 $\text{R}-\text{S}(\text{O})_2\text{Cl}$ 反应, 将末端胺转化成磺酰胺, 形成磺酰胺基团, 其中 R 的定义如上。为清除反应中产生的酸, 惰性稀释剂优选含有过量的叔胺 (例如 10 当量) 例如二异丙基乙胺。其它的反应条件是常规的 (例如室温下 30 分钟);

[0088] (e) 通过在适当的惰性稀释剂 (例如二氯甲烷) 中与等量或过量的 (例如 5 当量) 的 $\text{R}-\text{OC}(\text{O})\text{Cl}$ 或 $\text{R}-\text{OC}(\text{O})\text{OC}_6\text{H}_4-\text{p}-\text{NO}_2$ 反应, 将末端胺转化成氨基甲酸酯, 形成氨基甲酸酯基团, 其中 R 的定义如上。为清除反应中产生的酸, 惰性稀释剂优选含有过量 (例如 10 当量) 的叔胺如二异丙基乙胺。其它的反应条件是常规的 (例如室温下 30 分钟);

[0089] (f) 通过在适当的惰性稀释剂 (例如二氯甲烷) 中与等量或过量的 (例如 5 当量) 的 $\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 反应, 将末端胺转变成脲 (即 $\text{RNHC}(\text{O})\text{NH}-$) 基团, 形成脲基团, 其中 R 的定义如上。优选惰性稀释剂含有过量 (例如 10 当量) 的叔胺如二异丙基乙胺。其它的反应条件是常规的 (例如室温下约 30 分钟)。

[0090] 2. C 末端修饰

[0091] 在制备其中 C 端羧基被酯 (即 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$, 其中 R 的定义如上) 替换的肽模拟物时, 采用用于制备肽酸的树脂, 用碱和适当的醇 (例如甲醇) 切下侧链被保护的肽。随后以常用方式通过用氟化氢处理除去侧链保护基团, 得到所需的酯。

[0092] 在制备其中 C 端羧基被酰胺 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^4$ 置换的肽模拟物时, 采用二苯甲基胺树脂作为肽合成的固相支持物。合成完毕后, 用氟化氢处理将肽从支持物上释放, 直接生成游离的肽酰胺 (即 C 端是 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$)。或者, 在肽合成时采用氯甲基化树脂, 与用氨将侧链受保护的肽从支持物上切除的反应结合, 生成游离的肽酰胺; 与烷基胺或二烷基胺反应生成侧链受保护的烷基酰胺或二烷基酰胺 (即 C 端是 $-\text{C}(\text{O})\text{NRR}^1$, 其中 R 和 R^1 的定义如上)。以通常方式通过用氟化氢处理除去侧链保护基团, 得到游离的酰胺、烷基酰胺或二烷基酰胺。

[0093] 也可环化本发明的肽, 或在肽的末端掺入去氨基或去羧基的残基, 从而没有末端氨基或末端羧基, 降低对蛋白酶的敏感性或限制肽的构象。本发明化合物的 C 端功能团包括酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二 (低级烷基)、低级烷氧基、羟基、羧基及其低级酯衍生物, 及其药物可接受的盐。

[0094] 除了前述的 N 端和 C 端修饰, 本发明的肽化合物, 包括肽模拟物, 可有利地用一个或多个各种亲水聚合物修饰或与之共价结合。已发现当肽化合物用亲水聚合物衍生化时, 它们的溶解性和循环半寿期增加而且免疫原性被掩盖。可完成前述的修饰而很少 (如果有) 削弱它们的结合活性。适用于本发明的非蛋白质聚合物包括, 但不限于, 聚烷基醚例如聚乙二醇和聚丙二醇、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氧化烯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素和纤维素的衍生物、葡聚糖和葡聚糖的衍生物等。通常, 这种亲水聚合物的平均分子量在

约 500 至约 100,000 道尔顿的范围内,更优选约 2,000 至约 40,000 道尔顿,甚至更优选约 5,000 至约 20,000 道尔顿。在优选的实施方案中,这种亲水聚合物的平均分子量为约 5,000 道尔顿、10,000 道尔顿和 20,000 道尔顿。

[0095] 采用任何以下文献中的方法,本发明的肽化合物可用这种聚合物衍生化或与之共价结合;Zallipsky, S., *Bioconjugate Chem.*, 6:150-165(1995); Monfardini, C 等, *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69(1995); 美国专利 4,640,835; 美国专利 4,496,689; 美国专利 4,301,144; 美国专利 4,670,417; 美国专利 4,791,192; 美国专利 4,179,337 或 WO 95/34326, 所有文献通过引用整体结合到本文中。

[0096] 在本优选实施方案中,本发明的肽化合物用聚乙二醇 (PEG) 衍生化。PEG 是环氧乙烷重复单元的线性水溶性聚合物,具有两个末端羟基。PEG 通过其分子量分类,典型的分子量是约 500 至约 40,000 道尔顿。在本优选实施方案中,采用的 PEG 的分子量范围是约 5,000 道尔顿至约 20,000 道尔顿。结合到本发明肽化合物上的 PEG 可以是分支或不分支的(参见例如 Monfardini, C. 等, *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69(1995))。PEG 可由 Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala.) (现在是 Nektar Therapeutics (San Carlo, CA) 的部分)、Sigma Chemical Co. 和其它公司市售。这种 PEG 包括,但不限于,一甲氧基聚乙二醇 (MePEG-OH)、一甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯 (MePEG-S)、一甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、一甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH₂)、一甲氧基聚乙二醇-三氟乙磺酸酯 (MePEG-TRES) 和一甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM)。

[0097] 简要地说,在一个实施方案中,采用的亲水聚合物,例如 PEG,在一端优选非反应性基团例如甲氧基或乙氧基封端。随后,通过与适当的活化剂反应,在另一端活化聚合物,活化剂例如氰尿酸卤(例如氰尿酸氯、氰尿酸溴或氰尿酸氟)、diimadazole、酞试剂(例如二卤琥珀酸酐如二溴琥珀酸酐)、酰基叠氮、对重氮鎓(p-diazoiumbenzyl) 苯甲醚、3-(对重氮鎓苯氧基)-2-羟丙基醚等。然后活化的聚合物与本发明的肽化合物反应,生成用聚合物衍生化的肽化合物。或者,本发明的肽化合物中功能团可被活化以与聚合物反应,或用已知的偶联方法在协同反应中偶联两个基团。很容易理解,用本领域技术人员了解和使用的各种其它反应流程,可用 PEG 衍生化本发明的肽化合物。

[0098] 当肽用亲水聚合物衍生化后,它们的溶解性和循环半寿期增加而免疫原性降低。可完成前述过程而生物活性损失非常小(如果有)。在优选的实施方案中,衍生化肽的活性是未修饰肽的 0.1 至 0.01 倍。在更优选的实施方案中,衍生化肽的活性是未修饰肽的 0.1 至 1 倍。在甚至更优选的实施方案中,衍生化肽的活性比未修饰肽的高。

[0099] D. 骨架修饰

[0100] 制备本发明化合物的肽衍生物的有关方法描述于 Hruby 等, *Biochem J.*, 268(2): 249-262(1990) 中,其通过引用结合到本文中。因此,本发明的肽化合物也可用作具有相似生物学活性的非肽化合物的结构模型。本领域的技术人员知道,可获得各种技术用于构建与先导肽化合物具有相同或相似的所需生物学活性,但在溶解性、稳定性、对水解和蛋白水解的敏感性方面比先导肽具有更有利活性的化合物。参见 Morgan 等, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252(1989), 通过引用结合到本文中。这些技术包括将肽骨架替换成磷酸酯、酰胺化物、氨基甲酸酯、磺酰胺、仲胺和 N-甲基氨基酸组成的骨架。

[0101] 适合的试剂包括,例如,氨基酸类似物,其中氨基酸的羧基已被适合形成一种以上

键的基团替换。

[0102] 相似的,以美国专利申请 07/943,805、08/081,577 和 08/119,700 中描述的方式,可用磷酸酯键替换肽中的酰胺键,这些专利申请通过引用整体结合到本文中。

[0103] 以美国专利申请 08/147,805 中描述的方式,可用脲键替换肽中的酰胺键,该申请通过引用整体结合到本文中。

[0104] E. 二硫键的形成

[0105] 如果存在,本发明化合物可通过掺入的半胱氨酸巯基间的分子内二硫键以环状的形式存在。或者,可产生半胱氨酸巯基间的分子间二硫键,生成二聚化(或更高寡聚化)的化合物。一个或多个半胱氨酸也可用高半胱氨酸替换。

[0106] V. 用途

[0107] 本发明的化合物在体外用作独特的工具,用于理解 TPO 的生物学作用,包括评估许多认为影响 TPO 生成和受体结合过程的因素和受其影响的因素。本发明化合物也用于开发其它结合并激活 TPO-R 的化合物,因为本发明化合物提供了构效关系的重要信息,这为这种开发提供了便利。

[0108] 该化合物也可在筛选新 TPO 受体激动剂的检测中用作竞争性结合物。在这种检测实施方案中,本发明的化合物可不经修饰使用,也可通过各种方式修饰;例如通过标记,如共价或非共价连接直接或间接提供可检测信号的部分。在任何这些检测方法中,可直接或间接标记其中的材料。直接标记的可能性包括标记基团如:放射标记如 ^{125}I 、酶(美国专利 No. 3,645,090)如过氧化物酶和碱性磷酸酯酶、能监测荧光强度、波长迁移或荧光偏振变化的荧光标记(美国专利 No. 3,940,475)。间接标记的可能性包括将某一种组分生物素化,再将抗生物素蛋白与一种以上标记基团结合。需要化合物结合到固相支持物上的情况下,化合物也可以包含间隔基团或连接基团。

[0109] 而且,基于本发明的肽结合 TPO 受体的能力,它们也可用作试剂检测活细胞上、固着细胞上、生物体液中、组织匀浆中、纯化的天然生物材料中等的 TPO 受体。例如,通过标记这种肽,可鉴定出表面具有 TPO-R 的细胞。此外,基于它们结合 TPO 受体的能力,本发明的肽可用于原位染色、FACS(荧光激活的细胞分选)、蛋白质印迹、ELISA 等。此外,基于它们结合 TPO 受体的能力,本发明的肽可用于受体纯化,或纯化在细胞表面表达 TPO 受体的细胞(或经内部渗透化的细胞)。

[0110] 本发明的化合物也可用作各种医学研究和诊断用途的商品化试剂。这些用途包括但不限于:(1) 在各种功能检测中用作定量候选 TPO 激动剂活性的校正标准;(2) 用于维持 TPO 依赖性细胞系的增殖和生长;(3) 通过共结晶用于 TPO 受体的结构分析;(4) 用于研究 TPO 信号传导/受体活化的机制;(5) 其它的研究和诊断应用,其中 TPO 受体优选被活化或这种活化方便地对已知量的 TPO 激动剂校正等。

[0111] 本发明的化合物与另外的细胞因子连用或单独使用,可用于巨核细胞和它们的定向祖细胞的体外扩增。参见例如 DiGiusto 等, PCT 公开 95/05843,其通过引用结合到本文中。化疗和放疗通过杀死迅速分裂、较为成熟的巨核细胞群导致血小板减少。然而,这种疗法也可减少不成熟的、有丝分裂较不活跃的巨核细胞前体细胞的数量和活力。因此,通过向化疗或放疗后患者输送经体外培养富集了巨核细胞和不成熟前体细胞的他或她的自身细胞群,可促进 TPO 或本发明的化合物对血小板减少的缓解作用。

[0112] 本发明的化合物也可给予温血动物,包括人,以体内激活 TPO-R。因此,本发明包括治疗 TPO 相关疾病的方法,包括给予足以在体内模拟 TPO 对 TPO-R 效果的量的本发明化合物。例如,可给予本发明的肽和化合物用于治疗各种血液疾病,包括但不限于血小板疾病和血小板减少,特别是和化疗、放疗或骨髓输入有关时。

[0113] 在本发明的某些实施方案中,对进行化疗或放疗的患者优选首先给予 TPO 拮抗剂,随后给予本发明的 TPO 激动剂。

[0114] 可以在多种模型的一种中对本发明化合物的活性进行体外或体内评估,模型的描述参见 McDonald, Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14 :8-21 (1992), 其通过引用结合到本文中。

[0115] 根据一个实施方案,本发明的组合物用于治疗与骨髓输入、放疗或化疗相关的血小板减少。典型地,化合物在化疗、放疗或骨髓移植前预防性地给予,或是在这种暴露之后给予。

[0116] 因此,本发明也提供药物组合物,其包含至少一种本发明的肽或肽模拟物作为活性成分,以及药用载体或稀释剂。本发明的化合物可通过口服、肺部、胃肠外(肌内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、吸入(通过微小粉末制剂)、透皮、鼻、阴道、直肠或舌下途径给药,并可配制成适合各种给药途径的剂型。参见例如 Bernstein 等, PCT 专利公开号 WO 93/25221 ;Pitt 等, PCT 专利公开号 WO 94/17784 ;Pitt 等, 欧洲专利申请 613,683, 它们各自通过引用结合到本文中。

[0117] 口服给予的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉末剂和颗粒剂。在这种固体剂型中,活性化合物和至少一种惰性药物可接受的载体混合,例如蔗糖、乳糖或淀粉。这种剂型也可包括,如正常的实践,惰性稀释剂之外的其它物质,例如润滑剂如硬脂酸镁。对于胶囊、片剂和丸剂的情况,剂型也可包含缓冲剂。片剂和丸剂可额外地采用肠衣制备。

[0118] 口服给予的液体剂型包括药物可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂以及酏剂,它们含有本领域内常用的惰性稀释剂,例如水。除了这种惰性稀释剂,组合物也可以包含辅药,例如润湿剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0119] 胃肠外给予的本发明制剂包括无菌的水溶液或非水溶液、混悬剂或乳剂。非水溶剂或载体的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和玉米油、明胶和可注射有机酯如油酸乙酯。这种剂型也可包含辅药例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过过滤经过截留细菌的滤膜、向组合物中加入灭菌剂、辐射照射组合物或加热组合物,可以将它们灭菌。它们也可在临用前用无菌水或某些其它无菌可注射介质制备。

[0120] 直肠或阴道给予的组合物优选是栓剂,除了活性物质以外,它可含有赋形剂例如可可酯或栓剂蜡。鼻或舌下给予的组合物也用本领域内熟知的标准赋形剂制备。

[0121] 可给予含有化合物的组合物用于预防性和/或治疗性治疗。在治疗应用中,将足以治愈或至少部分阻止疾病和其并发症症状的量的组合物给予已患有上述疾病的患者。足以达到此目的的量定义为“治疗有效量”。该用途的有效量取决于疾病的严重程度以及患者的体重和总体状况。

[0122] 通过例如 Tice 和 Bibi 的方法,本发明的组合物也可微囊化 (Treatise on Controlled Drug Delivery, ed. A. Kydonieus, Marcel Dekker, New York (1992), pp. 315-339 中)。

[0123] 在预防应用中,向易患或有风险患具体疾病的患者给予含有本发明化合物的组合物。这种量定义为“预防有效量”。在此用途中,精确的量也取决于患者的健康状况和体重。

[0124] TP0 激动剂的有效治疗必需量取决于许多不同因素,包括给药方式、靶点、患者的生理状况以及给予的其它药物。因此,应调整 (titrate) 治疗剂量以得到最佳安全性和有效性。典型地,体外使用的剂量可为这些药物的原位给药量提供有用的指导。治疗具体病症的有效剂量的动物试验为人剂量提供了进一步的预测性指示。各种考虑因素描述于,例如 Gilman 等 (eds), Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press (1990); 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 7th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1985), 它们各自通过引用结合到本文中。

[0125] 当每天给予的剂量在约 0.001mg 至约 10mg/kg 体重的范围内时,本发明的肽和肽模拟物对治疗 TP0 介导的病症有效。采用的具体剂量由具体待治疗疾病、给药途径和主治临床医生的判断来调节,该判断取决于疾病的严重程度、患者的年龄和总体状况等因素。

[0126] 实施例 1

[0127] 固相肽合成

[0128] 本发明的肽可例如采用 Merrifield 固相合成技术 (参见 Steward and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. edition, Pierce Chemical, Rockford, Ill. (1984); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1963)) 或使用 Applied Biosystems Inc. Model 431A 或 433A 肽合成仪合成。可采用 Applied Biosystems Inc. Synth Assist.™. 1.0.0 或 Synth Assist.™. 2.0.2. 的标准程序组装肽。各偶联可进行 2 次 30 分钟,采用 HBTU (六氟磷酸 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基) -1,1,3,3- 四甲基脒鎓) 和 HOBT (1- 羟基苯并三唑)。

[0129] 所用的树脂可以是 HMP 树脂 (对羟甲基苯氧基甲基) 聚苯乙烯树脂或 PAL (Milligen/Biosearch), 它们是交联的聚苯乙烯树脂,采用 5-(4'-Fmoc- 氨基甲基 -3,5'- 二甲氧基苯氧基) 戊酸作为连接基团。使用 PAL 树脂导致肽从树脂上切除时生成羧基端酰胺功能团。切除时, HMP 树脂在终产物的 C 端产生羧酸部分。大多数试剂、树脂和保护氨基酸 (游离或在树脂上) 可购自 Millipore 或 Applied Biosystems Inc.。

[0130] 在偶联过程中, Fmoc 基团可用于氨基保护。氨基酸上伯胺的保护可用 Fmoc 和侧链保护基团完成; 例如叔丁基用于丝氨酸、酪氨酸、谷氨酸和苏氨酸; 三苯甲基用于谷氨酰胺; Pmc (2,2,5,7,8- 五甲基苯并二氢吡喃 -6- 磺酰基) 用于精氨酸; N- 叔丁氧基羰基用于色氨酸; N- 三苯甲基用于组氨酸; S- 三苯甲基用于半胱氨酸。

[0131] 可通过用试剂 K 或其轻微改良物处理,将肽从树脂上除下,同时将侧链功能团去保护。或者,在带有酰胺化羧基末端的这些肽的合成中,可用 90% 三氟乙酸、5% 乙二硫醇和 5% 水的混合物将完全装配好的肽剪切下来,最初在 4°C, 然后逐渐升至室温。可用二乙醚沉淀去保护的肽。可通过制备型反相高效液相色谱,在 C18 键合硅胶柱上,用含 0.1% 三氟乙酸的乙腈 / 水梯度进行纯化。可应用时,可通过快原子轰击质谱或电喷雾质谱以及氨基酸分析鉴定均质的肽。

[0132] 在优选的实施方案中,采用本领域技术人员熟知和使用的标准合成方法,将本发明的肽二聚化。按照这些合成流程,本领域技术人员可容易地制备本发明的二聚体肽化合物。而且,使用已知的方法和连接基团,可容易地将二聚亚单元连接在一起,这对本领域技

术人员来说是显而易见的。

[0133] 实施例 2

[0134] 肽的聚乙二醇化

[0135] 本发明的多肽可以以 10mg/ml 的浓度溶于 N-二(羟乙基)甘氨酸(100mM, pH 8.0), 加入 1.25 倍摩尔的过量粉末状 PEG2(Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Ala) 市售), 室温下搅拌直至反应完全, 典型是 1 至 2 小时。反应用反相 HPLC 监控, 在 YMC ODS AQ 柱上采用 40-65% 的乙腈梯度。当反应完成时, 向溶液中加入第二份 1.25 倍摩尔的过量粉末状 PEG2, 该过程重复 4 次, 每摩尔多肽总共使用 5 摩尔 PEG2。用 PBS 将溶液稀释 2 倍以降低黏度, 上样至 superdex 200 柱(Pharmacia), 柱预先用 PBS 平衡和洗脱。该尺寸排阻柱的级分可用反相 HPLC 分析。含有二-PEG-多肽的级分先于任何单-PEG-多肽被洗脱, 可收集该级分, 存储在 5°C 或冻干。

[0136] 虽然以上只具体描述了本发明的优选实施方案, 可以理解的是, 本发明可有修改和变化, 而不偏离本发明的精神和预期范围。

图 1

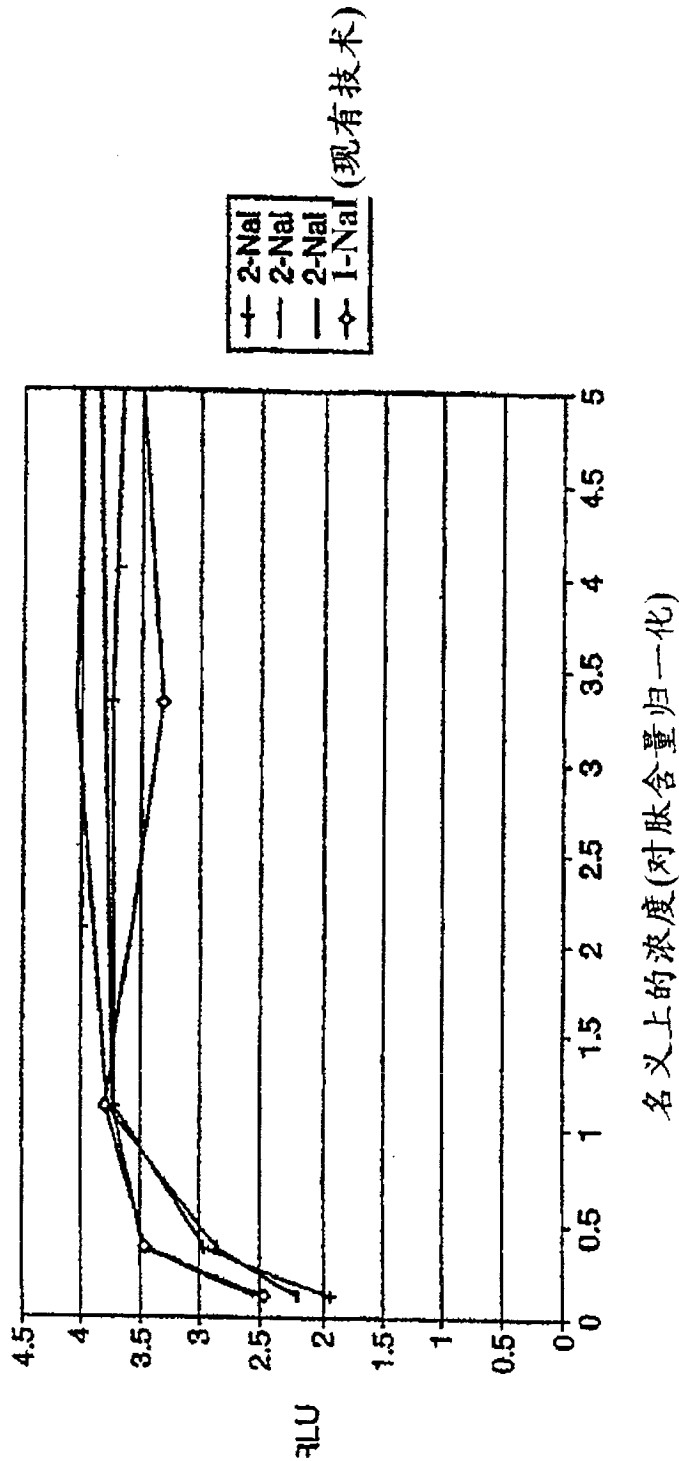


图 2

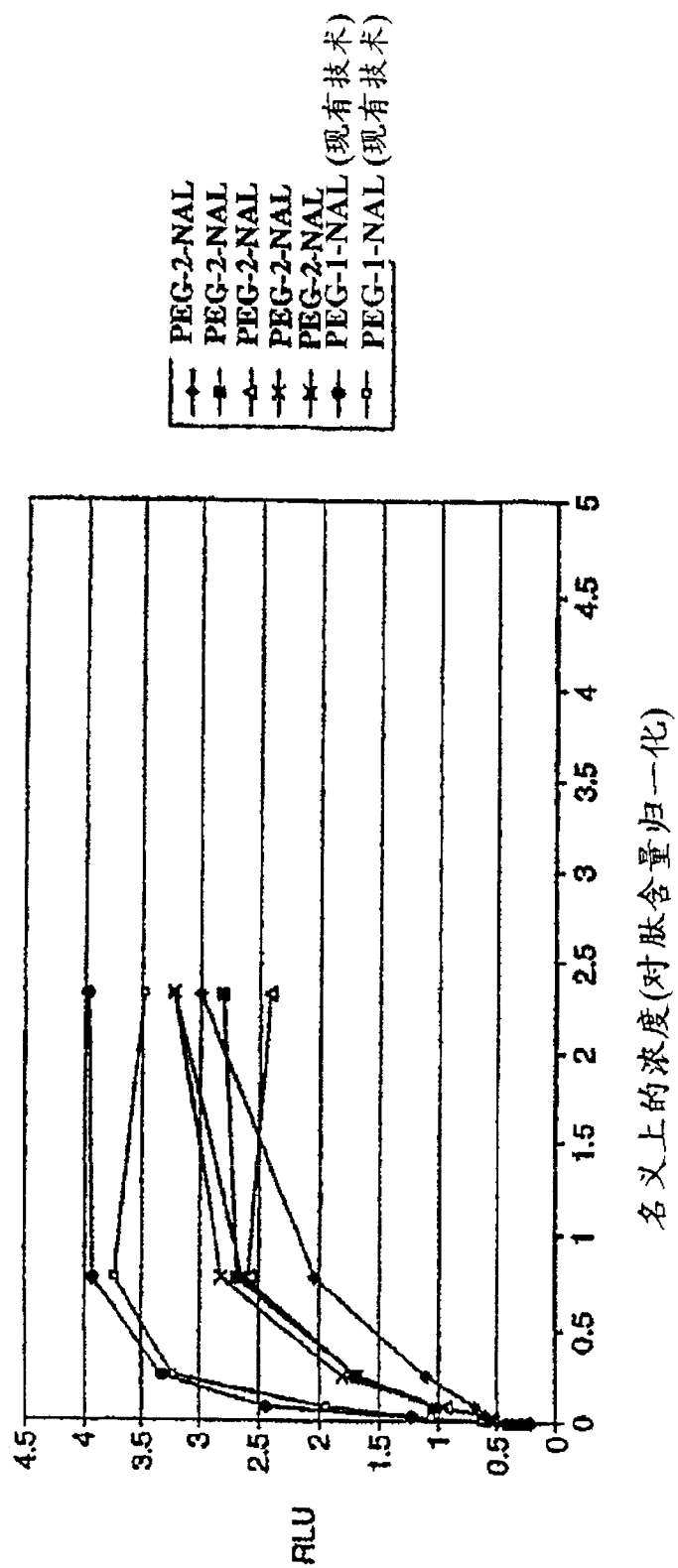
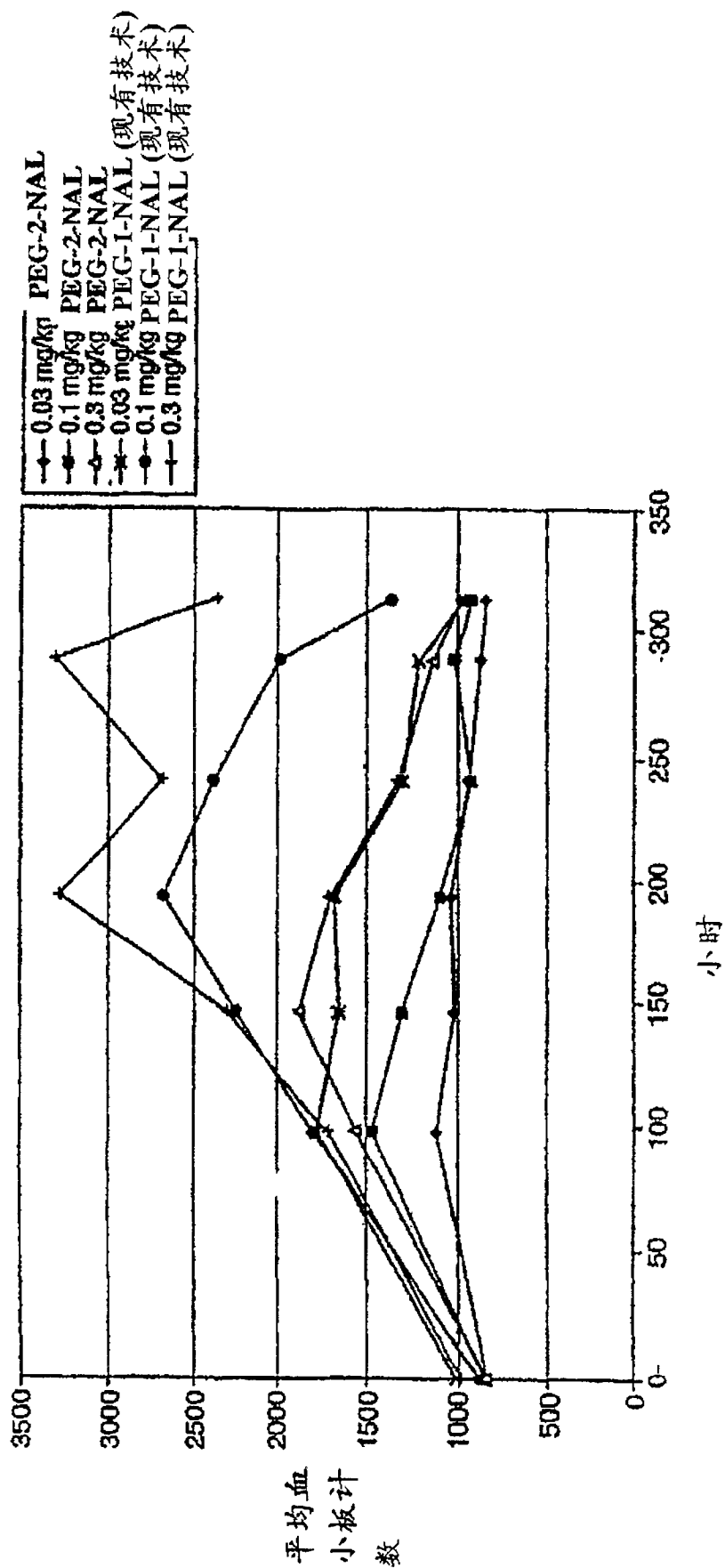


图 3
血小板的总结



治疗对血小板计数的效果

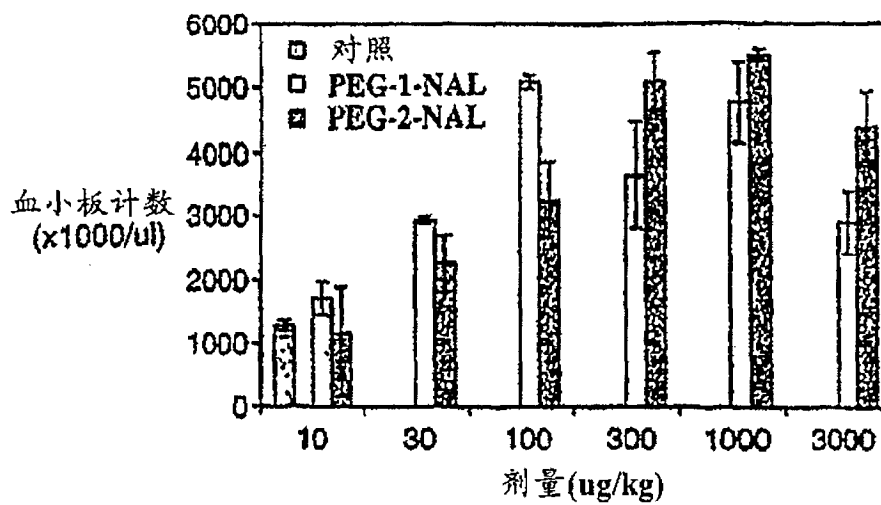


图 4

治疗对平均血小板容积 (MPV) 的效果

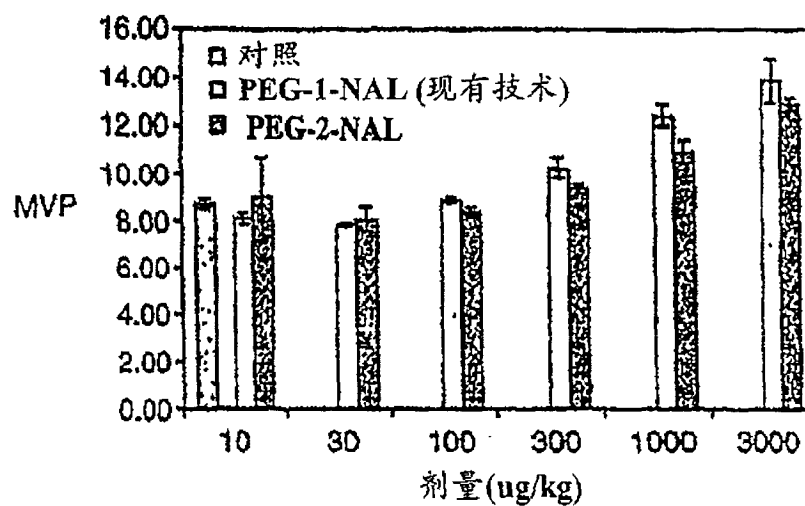


图 5