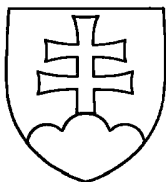


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **22. 10. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/105 348**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **23. 10. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 12. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **12/2001**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US99/24834**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/24770**

(11), (21) Číslo dokumentu:

496-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/19,
C07K 14/52,
C12N 5/10,
C12N 1/21,
A61K 38/19,
A61P 7/06**

(71) Prihlasovateľ: **Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Liu Chuan-Fa, Longmont, CO, US;
Feige Ulrich, Newbury Park, CA, US;
Cheetham Janet, Montecito, CA, US;**

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Dimerná trombopoetínová peptidová mimetika viažuca sa na MP1 receptor a majúca trombopoetickú aktivitu**

(57) Anotácia:
Sú opísané peptidy alebo polypeptidy, ktoré majú trombopoetickú aktivitu. Uvedené peptidy a polypeptidy môžu byť použité na zvýšenie počtu trombocytov a prekursorov trombocytov, napr. megakaryocytov cicavca. Tiež je opísaný vektor, hostiteľská bunka a farmaceutický prostriedok obsahujúci uvedené polypeptidy a spôsob prípravy polypeptidov.

09.08.01

Dimerná trombopoetínová peptídová mimetika viažúca sa na MP1 receptor a majúca trombopoetickú aktivitu

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka zlúčenín, najmä peptídov a polypeptídov, ktoré majú trombopoetickú aktivitu. Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na zvýšenie produkcie trombocytov alebo prekursorov trombocytov (napríklad megakaryocytov) savcov.

Doterajší stav techniky

Predkladaný vynález sa týka zlúčenín, najmä peptídov, ktoré majú schopnosť in vitro a in vivo stimulovať produkciu trombocytov a ich prekursorových buniek, ako sú megakaryocyty. Pred opisom charakteru zlúčenín podľa predkladaného vynálezu sú uvedené znalosti o dvoch proteínoch majúcich trombopoetickú aktivitu: trombopoetínu (TPO) a megakaryocytárneho rastového a diferenciačného faktora (MGDF).

Klonovanie endogénneho trombopoetínu (TPO) (Lok et al., Nature 369:568571 (1994); Bartley et al., Cell 77:1117-1124 (1994); Kuter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11104-11108 (1994); de Sauvage et al., Nature 369:533-538 (1994); Kato et al., Journal of Biochemistry 119:229-236 (1995); Chang et al., Journal of Biological Chemistry 270:511-514 (1995) rýchlo zlepšilo naše znalosti o megakaryopoéze (tvorbe megakaryocytov) a trombopoéze (tvorbe trombocytov).

Endogénny ľudský TPO, 60 až 70 kDa glykosylovaný proteín primárne produkovaný v pečienke a ľadvinách, sa skladá z 332 aminokyselín (Bartley et al., Cell 77:1117-1124 (1994); Chang et al., Journal of Biological Chemistry 270:511-514 (1995)). Proteín je veľmi konzervovaný medzi rôznymi druhmi a má 23% homológiu s ľudským erytropoetínom (Gumey et al., Blood 85:981-988 (1995)) na amino konci (aminokyseliny 1 až 172) (Bartley et al., Cell 77:1117-1124 (1994)). Bolo dokázané, že endogénny TPO má všetky charakteristiky kľúčového biologického regulátora trombopoézy. Medzi jeho účinky in vitro patrí špecifická indukcia megakaryocytových kolónií ako z prečistených myších hematopoetických kmeňových buniek (Zeigler et al., Blood 84:4045-4052 (1994)), tak z ľudských CD34+ buniek (Lok et al., Nature 369:568571 (1994); Rasko et al., Stem Cells 15:33-42 (1997)), tvorba megakaryocytov s vyššou ploídiov (Broudy et al., Blood 85:402-413 (1995)), a indukcia konečného vyzrievania megakaryocytov a produkcia trombocytov (Zeigler et al., Blood 84:4045-4052 (1994); Choi et al., Blood 85:402-413 (1995)). Naopak, syntetické protizmyselné oligodeoxynukleotídy k TPO receptoru (c-Mpl) štatisticky významne inhibujú schopnosť megakaryocytárnych progénitórov tvoriť kolónie (Methia et al., Blood 82:1395-1401 (1993)). Ďalej, myši s vyradením c-Mpl génu majú závažnú trombocytopéniu a deficit megakaryocytov (Alexander et al., Blood 87:21622170 (1996)).

Rekombinantný ľudský MGDF (rHuMGDF, Amgén Inc., Thousand Oaks, CA) je ďalším trombopoetickým peptídom príbuzným s TPO. Je produkovaný v E. coli transformovaných plazmidom obsahujúcim cDNA bodujúci zkrátený proteín zahŕňajúci amino-koncovú doménu pre väzbu na receptor ľudského TPO (Ulich et al., Blood 86:971-976 (1995)). Polypeptíd sa extrahuje, zloží a prečistí a na amino-koniec sa kovalentne naviaže

poly[etylenglykolová] (PEG) skupina. Výsledná molekula sa tu potom označuje PEG-rHuMGDF alebo krátko MGDF.

Rôzne štúdie na zvieracích modeloch (Ulich, T.R. et al., Blood 86:971-976 (1995); Hokom, M.M. et al., Blood 86:4486-4492 (1995)) jasne preukázali terapeutickú účinnosť TPO a MGDF pri transplantácii kostnej drene a pri liečbe trombocytopénie, ktorá je často dôsledkom chemoterapie alebo aktinoterapie. Predbežné dáta na ľuďoch potvrdili použiteľnosť MGDF na zvýšenie počtu trombocytov v rôznych situáciách (Basser et al., Lancet 348: 1279-81 (1996); Kato et al., Journal of Biochemistry 119:229-236 (1995); Ulich et al., Blood 86:971-976 (1995)). MGDF môže byť použitý na zvýšenie výťažku trombocytov pri darcovstve krvi, pretože podanie MGDF zvyšuje počet cirkulujúcich trombocytov zdravých darcov približne 3-krát.

TPO a MGDF pôsobí prostredníctvom väzby na c-Mpl receptor, ktorý je exprimovaný primárne na povrchu niektorých hematopoetických buniek, ako sú megakaryocyty, trombocyty, CD34+ bunky a primitívne progénitorové bunky (Debili, N. et al., Blood 85:391-401 (1995); de Sauvage, F.J. et al, Nature 369:533-538 (1994); Bartley, T .D., et al., Cell 77: 1117-1124 (1994); Lok, S. et al., Nature 369: 565-8 (1994). Ako väčšina receptorov pre interleukiny a proteínové hormóny prislúcha cMpl k triede I superrodiny cytokínových receptorov (Vigon, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5640-5644 (1992)). Aktivácia tejto triedy receptorov zahŕňa homodimerizáciu indukovanú väzbou ligandu, ktorá spúšťa kaskádu prenosu signálu.

Všeobecne, interakcia proteínového ligandu s jeho receptorom prebieha na relatívne veľkom rozhraní. Ako je ale

preukázané v prípade ľudského rastového hormónu naviazaného na svoj receptor, väčšina väzbovej energie je získaná od niekoľkých kľúčových zostatkov (Clackson, T. et al., Science 267:383-386 (1995)). Toto a skutočnosť, že zostatok proteínového ligandu slúži len na dosiahnutie správnej homológie väzbových epitopov umožňuje prípravu aktívnych ligandov s oveľa menšou veľkosťou.

Na uskutočnenie tejto prípravy sa systém fágovej peptídovej zobrazovacej knižnice ukázal ako účinný systém na identifikáciu malých peptídových mimetík väčších proteínových ligandov (Scott, J.K. et al., Science 249:386 (1990); Devlin, J.J. et al., Science 249:404 (1990)). Pomocou tejto techniky boli objavené malé peptídové molekuly, ktoré pôsobia ako agonisti c-MPL receptoru (Cwirla, S.E. et al., Science 276:1696-1699 (1997)).

V takých technikách sú malé peptídové sekvencie zobrazené ako fúzie s obalovými proteínmi filamentosného fágu afinitne eluované proti protilátkou imobilizovanej extracelulárnej domény c-MPL a zachytené fágy sa spracujú v ďalšom kole afinitného prečistenia. Táto väzbová selekcia a proces repropagácie môžu byť opakované veľakrát za získania súboru peptídových sekvencií so silnou väzbou. Takto boli najprv identifikované dve rodiny c-MPL-väzbových peptídov, navzájom nepríbuzných v sekvencii. Potom boli pripravené mutagénne knižnice, ktoré slúžili na ďalšiu optimalizáciu najlepších väzbových činidiel, čo nakoniec viedlo na izoláciu veľmi aktívneho peptidu s $IC_{50} = 2 \text{ nm}$ a $EC_{50} = 400 \text{ nM}$ (Cwirla, S.E. et al., Science 276:1696-1699 (1997)). Tento 14 aminokyselinový peptíd, označený ako TMP (TPO Mimetic Peptide), nemal zrejmu

homológiu sekvencie k TPO alebo MGDF. Vzorec tejto TMP zlúčeniny je:

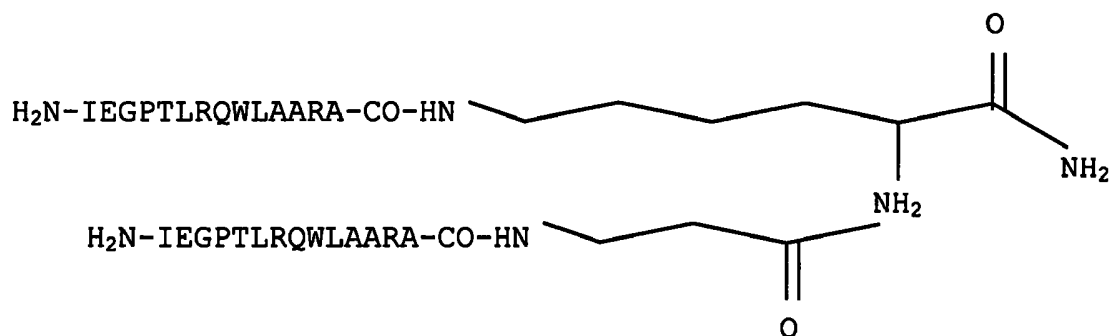
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala SEQ
ID NO: 1; alebo

IEGPTLRQWLAARA

pri použití jednopísmenových aminokyselinových skratiek.

Skôr bol v podobnej štúdii zameranej na EPO mimetické peptídy objavený EPO mimetický peptíd (EMP), ktorý bol objavený za použitia rovnakej techniky (Wrighton, N.C. et al., Science 273:458-463 (1996)) a bolo zistené, že pôsobí ako dimér vo väzbe na EPO receptor (EPOR). Takto vytvorený komplex ligand/receptor má podľa röntgenovej kryštalografie C2 symetriu (Livnah, O. et al., Science 273:464-471 (1996)). Podľa tejto informácie o štruktúre bol navrhnutý =kovalentne viazaný dimér EMP, v ktorom boli C-konce dvoch EMP monomérov zosietené flexibilnou oddeľujúcou skupinou a bolo zistené, že táto zlúčenina má oveľa vyššiu väzbu, rovnako ako biologickú aktivitu in vitro aj in vivo (Wrighton, N.C., et al., Nature Biotechnology 15:1261-1265 (1997)).

Podobná stratégia dimerizácie na C-konci bola použitá na TPO mimetický peptíd (TMP) (Cwirla, S.E. et al., Science 276:1696-1699 (1997)). Bolo zistené, že C-koncovo viazaný dimér (C-C väzba) TMP má lepšiu väzbovú afinitu 0,5 nM a zreteľne vyššiu aktivitu in vitro ($EC_{50} = 0,1$ nM) v testoch proliferácie buniek (Cwirla, S.E. et al., Science 276:1696-1699 (1997)). Štruktúra tohto TMP C-C diméru je uvedená ďalej:



(SEQ ID NO: 2)

V inom aspekte predkladaného vynálezu môžu byť tandémové diméry ďalej naviazané na jednu alebo viac skupín, ktoré sú odvodené od imunoglobulínových proteínov a ktoré sú všeobecne označované ako Fc regióny imunoglobulínov. Výsledné zlúčeniny sú tu označované ako Fc fúzie TMP tandémových dimérov.

Ďalej je uvedená krátka časť týkajúca sa Fc regiónov protilátok, ktoré sú použiteľné v súvislosti so zlúčeninami podľa predkladaného vynálezu.

Protilátky obsahujú dve funkčné nezávislé časti, variabilnú doménu, známu ako "Fab", ktorá viaže antigén, a konštantnú doménu, známu ako "Fc", ktorá umožňuje napojenie na efektorové funkcie, ako je fixácia komplementu alebo fagocytóza. Fc časť imunoglobulínu má dlhý plazmatický polčas, zatiaľ čo Fab má krátky (Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989)).

Terapeutické proteínové produkty boli pripravené s Fc doménou za účelom predĺženia polčasu alebo vloženia funkcií ako je väzba na Fc receptor, väzba na proteín A, fixácia komplementu a placentárny prenos, kde tieto funkcie sú všetky vlastné Fc regiónu imunoglobulínov (Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989)). Napríklad, Fc región IgG1 protilátky bol

fúzovaný na CD30-L, molekulu, ktoré sa viaže na CD30 receptory exprimované na bunkách Hodgkinovho lymfómu, anaplastického lymfómu, T-lymfocytárnej leukémie a iných typoch malignít. Pozri US Patent č. 5480981. IL10, protizápalové a antirejekčné činidlo, bol fúzovaný na myšej Fc γ 2a na predĺženie krátkého polčasu cytokínu v cirkulácii (Zheng, X- et al., The Journal of Immunology, 154: 5590-5600 (1995)). Štúdie tiež hodnotili použitie receptora pre faktor nekrózy nádorov naviazaného na Fc proteín ľudského IgG1 v liečbe pacientov so septickým šokom (Fisher, C. et al., N-Engl. J. Med. 334: 1697-1702 (1996); VanZee, K. et al., The Journal of Immunology 156: 2221-2230 (1996)). Fc bol tiež fúzovaný s CD4 receptorom za zisku terapeutického proteínu na liečbu AIDS. Pozri Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989). Ďalej bol interleukín 2 fúzovaný na Fc časť IgG1 alebo IgG3 na predĺženie krátkeho polčasu interleukínu 2 a na prekonanie jeho systémovej toxicity. Pozri Harvill et al., Immunotechnology 1: 95-105 (1995).

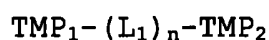
Aj napriek dostupnosti TPO a MGDF preto existuje potreba ďalších zlúčenín, ktoré stimulujú produkciu trombocytov (majú trombopoetickú aktivitu) a/alebo prekursorových buniek trombocytov, najmä megakaryocytov (majú megakaryopoetickú aktivitu). Predkladaný vynález poskytuje nové zlúčeniny majúce tieto aktivity a súvisiace aspekty.

Podstata vynálezu

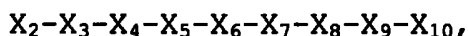
Predkladaný vynález poskytuje skupinu zlúčenín, ktoré sú schopné väzby c-Mpl receptor a spustenie signálu prostriedníctvom c-Mpl receptora, čo je rovnaký receptor, ktorý sprostriedkuje aktivitu endogénneho trombopoetínu (TPO). Preto majú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu

trombopoetickú aktivitu, t.j. schopnosť stimulovať, in vivo a in vitro, produkciu trombocytov, a/alebo megakaryopoetickú aktivitu, t.j. schopnosť stimulovať, in vivo a in vitro, produkciu prekursorov trombocytov.

V prvom výhodnom uskutoční majú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu nasledujúci všeobecný vzorec:



kde TMP_1 a TMP_2 sú každý nezávisle vybraté ze skupiny zlúčenín obsahujúcich základnú štruktúru:



kde

X_2 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Glu, Asp, Lys, a Val;

X_3 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gly a Ala;

X_4 je Pro;

X_5 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Thr a Ser;

X_6 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, Ile, Val, Ala, a Phe;

X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg a Lys;

X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gln, Asn, a Glu;

X_9 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Trp, Tyr, a Phe;

X_{10} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, ale, Val, Ala, Phe, Met, a Lys;

L_1 je spájacia skupina, ako je tu definovaná; a

n je 0 alebo 1;

a patria medzi ne tiež fyziologicky prijateľné soli takých zlúčenín.

V jednom uskutoční je $\text{L}_1 (\text{Gly})_n$, kde n je 1 až 20 a kde keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov

substituovaná inou aminokyselinou vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených aminokyselin alebo ich stereoizomérov.

Okrem základnej štruktúry X_2 - X_{10} uvedenej vyššie pre TMP_1 a TMP_2 sú tiež možné iné základné štruktúry, v ktorých je jedna alebo viac nasledujúcich skupín pridaná k základnej štruktúre TMP_1 a/alebo TMP_2 : X_1 je naviazaný na N-koniec a/alebo sú X_{11} , X_{12} , X_{13} a/alebo X_{14} naviazané na C-koniec, kde X_1 , X_{12} , X_{13} a X_{14} majú nasledujúce významy:

X_1 vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ile, Ala, Val, Leu, Ser, a Arg;

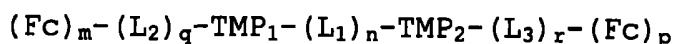
X_{11} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, a Glu;

X_{12} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser a Gln;

X_{13} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, a Gly; a

X_{14} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu a Gly.

V druhom výhodnom uskutoční majú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu nasledujúci všeobecný vzorec:



kde TMP_1 , TMP_2 a n sú rovnaké, ako boli opísané vyššie; L_1 , L_2 a L_3 sú spájacie skupiny, ktoré sú vybraté nezávisle z tu definovaných spájacích skupín; Fc je Fc región imunoglobulínu (ako je definovaný ďalej); m , p , q a r sú každý nezávislo 0 alebo 1, keď aspoň jeden z m alebo p je 1 a ďalej keď - pokiaľ m je 0, tak q je 0, a pokiaľ p je 0, tak r je 0; a zahŕňajú tiež farmaceuticky prijateľné soli takých zlúčenín.

V jednom uskutoční sú L_1 , L_2 a L_3 $(Gly)_n$, kde n je 1 až 20 a kde keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov substituovaná inou aminoskyselinou vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených aminoskyselin alebo ich stereoizomérov.

Deriváty zlúčenín uvedených vyššie (opísané ďalej) spadajú tiež do rozsahu predkladaného vynálezu.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu sú výhodne peptídy a môžu byť pripravené štandardnými spôsobmi syntézy alebo inými spôsobmi na prípravu peptidov. Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu, ktoré obsahujú nepeptídové časti, môžu byť syntetizované štandardnými reakciami organickej chémie, okrem štandardných reakcií peptídovej syntézy, pokiaľ sú použiteľné.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na terapeutické alebo profylaktické účely po príprave s vhodnými farmaceutickými nosičmi a môžu byť podané v účinnej dávke jedincovi, ako je človek (alebo iný savec). Ďalšie súvisiace aspekty sú tiež súčasťou predkladaného vynálezu.

Opis obrázkov na pripojených výkresoch

Veľa ďalších aspektov a výhod predkladaného vynálezu budú jasné po preštudovaní nasledujúceho podrobného opisu, v ktorom sú uvedené odkazy na nasledujúce obrázky, kde:

Obr. 1 znázorňuje príkladné Fc polynukleotídové a proteínové sekvencie (SEQ ID NO: 3 je bodujúci reťazec čítaný 5'→3', SEQ ID NO: 4 je komplementárny reťazec čítaný 3'→5');

a SEQ ID NO: 5 je kódovaná aminokyselinová sekvencia), ktoré môžu byť použité v Fc fúzných zlúčeninách podľa predkladaného vynálezu.

Obr. 2 znázorňuje schému syntézy na prípravu pegylovaného peptidu 19 (SEQ ID NO: 17).

Obr. 3 znázorňuje schému syntézy na prípravu pegylovaného peptidu 20 (SEQ ID NO: 18).

Obr. 4 ukazuje počet trombocytov generovaných in vivo v normálnej samici BDF1 myši ošetrenej jednou 100 µg/kg bolusovou injekciou rôznych zlúčenín: PEG-MGDF označuje PEG s priemernou molekulovou hmotnosťou 20 kDa naviazaný na N-koncovú aminoskupinu redukčnou amináciou na aminokyseliny 1-163 prirodzeného ľudského TPO, ktorý je exprimovaný v E. coli (takže nie je glykosylovaný) (pozri WO 95/26746 nazvaná "Prostriedky a spôsoby na stimuláciu rastu a diferenciácie megakaryocytov"); TMP označuje zlúčeninu SEQ ID NO: 1; TMP-TMP označuje zlúčeninu SEQ ID NO: 21; PEG-TMP-TMP označuje zlúčeninu SEQ ID NO: 18, kde PEG skupinou je PEG s priemernou molekulovou hmotnosťou 5 kDa naviazaný spôsobom podľa obr. 3; TMP-TMP-Fc je definovaný ďalej a Fc-TMP-TMP je rovnaký ako TMP-TMP-Fc s tým rozdielom, že Fc skupina je naviazaná na N-koniec miesto C-konca TMP-TMP peptidu.

Obr. 5 ukazuje počet trombocytov generovaných in vivo v normálnej BDF1 myši liečenej rôznymi zlúčeninami podanými implantovanou ozmotickou pumpou počas 7 dní. Zlúčeniny sú rovnaké, ako na obr. 4.

Obr. 6A, 6B a 6C sú schematické diagramy výhodných zlúčenín podľa predkladaného vynálezu. Obr. 6A ukazuje Fc

fúznu zlúčeninu, v ktorej je Fc skupina fúzovaná na N-koniec TMP diméru a v ktorej je Fc časť v monomérskej (jednoreťazcovej) forme. Obr. 6B ukazuje Fc fúznu zlúčeninu, v ktorej je Fc skupina fúzovaná na N-koniec TMP diméru a v ktorej je Fc časť dimérna a jeden Fc monomér je naviazaný na TMP dimér. Obr. 6C ukazuje Fc fúznu zlúčeninu, v ktorej je Fc skupina fúzovaná na N-koniec TMP diméru a v ktorej je Fc časť dimérna a obidva Fc monoméry sú naviazané na TMP dimér.

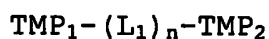
Podrobný opis výhodných uskutočniení

Pri vyhľadávaní malých štruktúr ako vedúcich zlúčenín pri vývoji terapeutických činidiel s výhodnejšími vlastnosťami boli navrhnuté rôzne typy diméru TMP a príbuzných štruktúr, v ktorých bol C-koniec jedného TMP peptidu naviazaný na N-koniec druhého TMP peptidu, buď priamo, alebo prostredníctvom spájacej skupiny, a potom bol skúmaný vplyv tejto dimerizácie na biologickú aktivitu vzniknutých dimérov. V niektorých prípadoch boli navrhnuté takzvané tandemové diméry (C-N väzba) obsahujúce spájacie skupiny medzi dvoma monomérmi, kde tieto spájacie skupiny boli výhodne tvorené prirodzenými aminokyselinami, takže ich syntéza bola možná pomocou rekombinantných techník.

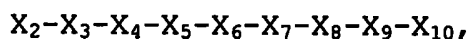
Predkládaný vynález je založený na objave skupiny zlúčenín, ktoré majú trombopoetickú aktivitu a o ktorých sa predpokladá, že sprostredkujú svoju aktivitu prostredníctvom väzby na endogénny TPO receptor, c-Mpl.

Zlúčeniny a deriváty

V prvom výhodnom uskutočnení majú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu nasledujúci všeobecný vzorec:



kde TMP_1 a TMP_2 sú každý nezávislo vybraté zo skupiny zlúčenín obsahujúcich základnú štruktúru:



kde

X_2 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Glu, Asp, Lys, a Val;

X_3 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gly a Ala;

X_4 je Pro;

X_5 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Thr a Ser;

X_6 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, ale, Val, Ala, a

Phe; X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg a Lys;

X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gln, Asn, a Glu;

X_9 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Trp, Tyr, a Phe;

X_{10} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, ale, Val, Ala, Phe, Met, a Lys;

L_1 je spájacia skupina, ako je tu definovaná; a

n je 0 alebo 1;

a patria medzi ne tiež fyziologicky prijateľné soli takých zlúčenín.

V jednom uskutoční je L_1 $(\text{Gly})_n$, kde n je 1 až 20 a kde, keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov substituovaná inou amínokyselinou vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených amínokyselin alebo ich stereoizomérov.

Okrem základnej štruktúry $\text{X}_2 - \text{X}_{10}$ uvedenej vyššie pre TMP_1 a TMP_2 sú tiež možné iné základné štruktúry, v ktorých je jedna alebo viac nasledujúcich skupín pridaná k základnej

štruktúre TMP_1 a/alebo TMP_2 : X_1 je naviazaný na N-koniec a/alebo sú X_{11} , X_{12} , X_{13} a/alebo X_{14} naviazané na C-koniec, kde X_1 , X_{12} , X_{13} a X_{14} majú nasledujúce významy:

X_1 vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ile, Ala, Val, Leu, Ser, a Arg;

X_{11} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, a Glu;

X_{12} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser a Gln;

X_{13} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, a Gly; a

X_{14} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu a Gly.

Termín "TMP" označuje skupinu tvorenú, t.j. obsahujúcu, aspoň 9 podjednotiek (X_2 - X_{10}), kde X_2 - X_{10} tvorí základnú štruktúru. Podjednotky X_2 - X_{14} sú výhodne aminokyseliny nezávislo vybraté z 20 prirodzených aminokyselín; vynález ale tiež zahŕňa zlúčeniny, v ktorých sú X_2 - X_{14} nezávislo vybraté zo skupiny atypických, prirodzene sa nevyskytujúcich aminokyselín dobre známych v odbore. Pre každú pozíciu sú uvedené výhodné aminokyseliny. Napríklad, X_2 môže byť Glu, Asp, Lys alebo Val. Sú použité ako trojpísmenové, tak jednopísmenové skratky aminokyselín; v každom prípade sú skratky štandardnými skratkami používanými pre 20 prirodzených aminokyselín alebo ich dobre známe variácie. Tieto aminokyseliny majú L alebo D stereochemickú konfiguráciu (okrem Gly, ktorý nie je ani L, ani D), a TMP môže obsahovať kombináciu stereochemických konfigurácií. L konfigurácia je ale výhodná pre všetky aminokyseliny v TMP reťazci. Vynález tiež poskytuje reverzné TMP molekuly, v ktorých je amino-koncová až karboxy-koncová sekvencia aminokyselín obrátená. Napríklad, reverzná molekula k

molekule majúcej sekvenciu $X_1-X_2-X_3$ bude mať sekvenciu $X_3-X_2-X_1$. Vynález tiež poskytuje retro-reverzné TMP molekuly, v ktorých je - podobne ako v reverznej TMP molekule - sekvencia aminokyselín obrátená a v ktorej sú ďalej zostatky, ktoré sú normálne L-enantioméry, zmenené na D-stereoizomerické formy.

Vynález tiež zahŕňa fyziologicky prijateľné soli TMP. Termín "fyziologicky prijateľná soľ" označuje soli, o ktorých je alebo bude známe, že sú farmaceuticky prijateľné. Niektorými konkrétnymi príkladmi sú octan, trifluóracetát, hydrochlorid, hydrobromid, síran, citrát, vinan, glykolát, štavelan.

Tiež sa predpokladá, že za vyššie opísané TMP môžu byť substituované deriváty TMP. Také deriváty TMP obsahujú skupiny, v ktorých bola uskutočnená jedna z nasledujúcich modifikácií:

jedna alebo viac peptídylových väzieb $[-C(O)NR-]$ bola nahradená nepeptídylovou väzbou, ako je $-CH_2$ -karbamátová väzba $[-CH_2-OC(O)NR-]$; fosfonátovou väzbou; $-CH_2$ -sulfonamídovou $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ väzbou; močovínovou $[NHC(O)NH-]$ väzbou; $-CH_2$ -sekundárnou amín- väzbou; alebo alkylovanou peptídylovou väzbou $[-C(O)NR^6-]$, kde R^6 je nižší alkyl;

peptídy, v ktorých je N-koniec derivatizovaný na $-NRR^1$ skupinu; na $-NRC(O)R$ skupinu; na $-NRC(O)OR-$ skupinu; na $-NRS(O)_2R$ skupinu; na $-NHC(O)NHR$ skupinu, kde R a R^1 sú vodík alebo nižší alkyl, s podmienkou, že R a R^1 nie sú oba vodík; na sukcinimídovú skupinu; na benzyloxykarbonyl- $NH-(CBZ-NH-)$ skupinu; alebo na benzyloxykarbonyl- NH -skupinu obsahujúcu 1 až 3 substituenty na fenylovom kruhu vybraté ze skupiny zahŕňajúcej nižší alkyl, nižší alkoxy, chlór a bróm; a

peptídy, v ktorých je voľný C-koniec derivatizovaný na $-C(O)R^2$, kde R^2 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej nižší alkoxy a $-NR^3R^4$, kde R^3 a R^4 sú nezávislo vybraté zo skupiny zahŕňajúcej vodík a nižší alkyl. Termín "nižší" označuje skupinu obsahujúcu od 1 do 6 atómov uhlíka.

Ďalej, modifikácie jednotlivých aminokyselín môžu byť vložené do TMP molekuly reakciou cieľových aminokyselinových zostatkov peptídu s organickým derivatizačným činidlom, ktoré môže reagovať s vybratými vedľajšími reťazcami alebo koncovými zostatkami. Príklady sú nasledujúce:

Lysinyly a aminokoncové zostatky môžu reagovať s anhydridom kyseliny jantárovej alebo inej karboxylovej kyseliny. Derivatizácia s týmito činidlami vedie na obrátenie náboja lysinových zostatkov. Ďalšími vhodnými činidlami na derivatizáciu zostatkov obsahujúcich alfa-amino skupinu sú imidoestery, ako je metylpikolinimidát; pyridoxalfosfát; pyridoxal; chlórborohydrid; kyselina trinitrobenzénsulfonová; O-metylizomočovina; 2,4-pentandión; a môže byť uskutočnená reakcia s glyoxalátom katalyzovaná transaminázou.

Arginylové zostatky môžu byť modifikované reakciou s jedným alebo viacerými bežnými činidlami, ako je fenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-cyklohexandion a ninhydrin. Derivatizácia argininových zostatkov vyžaduje, aby bola uskutočnená za alkalických podmienok z dôvodu vysokej pK_a guanidínovej funkčnej skupiny. Ďalej môžu tieto činidlá reagovať so skupinami lysínu, rovnako ako s guanidíno skupinami arginínu.

Špecifické modifikácie tyrosylových zostatkov boli dôkladne študované, najmä s ohľadom na vkladanie spektrálnych

značkovacích činidiel do tyrosylových zostatkov reakciou s aromatickými diazoniovými zlúčeninami alebo tetranitrometanom. Najčastejšie sú N-acetylimidazol a tetranitrometan použité na prípravu O-acetylovaných tyrosylových zostatkov a 3-nitro-derivátov, v príslušnom poradí.

Karboxylové vedľajšie skupiny (aspartylu alebo glutamylu) môžu byť selektívne modifikované reakciou s karbodiimidmi ($R'-N=C=N-R'$), ako je 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinyl)-(4-etyl)karbodiimid alebo 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylfenyl)karbodiimid. Ďalej, aspartylové a glutamylové zostatky môžu byť premenené na asparaginylové a glutaminylové zostatky reakciou s amóniovými iontami.

Glutaminylové a asparaginylové zostatky sú často deaminované na príslušné glutamylové a aspartylové zostatky. Alternatívne môžu byť tieto zostatky deaminované za mierne kyslých podmienok. Všetky formy týchto zostatkov spadajú do rozsahu predkladaného vynálezu.

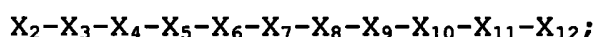
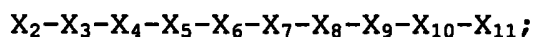
Derivatizácia s bifunkčnými činidlami je použiteľná na zosietenie peptidov alebo ich funkčných derivátov na matrici nerozpustnej vo vode alebo na iných makromolekulových nosičoch. Medzi bežne používané zosieťovacie činidlá patrí napríklad 1,1-bis(diazoacetyl)-2-fenyletan, glutaraldehyd, N-hydroxysukcínimídové estery, napríklad estery s kyselinou 4-azidosalicylovou, homobifunkčné imidoestery, vrátane disukcínimidylových esterov ako je 3,3'-ditiobis(sukcínimidypropionát), a bifunkčné maleimídy, ako je bis-N-maleimido-1,8-oktan. Derivatizačné činidlá ako je metyl-3-[(p-azidofenyl)ditio]propioimidát vedú na získanie fotoaktivovateľných medziproduktov, ktoré môžu vytvárať

zosietenie za prítomnosti svetla. Alternatívne môžu byť na imobilizáciu proteínu použité reaktívne matrice nerozpustné vo vode, ako sú karbohydráty aktivované brómkyanom a reaktívne substráty opísané v U.S. patentoch č. 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 a 4330440.

Ďalšími možnými modifikáciami sú hydroxylácia prolinu a lysinu, fosforylácia hydroxylových skupín serylových a treonylových zostatkov, oxidácia atómu síry v Cys, metylácia alfa-amino skupín vedľajších reťazcov lysinu, argininu a histidinu (Creighton, T.E.: Proteins: Structure and Molecule Properties, W.H. Freeman and Co., San Francisco, str. 79-86 (1983)), acetylácia N-koncového amínu a, v niektorých prípadoch, amidácia C-koncových karboxylových skupín.

Také derivatizované skupiny výhodne zlepšujú jednu alebo viac charakteristík, vrátane trombopoetickej aktivity, rozpustnosti, absorpcie, biologického polčasu a podobne, zlúčenín podľa predkladaného vynálezu. Alternatívne vedú derivatizované skupiny na vznik zlúčenín, ktoré majú rovnaké - alebo v podstate rovnaké - charakteristiky a/alebo vlastnosti ako nederivatizované zlúčeniny. Skupiny môžu alternatívne eliminovať alebo oslabovať akékoľvek nežiadúce účinky zlúčenín a podobne.

Okrem základnej štruktúry X_2-X_{10} uvedenej vyššie sú vhodnými štruktúrami tie, ktoré majú ďalšie X skupiny naviazané na základnú štruktúru. Na základnú štruktúru môže tak byť naviazaný X_1 a/alebo X_{11} , X_{12} , X_{12} a X_{14} . Niektorými príkladmi ďalších štruktúr sú:



$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13};$

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14};$

kde X_1 až X_{14} sú rovnaké, ako boli opísané vyššie. Každý z TMP_1 a TMP_2 môže byť rovnaký alebo rôzny v sekvencii a/alebo dĺžke. V niektorých výhodných uskutočneniach sú TMP_1 a TMP_2 rovnaké.

Najmä výhodný TMP je:

Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala (SEQ ID NO: 1).

Termín "obsahujúci", ako je tu použitý, znamená, okrem iného, že zlúčenina môže obsahovať ďalšie aminokyseliny na N- a/alebo C-konci danej sekvencie. Pretože je ale prítomná štruktúra ako napríklad X_2 až X_{10} , X_1 až X_{14} a podobne, je ostatná chemická štruktúra relatívne menej významná. Je samozrejmé, že akákoľvek vonkajšia štruktúra okrem X_2-X_{10} alebo X_1-X_{14} , by nemala významnejšie interferovať s trombopoetickou aktivitou zlúčeniny. Napríklad, N-koncový Met zostatok spadá do rozsahu predkladaného vynálezu. Ďalej, aj keď je veľa výhodných zlúčení podľa predkladaného vynálezu tandemovými dimérmi, pretože obsahujú dve TMP skupiny, sú iné zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu tandemovými multimermi TMP, t.j. zlúčeninami majúcimi nasledujúce štruktúry:

$TMP_1-L-TMP_2-L-TMP_3;$

$TMP_1-L-TMP_2-L-TMP_3-L-TMP_4;$

$\text{TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-L-TMP}_4\text{-L-TMP}_5$;

kde TMP_1 , TMP_2 , TMP_3 , TMP_4 a TMP_5 môžu byť rovnaké alebo odlišné a kde TMP a L sú rovnaké, ako je tu definované a spájacie skupiny L sú voliteľné. Výhodne obsahujú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu od 2 do 5 TMP skupín, lepšie 2-3 a najlepšie 2. Zlúčeniny podľa prvého uskutočnenia predkladaného vynálezu budú výhodne obsahovať celkom menej ako 60, lepšie menej ako 40 aminokyselín (t.j. bude sa jednať o peptídy).

Ako bolo uvedené vyššie, zlúčeniny podľa prvého uskutočnenia predkladaného vynálezu sú výhodne TMP diméry, ktoré sú naviazané buď priamo alebo prostredníctvom spájacej skupiny. Monoméne TMP skupiny sú uvedené v bežnej orientácii od N k C-koncu a čítajú sa zľava doprava. Tak je vidieť, že všetky zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu sú orientované tak, že C-koniec TMP_1 je naviazaný buď priamo, alebo prostredníctvom spájacej skupiny, na N-koniec TMP_2 . Toto usporiadanie sa označuje ako tandemové usporiadanie a zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť označované ako "tandemové diméry". Tieto zlúčeniny sú označované ako diméry aj vtedy, keď sú TMP_1 a TMP_2 štruktúrálné odlišné. Vynález teda zahŕňa ako homodiméry, tak heterodiméry.

"Spájacia" skupina (" L_1 ") je voliteľná. Pokiaľ je prítomná, tak nie je jej chemická štruktúra zásadná, pretože slúži primárne ako oddeľovacia skupina. Spájacia skupina by mala byť vybratá tak, aby neinterferovala s biologickou aktivitou konečnej zlúčeniny a tiež aby významne nezvyšovala imunogenicitu konečnej zlúčeniny. Spájacia skupina je výhodne tvorená aminokyselinami viazanými navzájom peptídovou väzbou. Vo výhodných uskutočneniach je teda spájacia skupina tvorená

Y_n , kde Y je prirodzená aminokyselina alebo jej stereoizomér a "n" je 1 až 20. Spájacia skupina je tak tvorená 1 až 20 aminokyselinami viazanými peptídovými väzbami, kde tieto aminokyseliny sú vybraté z 20 prirodzených aminokyselín. Vo výhodnom uskutočnení je 1 až 20 aminokyselín vybratých z Gly, Ala, Pro, Asn, Gln, Cys, Lys. Ešte lepšie je spájacia skupina tvorená z väčšiny aminokyselinami bez stérického obmedzenia, ako je Gly, Gly-Gly-[(Gly)₂], Gly-Gly-Gly-[(Gly)₃], Ala, Gly-Ala, Ala-Gly, Ala-Ala, atd. Inými konkrétnymi príkladmi spájacích skupín sú:

(Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 6);

(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEQ ID NO: 7);

(táto zlúčenina poskytuje miesta na glykosyláciu, keď je produkovaná rekombinantne v savčom bunkovom systéme, ktorý môže glykosylovať také miesta);

(Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 8); a

GlyProAsnGly (SEQ ID NO: 9).

Na vysvetlenie vyššie uvedeného názvoslovía napríklad (Gly)₃Lys(Gly)₄ označuje Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly. Výhodné sú tiež kombinácie Gly a Ala.

Je tiež možné použiť nepeptídové spájacie skupiny. Môžu byť použité napríklad alkylové spájacie skupiny, ako je -HN-(CH₂)_s-CO-, kde s = 2-20. Tieto alkylové spájacie skupiny môžu byť ďalej substituované ktoroukoľvek skupinou bez stérického obmedzenia, ako je nižší alkyl (napríklad C₁-C₆), nižší acyl, halogén (napríklad Cl, Br), CN, NH₂, fenyl atď..

Iným typom nepeptídovej spájacej skupiny je polyetylénglykolová skupina, ako je:



kde n je také, že celková molekulová hmotnosť spájacej skupiny je v rozsahu od približne 101 do 5000, lepšie 101 až 500.

Všeobecne bolo zistené, že pre trombopoetické zlúčeniny podľa prvého uskutočnenia predkladaného vynálezu sú výhodné spájacie skupiny tvorené 0-14 podjednotkami (napríklad aminokyselinami).

Peptídové spájacie skupiny môžu byť premenené za vzniku derivátov rovnakým spôsobom ako bolo uvedené vyššie pre TMP.

Zlúčeniny tejto prvej skupiny môžu byť lineárne alebo cyklické. "Cyklické" označuje to, že aspoň dve samostatné, t.j. nekontinuálne, časti molekuly sú viazané jedna na druhú. Napríklad môžu byť amino- a karboxylový koniec molekuly naviazané na seba kovalentnou väzbou za vzniku cyklickej molekuly. Alternatívne môže molekula obsahovať dva alebo viac Cys zostatkov (napríklad v spájacej skupine), ktoré môžu cyklizovať prostredníctvom tvorby disulfidových mostíkov. Ďalej sa predpokladá, že viac ako jeden tandemový peptídový dimér sa môže viazať za vzniku diméru dimérov. Napríklad, tandemový dimér obsahujúci Cys zostatok môže tvoriť disulfidovú väzbu s Cys iného diméru. Pozri, napríklad, zlúčeninu SEQ ID NO: 20 uvedenú ďalej.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť tiež kovalentne alebo nekovalentne asociované s molekulou nosiča, ako je lineárny polymér (napríklad polyetylénglykol, polylysín, dextran atď.), polymér s rozvetveným reťazcom

(pozri napríklad US patent 4289872, Denkenwalter et al., udelený 15.9.1981; 5229490, Tam, udelený 20.1.1993; WO 93/21259, Frechet et al., publikovaný 28.10.1993); lipid; cholesterólová skupina (ako je steroid); alebo karbohydrát alebo oligosacharid. Ďalšími možnými nosičmi sú polyméry rozpustné vo vode, ako je polyoxyetylénglykol alebo propylénglykol, ako sú opísané v US patentoch č. 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 a 4179337. Ešte inými použiteľnými polymermi známymi v odbore sú monometoxy-polyetylénglykol, dextran, celulóza alebo iné polyméry na báze karbohydrátov, poly-(N-vinylpyrrolidon)-polyetylénglykol, homopolyméry propylénglykolu, kopolymér polypropylénoxid/etylénoxid, polyoxyetylované polyoly (napríklad glycerol) a polyvinylalkohol, rovnako ako zmesi týchto polymérov.

Výhodným nosičom je polyetylénglykol (PEG). PEG skupina môže mať akúkoľvek vhodnú molekulovú hmotnosť a môže byť priama alebo rozvetvená. Priemerná molekulová hmotnosť PEG je výhodne v rozmedzí od približne 2 kDa do približne 100 kDa, lepšie od približne 5 kDa do približne 50 kDa, najlepšie od približne 5 kDa do približne 10 kDa.

PEG skupiny sú obvykle naviazané na zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu acyláciou, redukčnou alkyláciou, Michaelovou adíciou, tiólovou alkyláciou alebo inými chemoselektívnymi konjugačnými/ligačnými metódami prostredníctvom reaktívnej skupiny na PEG molekule (napríklad aldehydovej skupine, amíno-skupine, esterovej skupine, tiólu, α -halogénacetyllovej, maleimido- skupine alebo hydrazino-skupine) a reaktívne skupiny na cieľovej zlúčenine (napríklad aldehydovej skupine, amíno-skupine, esterovej skupine,

tiólovej skupine, α -halogénacetylovej, maleimido- skupine alebo hydrazino- skupine).

Karbohydrátové (oligosacharidové) skupiny môžu byť výhodne naviazané na miesta, ktoré sú známe ako glykosylačné miesta proteínov. Všeobecne, O-viazané oligosacharidy sú naviazané na serínové (Ser) alebo treonínové (Thr) zostatky, zatiaľ čo N-viazané oligosacharidy sú naviazané na asparagínové (Asn) zostatky, keď sú súčasťou sekvencie Asn-X-Der/Thr, kde X môže byť akákoľvek aminokyselina s výnimkou prolinu. X je výhodne jedna s 19 prirodzených aminokyselín okrem prolinu. Štruktúry N-viazaných a O-viazaných oligosacharidov a cukrových zostatkov v každom type sú rôzne. Jedným bežným typom sacharidu je kyselina N-acetylneuramínová (tu označovaná ako kyselina sialová). Kyselina sialová je obvykle koncovým zostatkom N-viazaných aj O-viazaných oligosacharidov a môže - vďaka svojmu negatívnemu náboju - spôsobovať kyslé vlastnosti glykosylovanej zlúčeniny. Také miesta môžu byť obsiahnuté v spájacej skupine zlúčenín podľa predkladaného vynálezu a sú výhodne glykosylované bunkami počas rekombinantnej produkcie polypeptídových zlúčenín (napríklad savčími bunkami ako sú CHO, BHK, COS). Takéto miesta ale môžu byť glykosylované tiež počas syntetických alebo semisyntetických postupov známych v odbore.

Niektoré príklady peptídov podľa predkladaného vynálezu sú uvedené ďalej. Sú použité jednopísmenové skratky pre aminokyseliny a spájacie skupiny sú oddelené pomlčkami na jasný opis. Ďalšie skratky: BrAc znamená bromacetyl $\text{BrCH}_2\text{C}(\text{O})$ a PEG znamená polyetylénglykol.

IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 10)

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cyklický)

| _____ | (SEQ ID NO: 11)

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineárny)

(SEQ ID NO: 12)

IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ ID NO: 13)

IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 14)

IEGPTLRQWLAARA-GGGK (BrAc) GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 15)

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 16)

IEGPTLRQWLAARA-GGGK (PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 17)

IEGPTLRQWLAARA-GGGC (PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 18)

IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 19)

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA

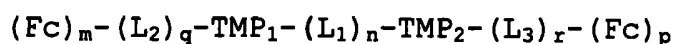
|

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 20)

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 21)

V každej zlúčenine uvedenej vyššie sa tiež predpokladá N-koncový Met (alebo M- v jednopísmenovom kóde). Multiméry (napríklad tandem a netandem, kovalentne viazaný a nekovalentne viazaný) vyššie uvedených zlúčenín sú tiež možné.

V druhom uskutočnení predkladaného vynálezu môžu byť zlúčeniny opísané vyššie ďalej fúzované na jednu alebo viac Fc skupín, buď priamo, alebo prostredníctvom spájacích skupín. Všebečný vzorec pre túto druhú skupinu zlúčenín je:



kde TMP_1 , TMP_2 a n sú rovnaké, ako boli opísané vyššie; L_1 , L_2 a L_3 sú spájacie skupiny, ktoré sú vybraté nezávisle z vyššie

definovaných spájacích skupín; Fc je Fc región imunoglobulínu; m, p, q a r sú každý nezávisle 0 alebo 1, kde aspoň jeden z m alebo p je 1 a ďalej kde pokiaľ m je 0, tak q je 0, a pokiaľ p je 0, tak r je 0; a medzi tieto zlúčeniny patria tiež farmaceuticky prijateľné soli takých zlúčenín.

Zlúčeniny tejto druhej skupiny majú štruktúry definované pre prvú skupinu zlúčenín, ako bola opísaná vyššie, ale tieto zlúčeniny sú ďalej fúzované na aspoň jednu Fc skupinu buď priamo, alebo nepriamo prostredníctvom spájacích skupín.

Fc sekvencia zlúčenín uvedených vyššie môže byť vybratá z ľudského ťažkého reťazca imunoglobulínu IgG1, pozri Ellison, J.W. et al., Nucleic Acids Res. 10: 4071-4079 (1982), alebo akákoľvek iná Fc sekvencia známa v odbore (napríklad iná trieda IgG vrátane napríklad IgG2, IgG3 a IgG4, alebo iných imunoglobulínov).

Je dobre známe, že Fc regióny protilátok sú tvorené monomérnymi polypeptídovými segmentami, ktoré môžu byť viazané do dimérnych alebo multimérnych foriem disulfidovými väzbami alebo nekovalentnými asociáciami. Počet intermolekulových disulfidových väzieb medzi monomérnymi podjednotkami prirodzených Fc molekúl je v rozsahu od 1 do 4 podľa triedy (napríklad IgA, IgG, IgE) alebo podtriedy (napríklad IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2) použitej protilátky. Termín "Fc", ako je tu použitý, označuje monoméne, dimérne a multimérne formy Fc molekúl. Je treba si uvedomiť, že Fc monoméry budú spontánne dimerizovať, keď sú prítomné vhodné Cys zostatky, pokiaľ okolité podmienky nebránia dimerizácii prostredníctvom tvorby disulfidových mostíkov. Aj keď sú Cys zostatky, ktoré normálne vytvárajú disulfidové väzby v Fc diméru, odstránené alebo nahradené inými zostatkami, môžu

monoméne reťazce dimerizovať prostredníctvom nekovalentných interakcií. Termín "Fc", ako je tu použitý, označuje akúkoľvek z týchto foriem: prirodzený monómér, prirodzený dimér (viazaný disulfidovými väzbami), modifikované diméry (disulfidovo a/alebo nekovalentne viazané) a modifikované monoméry (t.j. deriváty).

Varianty, analógy alebo deriváty Fc časti môžu byť pripravené, napríklad, vytvorením rôznych substitúcií zostatkov alebo sekvencií.

Variantné (alebo analogické) polypeptídy zahŕňajú inzerčné varianty, v ktorých jeden alebo viac aminokyselinových zostatkov dopĺňa aminokyselinovú sekvenciu Fc. Inzercie môžu byť lokalizované na jednom alebo na oboch koncoch proteínu, alebo môžu byť umiestnené vo vnútorných regiónoch aminokyselinovej sekvencie Fc. Inzerčné varianty s ďalšími zostatkami na jednom alebo oboch koncoch môžu zahŕňať, napríklad, fúzne proteíny a proteíny obsahujúce aminokyselinové koncovky alebo značkovacie skupiny. Napríklad, Fc molekula môže voliteľne obsahovať N-koncový Met, najmä vtedy, keď je molekula exprimovaná rekombinantne v bakteriálnych bunkách ako je E. coli.

V delečných variantoch Fc je jeden alebo viac aminokyselinových zostatkov vo Fc polypeptíde odstránený. Delécie môžu byť uskutočnené na jednom alebo na oboch koncoch Fc polypeptídu, alebo môžu byť odstránené jeden alebo viac zostatkov v aminokyselinovej sekvencii Fc. Delečné varianty preto zahŕňajú všetky fragmenty sekvencie Fc polypeptídu.

Vo Fc substitučných variantoch je jeden alebo viac aminokyselinových zostatkov Fc polypeptídu odstránený a

nahradený alternatívnym zostatkom. V jednom aspekte sú substitúcie konzervatívne, vynález ale zahŕňa tiež substitúcie, ktoré sú nekonzervatívne.

Napríklad, cysteinové zostatky môžu byť deletované alebo nahradené inými aminokyselinami na zabránenie tvorby niektorých alebo všetkých disulfidových mostíkov vo Fc sekvencii. Konkrétne, aminokyseliny v pozíciách 7 a 10 SEQ ID NO: 5 sú cysteinové zostatky. Je možné odstrániť každý z týchto cysteinových zostatkov alebo substituovať jeden alebo viac takých cysteinových zostatkov inou aminokyselinou, ako je Ala alebo Ser. V inom prípade je možné uskutočniť substitúcie na (1) odstránenie väzbového miesta na Fc receptor; (2) odstránenie väzbového miesta na komplement (C1q); a/alebo na (3) odstránenie miesta na bunkovú cytotoxicitu závislú na protilátkach (ADCC). Také miesta sú známe v odbore a akékoľvek substitúcie známe v odbore je možné použiť na Fc v predkladanom vynáleze. Pozri, napríklad, Molecular Immunology, zväzok 29, č. 5, 633-639 (1992), s ohľadom na ADCC miesta v IgG1.

Podobne môže byť jeden alebo viac tyrosínových zostatkov nahradený fenylalaninovým zostatkom. Do rozsahu predkladaného vynálezu tiež spadajú ďalšie aminokyselinové inzercie, delécie (napríklad v rozsahu 1-25 aminokyselín) a/alebo substitúcie. Všeobecne sú výhodnejšie konzervatívne aminokyselinové substitúcie. Ďalej, alterácie môžu byť vo forme alterovaných aminokyselín, ako sú peptídomimetiká alebo D-aminokyseliny.

Fc sekvencie TMP zlúčenín môžu byť tiež derivatizované, t.j. môžu obsahovať modifikácie iné ako inzercie, delécie alebo substitúcie aminokyselinových zostatkov. Výhodné sú

modifikácie kovalentného charakteru a zahŕňajú napríklad chemické naviazanie polymérov, lipidov a iných organických a anorganických skupín. Deriváty podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené za účelom predĺženia cirkulujúceho polčasu, alebo môžu byť navrhnuté na zlepšenie špecificity polypeptidu pre cieľové bunky, tkanivá alebo orgány.

Je tiež možné použiť väzbovú doménu pre receptor intaktnej Fc molekuly ako Fc časť zlúčenín podľa predkladaného vynálezu, ako je opísané vo WO 96/32478, nazvanej "Altered Polypeptides with Increased Half-Life". Ďalšími členmi triedy molekúl označovanej ako Fc sú tie, ktoré sú opísané vo WO 97/34631, nazvanej "Immunoglobulin-Like Domains with Increased Half-Lives". Obidve publikované PCT prihlášky citované v tomto odstavci sú tu uvedené ako odkazy.

Fúzia s Fc môže byť uskutočnená na N alebo na C konci TMP_1 alebo TMP_2 alebo na oboch koncoch TMP. Prekvapivo bolo zistené, že peptídy, v ktorých je Fc skupina ligovaná na N-koniec TMP skupiny, sú biologicky aktívnejšie ako ostatné, takže sú prednostne tvorené fúzie obsahujúce Fc doménu na N-konci TMP_1 (t.j. r a p sú vo všeobecnom vzorci obidva 0 a m a q sú obidva 1). Keď je Fc reťazec fúzovaný na N-koniec TMP alebo spájacej skupiny, tak sú také fúzie obvykle uskutočnené na C-konci Fc reťazca a naopak.

Výhodné sú tiež zlúčeniny, ktoré sú diméry (napríklad tandemové a netandemové) zlúčenín podľa všeobecného vzorca uvedeného vyššie. V takých prípadoch je každý Fc reťazec naviazaný na tandemový dimér TMP peptídov. Schematický príklad takých zlúčenín je uvedený na obr. 6C. Výhodný príklad takých zlúčenín je uvedený na obr. 6C, kde Fc je dimér zlúčeniny SEQ ID NO: 5, každý L_2 je $(Gly)_5$, TMP_1 a TMP_2

sú každý zlúčenina SEQ ID NO: 1 a každý L₁ je (Gly)₈. Táto zlúčenina je tu tiež označovaná ako "Fc-TMP₁-L-TMP₂". Je tiež reprezentovaná ako dimér (prostredníctvom Fc časti) SEQ ID NO: 34. Analogická zlúčenina, v ktorej je Fc skupina naviazaná prostredníctvom spájacej skupiny na C-koniec TMP₂ skupín na obr. 6C je tiež možná a je tu označovaná ako TMP₁-L-TMP₂-Fc.

Niektoré konkrétne príklady zlúčenín z druhej skupiny sú uvedené ďalej:

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 22)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ ID NO: 23)

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ ID NO: 24)

Fc-GG-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 25)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 26)

Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cyklický)

| _____ | (SEQ ID NO: 27)

Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineárny)

(SEQ ID NO: 28)

Fc-IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ ID NO: 29)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 30)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 31)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 32)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA

|

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 33)

Fc-GGGGG-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA

(SEQ ID NO: 34)

V každej zlúčenine uvedenej vyššie sa tiež predpokladá N-koncový Met (alebo M- v jednopísmenovom kóde). Met zostatok môže byť naviazaný na N-koniec Fc skupiny v tých prípadoch, keď je Fc skupina naviazaná na N-koniec TMP. V tých prípadoch, keď je Fc skupina naviazaná na C-koniec TMP, môže byť Met zostatok naviazaný na N koniec TMP skupiny.

V každom z vyššie uvedených prípadov je Fc výhodne Fc región ťažkého reťazca ľudského imunoglobulínu IgG1 alebo jeho biologicky aktívny fragment, derivát alebo dimér, pozri Ellison, J.W. et al., Nucleic Acids Res. 10: 4071-4079 (1982). Fc sekvencia uvedená v SEQ ID NO: 5 je najvýhodnejším Fc pre zlúčeniny uvedené vyššie. Tiež výhodné sú vyššie uvedené zlúčeniny, v ktorých je Fc dimernou formou sekvencia SEQ ID NO: 5 a Fc reťazec je naviazaný na TMP tandemový dimér.

Ďalej, aj keď veľa výhodných zlúčenín druhého uskutočnenia obsahuje jeden alebo viac tandemových dimérov v tom zmysle, že obsahujú dve naviazané TMP skupiny, obsahujú iné zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu tandemové multimery TMP, t.j. jedná sa o zlúčeniny nasledujúcich príkladných vzorcov:

$$\text{Fc-TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3;$$

$$\text{Fc-TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-L-TMP}_4;$$

$$\text{Fc-TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-L-TMP}_4\text{-L-TMP}_5;$$

$$\text{TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-Fc};$$

$$\text{TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-L-TMP}_4\text{-Fc};$$

$$\text{TMP}_1\text{-L-TMP}_2\text{-L-TMP}_3\text{-L-TMP}_4\text{-L-TMP}_5\text{-Fc};$$

kde TMP_1 , TMP_2 , TMP_3 , TMP_4 a TMP_5 majú rovnaké alebo rôzne štruktúry a kde Fc a každý TMP a L sú rovnaké, ako sú

definované vyššie a spájacie skupiny sú voliteľné. V každom prípade uvedenom vyššie môže byť Fc skupina monoména alebo dimérna a v prípadoch, keď je Fc skupina dimérna, môže byť na každý Fc reťazec naviazaný jeden alebo viac TMP multimérov. Tiež sú možné iné príklady, v ktorých sú TMP diméry alebo multiméry naviazané na N aj C koniec jedného alebo oboch Fc reťazcov, vrátane prípadov, keď sú TMP diméry a multiméry naviazané na všetky štyri konce dvoch Fc reťazcov.

Výhodne majú zlúčeniny tohto druhého uskutočnenia vynálezu celkovú dĺžku približne 200 až 400 aminokyselín (t.j. jedná sa o polypeptídy).

Spôsoby prípravy

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené rôznymi spôsobmi. Pretože veľa týchto zlúčenín sú peptídy, alebo obsahujú peptídy, sú najmä relevantné spôsoby peptídovej syntézy. Napríklad môžu byť použité techniky syntézy na pevnej fáze. Vhodné techniky sú dobre známe v odbore a zahŕňajú tie, ktoré sú opísané v Merrifield, v Chem. Polypeptides, str. 335-61 (Katspyannis and Panayotis, vyd., 1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963); Davis et al., Biochem Intl. 10: 394-414 (1985); Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (1969); US patent č. 3941763; Finn et al., The Proteins, 3. vydanie, zväzok 2, str. 105-253 (1976); a Erickson et al., the Proteins, 3. vydanie, zväzok 2, str. 257-527 (1976). Syntéza na pevnej fáze je výhodnou technikou na prípravu jednotlivých peptídov, pretože je najlacnejšou technikou na prípravu malých peptídov.

Peptídy môžu byť tiež vyrábané transformovanými hostiteľskými bunkami za použitia rekombinantných DNA techník. Pri takej výrobe sa pripraví rekombinantná molekula DNA kódujúca peptíd. Spôsoby na prípravu takých molekúl DNA a/alebo RNA sú dobre známe v odbore. Napríklad, sekvencia kódujúca peptíd môže byť excidovaná z DNA za použitia vhodných restričných enzýmov. Relevantná sekvencia môže byť pripravená polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) s použitím vhodných restričných miest na následné klonovanie. Alternatívne môže byť molekula DNA/RNA syntetizovaná za použitia techník chemickej syntézy, ako je fosforoamiditová technika. Tiež môže byť použitá kombinácia týchto techník.

Vynález tiež zahŕňa vektor kódujúci peptídy vo vhodnom hostiteľovi. Vektor obsahuje molekulu DNA, ktorá kóduje peptídy, operatívne naviazanú na kontrolne sekvencie na expresiu. Spôsoby na uskutočnenie tejto operatívnej väzby, buď po alebo pred inzerciou molekuly DNA kódujúcej peptíd do vektoru, sú dobre známe. Medzi kontrolne sekvencie na expresiu patria promotory, aktivátory, zosilňovače, operátory, väzbové miesta na ribosomy, štartovacie signály, stop signály, signály na naviazanie koncovky, polyadenylačné signály a iné signály zúčastňujúce sa kontroly transkripcie alebo translácie.

Výsledný vektor obsahujúci molekulu DNA kódujúcu peptíd je použitý na transformáciu vhodného hostiteľa. Táto transformácia môže byť uskutočnená za použitia metód dobre známych v odbore.

Akákoľvek z mnohých dostupných a dobre známych hostiteľských buniek môže byť použitá pri uskutočňovaní predkladaného vynálezu. Výber určitého hostiteľa je závislý

na mnohých faktoroch známych v odbore. Medzi tieto faktory patrí, napríklad, kompatibilita s vybraným expresným vektorom, toxicita peptídov kódovaných molekulou DNA pre hostiteľa, rýchlosť transformácie, možnosť ľahkého získania peptídov, charakteristiky expresie, biologická bezpečnosť a náklady. Medzi týmito faktormi musí byť rovnováha a je treba si uvedomiť, že nie všetci hostitelia sú rovnako účinní pri expresii určitej DNA sekvencie.

Pri dodržaní týchto všeobecných pravidiel patria medzi použiteľných mikrobiálnych hostiteľov baktérie (ako je *E. coli*), kvasnice (ako je *Saccharomyces* spp. a *Pichia pastoris*) a iné huby, hmyzie, rastlinné, savčie (vrátane ľudských) bunky v kultúre a iní hostitelia známi v odbore.

Potom sa transformovaný hostiteľ kultivuje za bežných fermentačných podmienok tak, aby boli exprimované požadované peptídy. Také fermentačné podmienky sú dobre známe v odbore.

Nakoniec sa peptídy prečistia z fermentačnej kultúry alebo z hostiteľských buniek, ktoré ich exprimujú. Tieto metódy na prečistenie sú dobre známe v odbore.

Zlúčeniny, ktoré obsahujú derivatizované peptídy, alebo ktoré obsahujú nepeptídové skupiny, môžu byť syntetizované technikami dobre známymi v organickej chémii.

Použitie zlúčenín

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu majú schopnosť viazať sa na a aktivovať c-Mpl receptor, a/alebo majú schopnosť stimulovať produkciu (in vitro a in vivo) trombocytov (majú "trombopoetickú aktivitu") a prekursorov

trombocytov (majú "megakaryocytopoetickú aktivitu"). Na meranie aktivity týchto zlúčenín je možné použiť štandardné testy, ako sú testy opísané vo WO 95/26746 nazvané "Compositions and Methods for Stimulating Megakaryocyte Growth and Differentiation". Testy in vivo sú ďalej opísané v časti "Príklady uskutočnenia vynálezu".

Stavy, ktoré môžu byť liečené spôsobmi a prostriedkami podľa predkladaného vynálezu, sú všeobecne tie stavy, pri ktorých existuje deficit megakaryocytov/trombocytov, alebo stavy, pri ktorých sa predpokladá deficit megakaryocytov/trombocytov v budúcnosti (napríklad na plánovaný chirurgický výkon alebo pri darcovstve trombocytov). Také stavy môžu byť dôsledkom deficitu (dočasného alebo trvalého) aktívneho Mpl ligandu in vivo. Generický termín pre deficit trombocytov je trombocytopénia a tak sú spôsoby a prostriedky podľa predkladaného vynálezu všeobecne vhodné na profylaktickú alebo terapeutickú liečbu trombocytopénie pacientov.

Svetová Zdravotnícka Organizácia klasifikuje stupeň trombocytopénie podľa počtu cirkulujúcich trombocytov jedinca (Miller et al., Cancer 47: 210-211 (1981)). Napríklad, jedinec nevykazujúci žiadne známky trombocytopénie (stupeň 0) bude mať aspoň 100000 trombocytov/mm³. Mierna trombocytopénia (stupeň 1) označuje počet cirkulujúcich trombocytov medzi 79000 a 99000/mm³. Stredne ťažká trombocytopénia (stupeň 2) označuje počet cirkulujúcich trombocytov medzi 50000 a 74000/mm³ a ťažká trombocytopénia označuje počet cirkulujúcich trombocytov medzi 25000 a 49000/mm³. Život ohrozujúca trombocytopénia je

charakterizovaná počtom cirkulujúcich trombocytov menším ako 25000/mm³.

Trombocytopénia (deficit trombocytov) môže byť prítomná z rôznych dôvodov, vrátane chemoterapie a inej terapie rôznymi liekmi, aktinoterapie, chirurgického výkonu, strate krvi pri poranení a špecifických ochorení. Príklady špecifických ochorení, ktoré môžu zahŕňať trombocytopéniu a ktoré môžu byť liečené spôsobom podľa predkladaného vynálezu, sú: aplastická anémia; idiopatická alebo autoimúnna trombocytopénia (ITP), vrátane idiopatickej trombocytopenickej purpury asociovej s karcinomom prsníka; ITP asociovaná s HIV a trombotická trombocytopenicná purpura spojená s HIV; metastatické nádory spôsobujúce trombocytopéniu; systémový lupus erytematodes, vrátane neonatálneho lupusového syndrómu spojeného so splenomegáliou; Fanconiho syndróm; deficit vitamínu B12; deficit kyseliny listovej; May-Hegglinova anomália; Wiskott-Aldrichov syndróm; chronické pečeňové ochorenie; myelodysplastický syndróm spojený s trombocytopéniou; paroxysmálna nočná hemoglobinúria; akútna významná trombocytopénia po terapii C7E3 Fab (Abciximab); alloimúnna trombocytopénia, vrátane maternálnej alloimúnnej trombocytopénii; trombocytopénia asociovaná s antifosfolipidovými protilátkami a trombózou; autoimúnna trombocytopénia; trombocytopénia indukovaná liekmi, vrátane trombocytopénie indukovanej karboplatinou, trombocytopénie indukovanej heparinom; fetálna trombocytopénia; gestačná trombocytopénia; Hughesov syndróm; lupoidná trombocytopénia; strata krvi pri masívnom krvácaní a/alebo krvácanie pri nehode; myeloproliferatívne ochorenie; trombocytopénia pacientov s malignitami; trombotická trombocytopenicná purpura, vrátane trombotickej mikroangiopatie manifestujúca sa ako trombotická

trombocytopenická purpura/hemolyticko-uremický syndróm pacientov s nádorovými ochoreniami; autoimúnna hemolytická anémia; okultná perforácia divertikla v jejunu; čistá aplázia červeného radu; autoimúnna trombocytopénia; nefropatia epidemica; akútne renálne zlyhanie spojené s rifampicínom; Paris-Trousseauova trombocytopénia; neonatálna alloimúnna trombocytopénia; paroxysmálna nočná hemoglobinuria; hematologické zmeny spojené s karcinomom žalúdka; hemolyticko-uremické syndrómy v detstve; hematologické prejavy súvisiace s vírusovými infekciami ako je trombocytopénia spojená s infekciou vírusom hepatitídy A a CMV. Tiež niektoré liečby AIDS vedú na trombocytopéniu (napríklad AZT). Niektoré procesy hojenia rán môžu byť tiež zlepšené v dôsledku vyššieho počtu trombocytov.

Pri predpokladanom deficite trombocytov, napríklad pri plánovanom chirurgickom výkone, môžu byť zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu podané niekoľko dní až niekoľko hodín pred potrebou trombocytov. Pri akutných stavoch, ako sú úrazy a masívne straty krvi, môžu byť zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu podané súčasne s krvou alebo prečistenými doštičkami.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť tiež užitočné na stimuláciu iných typov buniek ako megakaryocytov, pokiaľ tieto bunky exprimujú Mpl receptor. Stavy asociované s takými bunkami exprimujúcimi Mpl receptor, ktoré reagujú na stimuláciu Mpl ligandom, spadajú tiež do rozsahu predkladaného vynálezu.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité v akejkoľvek situácii, v ktorej je žiaduca produkcia trombocytov alebo prekursorových buniek trombocytov, alebo

keď je žiadúca stimulácia c-Mpl receptora. Tak môžu byť zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu použité na liečbu akéhokoľvek stavu savca, pri ktorom existuje potreba trombocytov, megakaryocytov a podobne. Také stavy sú podrobne opísané napríklad vo WO: 95/26746, WO 95/21919, WO 95/18858, WO 95/21920, ktoré sú tu uvedené ako odkazy.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť tiež použité na zachovanie životaschopnosti alebo pri skladovaní trombocytov a/alebo megakaryocytov a príbuzných buniek. Preto môže byť vhodné použiť účinné množstvo jednej alebo viacerých zlúčenín v prostriedkoch obsahujúcich také bunky.

Termín "savec" označuje akéhokoľvek savca, vrátane človeka, domácich zvierat ako sú psi a mačky, exotických zvierat, ako sú opice, laboratórnych zvierat, ako sú myši, potkany a morčatá, poľnohospodárskych zvierat, ako sú kone, kravy, ovce, kozy a prasce, a podobne. Výhodným savcom je človek.

Farmaceutické prostriedky

Predkladaný vynález tiež poskytuje spôsoby na použitie farmaceutických prostriedkov obsahujúcich zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu. Také farmaceutické prostriedky môžu byť určené na injekčné podanie, orálne, nasálne, transdermálne alebo iné podanie, vrátane, napríklad, intravenózneho, intradermálneho, intramuskulárneho, intramamárneho, intraperitoneálneho, intratekálneho, nitroočného, retrobulbárneho, intrapulmonálneho (napríklad aerosolové prostriedky) alebo podkožného injekčného podania (vrátane depotného podania na dlhodobé uvoľňovanie); a ďalej vrátane sublinguálneho, análneho, vaginálneho podania alebo

chirurgickej implantácie, napríklad v splenickej kapsule, do mozgu alebo do rohovky. Liečba môže spočívať v jednej dávke alebo vo viacerých dávkach za určitú dobu. Všeobecne, vynález zahŕňa farmaceutické prostriedky obsahujúce účinné množstvo zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu spoločne s farmaceuticky prijateľným riedidlom, konzervačnými činidlami, solubilizačnými činidlami, emulgačnými činidlami, pomocnými činidlami a/alebo nosičmi. Také prostriedky obsahujú riedidlá s rôznym obsahom pufru (napríklad Tris-HCl, acetát, fosfát), pH a iontovou silou; prísady ako sú detergenčné činidlá a solubilizačné činidlá (napríklad Tween 80, Polysorbat 80); antioxidačné činidlá (ako je kyselina askorbová, metahydrogénsiričitan sodný); konzervačné činidlá (napríklad Thimersol, benzylalkohol); a činidlá upravujúce objem (napríklad laktózu, manitol); tieto materiály sa môžu zapracovať do časticových prípravkov polymérnych zlúčenín, ako je kyselina polymliečna, kyselina polyglykolová atď., alebo do liposomov. Môže sa použiť kyselina hyalurónová a tá môže predĺžiť dobu prítomnosti aktívnej zložky v cirkulácii. Farmaceutické prostriedky môžu voliteľne obsahovať ešte ďalšie farmaceuticky prijateľné kvapalné, semisolidné alebo solidné riedidlo, ktoré slúži ako farmaceutické vehikulum, prísada alebo médium, vrátane napríklad polyoxyetylén-sorbitanmonolaurátu, stearanu horečnatého, metyl- a propylhydroxybenzoátu, škrobov, sacharózy, dextrózy, arabskej gummy, fosforečnanu vápenatého, minerálneho oleja, kakaového masla a kakaový olej. Také zloženie môže ovplyvňovať fyzikálny stav, stabilitu, rýchlosť uvoľňovania in vivo a rýchlosť klírens in vivo proteínov a derivátov podľa predkladaného vynálezu. Pozri napríklad Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydanie (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA18042), str. 1435-1712, ktoré sú tu uvedené ako odkaz. Prostriedky môžu byť v kvapalnej forme alebo vo

forme sušeného prášku, ako je napríklad lyofilizovaná forma. Vynález zahŕňa tiež implantovateľné prostriedky so spomaleným uvoľňovaním, rovnako ako transdermálne prostriedky.

Predpokladá sa použitie orálnych pevných dávkových foriem, ktoré sú všeobecne opísané v napríklad Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydanie (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA18042) v kapitole 89, ktorá je tu uvedená ako odkaz. Medzi pevné dávkové formy patria tablety, kapsule, pilulky, pastilky alebo medicínálne obličky alebo pelety. Na prípravu prostriedkov podľa predkladaného vynálezu môže byť tiež použitá liposomálna alebo proteínoidná enkapsulácia (ako je to napríklad pri proteínoidných mikrosférach opísaných v US patente č. 4925673. Môže byť použitá enkapsulácia v liposómoch a liposómy môžu byť derivatizované rôznymi polymérmi (napríklad U.S. patent č. 5013556). Opis možných dávkových foriem pre terapeutiká je uvedený v Marshall, K., Modern Pharmaceutics, vyd. G.S. Banker and C.T. Rhodes, kapitola 10, 1979, ktorá je tu uvedená ako odkaz. Všeobecne, prostriedok bude obsahovať zlúčeninu podľa predkladaného vynálezu a inertné prísady chrániace zlúčeninu pred žalúdočným prostredím a uvoľňujú biologicky aktívny materiál v tenkom čreve.

Vynález tiež špecificky zahŕňa orálne dávkové formy zlúčenín podľa predkladaného vynálezu. Pokiaľ je to nutné, môžu byť zlúčeniny chemicky modifikované tak, aby bolo podanie účinné. Všeobecne, možnou chemickou modifikáciou je naviazanie aspoň jednej skupiny na molekulu zlúčeniny samotnej, kde uvedená skupina (a) inhibuje proteolýzu; a (b) umožňuje prechod zlúčeniny zo žaúdka alebo čreva do krvného obehu. Žiadúce je tiež zvýšenie celkovej stability zlúčeniny a predĺženie doby cirkulácie v tele. Príklady takých skupín

sú: polyetylénglykol, kopolyméry etylénglykolu a propylénglykolu, karboxymetylcelulóza, dextrán, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon a polyprolín (Abuchowski and Davis; Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, vyd., Wiley-Interscience, New York, NY, (1981), str. 367-383; Newmark et al., J. Appl. Biochem. 4:185-189 (1982)). Ďalšími polymérmi, ktoré môžu byť použité, sú poly-1,3-dioxolan a poly-1,3,6-tioxocan. Na farmaceutické použitie uvedené vyššie sú výhodné polyetylénglykolové skupiny.

Na orálne dávkové formy je tiež možné použiť soli modifikovanej alifatickej aminokyseliny, ako je N-(8-[2-hydroxybenzoyl]amino)kaprylát sodný (SNAC), ako nosič na zlepšenie absorpcie terapeutických zlúčenín podľa predkladaného vynálezu. Klinická účinnosť heparínového prostriedku využívajúceho SNAC bola preukázaná vo fáze II štúdie uskutočnenej Emispher Technologies. Pozri US Patent 5792451 "Oral drug delivery composition and methods".

Terapeutikum môže byť obsiahnuté v prostriedku ako jemné mikročastice vo forme granulí alebo peliet s veľkosťou približne 1 mm. Materiál na prípravu kapsúl môže byť vo forme prášku, mierne lisovaných materiálov alebo aj tabliet. Terapeutikum môže byť pripravené lisovaním.

Môžu byť použité farbivá a chuťové korigens. Napríklad, proteín (alebo derivát) môže byť pripravený (napríklad enkapsulovaný v liposónoch alebo mikrosférach) a potom môže byť vložený do potravinárskeho výrobku, ako sú chladené nápoje obsahujúce farbivá a chuťové korigens.

Je možné nariediť alebo zvýšiť objem terapeutika inertným materiálom. Medzi tieto inertné materiály patria karbohydráty, najmä manitol, α -laktóza, bezvodová laktóza, celulóza, sacharóza, modifikované dextrany a škrob. Niektoré anorganické soli môžu byť tiež použité ako plnivá, vrátane fosforečnanu vápenatého, uhličitanu horečnatého a chloridu sodného. Niektorými komerčne dostupnými riedidlami sú Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress a Avicell.

V pevnej dávkovej forme farmaceutického prostriedku obsahujúceho terapeuticky aktívne činidlo môže byť obsiahnuté činidlo podporujúce rozpadavosť. Činidlom podporujúcim rozpadavosť môže byť napríklad škrob, vrátane komerčne dostupného činidla podporujúceho rozpadavosť na báze škrobu, ktorým je Explotab. Tiež môže byť použitý glykolát, škrob sodný, Amberlite, karboxymetylcelulóza sodná, ultramylopektín, alginat sodný, želatina, pomarančová kôra, kyslá karboxymetylcelulóza, prirodzená morská huba a bentonit. Inou formou činidiel podporujúcich rozpadavosť sú nerozpustné kationtomeničové živice. Práškové arabské gummy môžu byť použité ako činidlá podporujúce rozpadavosť a ako pojivá a medzi tieto práškové arabské gummy patrí agar, Karaya a tragant. Kyselina alginová a jej sodná soľ sú tiež vhodnými činidlami podporujúcimi rozpadavosť.

Pojivá môžu byť použité na súdržnosť terapeutického činidla vo forme kapsule a patria medzi ne materiály z prirodzených produktov, ako je arabská guma, tragant, škrob a želatina. Ďalšími pojivami sú metylcelulóza (MC), etylcelulóza (EC) a karboxymetylcelulóza (CMC). Polyvinylpyrrolidón (PVP) a hydroxypropylmetylcelulóza (HPMC) môžu byť použité v alkoholových roztokoch na granulovanie terapeutického činidla.

Protitrecie činidlá môžu byť použité pri príprave farmaceutických prostriedkov na prevenciu lepenia počas prípravy. Klzné činidlá môžu byť použité ako vrstva medzi terapeutikom a stenou lisovacieho nástroja a medzi také činidlá patrí napríklad kyselina stearová a jej horečnaté a vápenaté soli, polytetrafluóretylén (PTFE), kvapalný parafín, rastlinné oleje a vosky. Môže byť použité rozpustné klzné činidlo, ako je laurylsíran sodný, laurylsíran horečnatý, polyetylénglykoly s rôznou molekulovou hmotnosťou, Carbowax 4000 a Carbowax 6000.

Mazadlo, ktoré môže zlepšiť tekutosť lieku počas prípravy a ktoré môže pomôcť umiestneniu pri lisovaní, môže byť tiež pridané. Medzi také činidlá patrí škrob, mastenec, vulkanický oxid kremičitý a hydratovaný silikoaluminát.

Na zjednodušenie rozpustenia terapeutického činidla vo vodnom prostredí môže byť pridaný surfaktant ako zmáčavé činidlo. Medzi surfaktanty patria aniontové detergenčné činidlá, ako je laurylsíran sodný, dioktylsukcinát sodný a dioktylsulfonát sodný. Môžu byť použité tiež kationtové detergenčné činidlá a medzi ne patrí benzalkoniumchlorid a benzetoniumchlorid. Zoznam potenciálnych neiontových detergentných činidel, ktoré môžu byť použité ako surfaktanty, zahŕňa lauromakrogol 400, polyoxyl 40 stearát, polyoxyetylénový hydrogenovaný ricínový olej 10, 50 a 60, glycerol monostearát, polysorbát 40, 60, 65 a 80, ester sacharózy s mastnými kyselinami, metylcelulóza a karboxymetylcelulóza. Tieto surfaktanty môžu byť prítomné v prostriedku obsahujúcom proteín alebo derivát samostatne alebo v zmesi v rôznych pomeroch.

Aditívami, ktoré zvyšujú vychytávanie zlúčeniny, sú napríklad mastné kyseliny, kyselina olejová, kyselina linoleová a kyselina linolenová.

Môžu byť žiadúce prostriedky s riadeným uvoľňovaním. Aktívna zložka môže byť obsiahnutá v inertnej matrici, ktorá umožňuje uvoľňovanie buď difúziou, alebo odplavovaním, ako je to napríklad pri arabských gumách. Prostriedok môže rovnako obsahovať pomaly sa rozkladajúce matrice, ako sú algináty a polysacharidy. Iná forma riadeného uvoľňovania tohto terapeutika je spôsob na báze Oros terapeutického systému (Alza Corp.), t.j., liek je zatvorený v polopriepustnej membráne, ktorá umožňuje prienik vody a vytlačanie lieku jedným malým otvorom v dôsledku ozmotického efektu. Niektoré enterálne potahy tiež oddiaľujú uvoľňovanie liečiva.

V prostriedku môžu byť použité tiež iné potahy. Medzi tieto potahy patria rôzne sacharidy, ktoré môžu byť nanesené v potahovacej piecke. Terapeutické činidlo môže byť tiež podané vo forme tablety potiahnutej filmom a materiály použité v tomto prípade sa delia do 2 skupín. Prvé sú neenterálne materiály a patrí medzi ne metylcelulóza, etylcelulóza, hydroxyetylcelulóza, metylhydroxy-etylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxypropyl-metylcelulóza, karboxymetylcelulóza sodná, povidon a polyetylénglykoly. Druhou skupinou sú enterálne materiály a patria sem bežné estery kyseliny ftálovej.

Na dosiahnutie optimálneho potahu filmom môže byť použitá zmes materiálov. Potiahnutie filmom môže byť uskutočnené v piecke alebo vo fluidnom lôžku alebo tlakovo.

Tiež je možné uskutočniť pľúcne podanie proteínu (alebo jeho derivátu) podľa predkladaného vynálezu. Proteín (alebo derivát) je podaný do pľúc inhalačne a prechádza cez pľúcny epitel do krvného riečiska (ďalej pozri Adjei et al., Pharmaceutical Research 7: 565-569 (1990); Adjei et al., International Journal of Pharmaceutics 63: 135-144 (1990) (leuprolid acetat); Braquet et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology 13 (suppl. 5): str. 143-146 (1989) (endotelin-1); Hubbard et al., Annals of Internal Medicine 3: 206-212 (1989) (α 1-antitrypsin); Smith et al., J. Clin. Invest. 84: 1145-1146 (1989) (α 1-proteinasa); Pswein et al. "Aerosolization of Proteins", Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, 1990 (rekombinantný ľudský rastový hormón); Debs et al., the Journal of Immunology 140: 3482-3488 (1988) (interferon- γ a faktor nekrózy nádorov α) a Platz et al., US patent č. 5284656 (faktor stimulujúci kolónie granulocytov).

Pri uskutočňovaní predkladaného vynálezu je možné použiť rôzne mechanické prostriedky na pľúcne podanie terapeutík, vrátane nebulizátorov, inhalátorov s merateľnou dávkou a inhalačných prostriedkov na prášky, ktoré sú všetky dobre známe v odbore.

Niektoré príklady komerčne dostupných prostriedkov vhodných na uskutočnenie tohto vynálezu sú Ultravent nebulizátor, vyrábaný Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; Acorn II nebulizátor, vyrábaný Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; Ventolin inhalátor s odmerateľnou dávkou, vyrábaný Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; a Spinhaler práškový inhalátor, vyrábaný Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Všetky také prostriedky vyžadujú použitie prípravkov vhodných na podanie zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu. Obvykle je každý prípravok špecifický na určitý typ prostriedku a môže byť nutné použitie vhodného hnacieho plynu, okrem riedidiel, adjuvans a/alebo nosičov užitočných v terapii.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu budú najlepšie pripravené vo forme častíc s priemernou veľkosťou častíc menšou ako 10 μm (alebo mikrónov), najlepšie 0,5 až 5 μm , na umožnenie čo najúčinnnejšieho podania do dištálnych častí pľúc.

Medzi nosiče patria karbohydráty, ako je trehalóza, mannitol, xylitol, sacharóza, laktóza a sorbitol. Ďalšími prísadami sú DPPC, DOPE, DSPC a DOPC. Môžu byť použité prirodzené alebo syntetické surfaktanty. Môže byť použitý polyetylénglykol (okrem jeho použitia pri derivatizácii proteínu alebo analógu. Môže byť použitý dextrans, ako je cyklodextrán. Môžu byť použité žlčové soli alebo iné príbuzné zosilňovače absorpcie. Môže byť použitá celulóza alebo deriváty celulózy. Môžu byť použité aminokyseliny, napríklad v pufrovacích prostriedkoch.

Vynález tiež zahŕňa použitie liposómov, mikrokapsulí alebo mikrosfér, inkluzných komplexov alebo iných typov nosičov.

Prostriedky vhodné na použitie v nebulizátore, či tryskovom, alebo ultrazvukovom, budú obvykle obsahovať zlúčeninu podľa predkladaného vynálezu rozpustenú vo vode v koncentrácii od približne 0,1 do 25 mg biologicky aktívneho

proteínu na ml roztoku. Prostriedok môže tiež obsahovať pufor a jednoduchý cukor (napríklad na stabilizáciu proteínu a reguláciu ozmotického tlaku). Nebulizačný prostriedok môže tiež obsahovať surfaktant, na redukciu alebo prevenciu agregácie proteínu indukovanej povrchovo aktívnymi silami, ktorá je spôsobená atomizáciou roztoku pri príprave aerosolu.

Prostriedky na použitie v inhalačnom prostriedku s odmerateľnou dávkou budú obvykle obsahovať jemne delený prášok obsahujúci zlúčeninu podľa predkladaného vynálezu suspendovanú v hnacom plyne pomocou surfaktantu. Hnacím plynom môže byť akýkoľvek materiál bežne používaný na tento účel, ako je chlórfluórkarbon, hydrofluórchlórkarbon, hydrofluórkarbon alebo hydrokarbon, vrátane trichlórfluórmetanu, dichlórdifluórmetanu, dichlórtetrafluóretanolu a 1,1,1,2-tetrafluóretanu alebo ich kombinácií. Vhodnými surfaktantmi sú sorbitantrioleát a sójový lecitín. Ako surfaktant môže byť použitá tiež kyselina olejová.

Prostriedky na podanie inhalačným prostriedkom na podanie prášku budú obsahovať jemne delený suchý prášok obsahujúci zlúčeninu podľa predkladaného vynálezu a môžu tiež obsahovať činidlo zvyšujúce objem, ako je laktóza, sorbitol, sacharóza, manitol, trehalóza alebo xylitol, v množstve, ktoré zjednodušuje podanie prášku z prostriedku, kde toto množstvo je napríklad 50 až 90% hmotnosti prostriedku.

Je možné tiež nasálne podanie zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu. Nasálne podanie umožňuje prienik proteínu do krvného riečiska priamo po podaní terapeutického prostriedku do nosa, bez potreby podania prostriedku do pľúc. Prostriedky na nasálne podanie zahŕňajú prostriedky

s dextránom alebo cyklodextránom. Tiež je možné podanie cez iné sliznice.

Dávkovanie

Dávkovanie použité v spôsobe liečby ochorení uvedených vyššie bude určené ošetrojúcim lekárom po zvážení rôznych faktorov, ktoré modifikujú pôsobenie liekov, ako je vek, zdravotný stav, telesná hmotnosť, pohlavie a dietne zvyklosti pacienta, závažnosť akejkoľvek infekcie, doba podania a iné klinické faktory. Všeobecne by dávka mala byť v rozsahu 0,1 μg až 100 mg zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu na kg telesnej hmotnosti a deň, lepšie 0,1 až 1000 $\mu\text{g/kg}$; a najlepšie 0,1 až 150 $\mu\text{g/kg}$, v denných dávkach alebo v ekvivalentných v dlhších alebo kratších intervaloch, napríklad každý druhý deň, dvakrát týždenne, raz týždenne alebo dvakrát alebo trikrát denne.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť podané počiatočnou bolusovou dávkou a potom kontinuálnou infúziou na udržiavanie terapeutických koncentrácií lieku v cirkulácii. Alternatívne môže byť zlúčenina podľa predkladaného vynálezu podaná ako jediná dávka. Odborníci v odbore ľahko optimalizujú účinné dávky a režimy podania podľa štandardnej lekárskej praxe a klinického stavu konkrétneho pacienta. Frekvencia podávania bude závisieť na farmakokinetických parametroch činidel a na spôsobe podania. Optimálny farmaceutický prostriedok bude vybraný odborníkom v odbore podľa spôsobu podania a požadovanej dávky. Pozri, napríklad, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydanie (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA18042), str. 1435-1712, ktoré sú tu uvedené ako odkaz. Také prostriedky môžu ovplyvňovať

fyzikálny stav, stabilitu, rýchlosť uvoľňovania in vivo a rýchlosť klírens in vivo podaného činidla. V závislosti na spôsobe podania môže byť vhodná dávka vypočítaná podľa telesnej hmotnosti, telesného povrchu a veľkosti orgánu. Ďalšie úpravy výpočtov nutných na stanovenie vhodnej dávky na liečbu každým z prostriedkov uvedených vyššie sú rutinné pre odborníkov v odbore bez zbytočného experimentovania, najmä v svetle tu opísaných informácií o dávkach a testoch, rovnako ako farmakokinetických dát z klinických štúdií na ľuďoch opísaných vyššie. Vhodné dávky môžu byť určené známymi testami na stanovenie koncentrácií liečiv v krvi, spoločne s dátami dávka-odpoveď. Konečný dávkový režim bude určený ošetroujúcim lekárom po zvážení rôznych faktorov, ktoré modifikujú pôsobenie liekov, ako je napríklad špecifická aktivita lieku, závažnosť ochorenia a reaktivita pacienta, vek, zdravotný stav, telesná hmotnosť, pohlavie a dietne zvyklosti pacienta, závažnosť akejkoľvek infekcie, doba podania a iné klinické faktory. Pretože sú uskutočňované štúdie, objavujú sa ďalšie informácie týkajúce sa vhodných dávok a trvania liečby pre rôzne ochorenia a stavy.

Terapeutické spôsoby, prostriedky a zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité, samostatne alebo v kombinácii s inými cytokínmi, solubilným Mpl receptorom, hematopoetickými faktormi, interleukínmi, rastovými faktormi alebo protilátkami, v liečbe ochorení charakterizovaných inými príznakmi, rovnako ako deficitom trombocytov. Predpokladá sa, že zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu budú užitočné na liečbu niektorých foriem trombocytopenie v kombinácii so všeobecnými stimulátormi hematopoézy, ako je IL-3 alebo GM-CSF. Spoločne s Mpl ligandom môžu byť použité tiež ďalšie faktory stimulujúce megakaryocyty, ako je napríklad meg-CSF, faktor kmeňových buniek (SCF), leukemický

inhibičný faktor (LIF), onkostatín M (OSM) alebo iné molekuly s megakaryocytárnou stimulačnou aktivitou. Medzi ďalšie príkladné cytokíny alebo hematopoetické faktory na také spoločné podanie patria IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, faktor stimulujúci kolónie 1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, faktor stimulujúci kolónie granulocytov (G-CSF), EPO, interferon α (IFN- α), spoločný interferon, IFN- β , IFN- γ , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, trombopoetín (TPO), angiopoetíny, napríklad Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, ľudský peptíd podobný angiopoetínu, vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF), angiogenín, kostný morfogénny proteín-1, kostný morfogénny proteín-2, kostný morfogénny proteín-3, kostný morfogénny proteín-4, kostný morfogénny proteín-5, kostný morfogénny proteín-6, kostný morfogénny proteín-7, kostný morfogénny proteín-8, kostný morfogénny proteín-9, kostný morfogénny proteín-10, kostný morfogénny proteín-11, kostný morfogénny proteín-12, kostný morfogénny proteín-13, kostný morfogénny proteín-14, kostný morfogénny proteín-15, receptor pre kostný morfogénny proteín IA, receptor pre kostný morfogénny proteín IB, mozgové neurotrofné faktory, receptor α pre ciliárny neurotrofný faktor, cytokínmi indukovaný chemotaktický faktor pre neutrofily 1, cytokínmi indukovaný chemotaktický faktor pre neutrofily 2 α , cytokínmi indukovaný chemotaktický faktor pre neutrofily 2 β , rastový faktor β endotelových buniek, endotelín 1, epidermálny rastový faktor, epitelový atraktant pre neutrofily, fibroblastový rastový faktor 4, fibroblastový rastový faktor 5, fibroblastový rastový faktor 6, fibroblastový rastový faktor 7, fibroblastový rastový faktor 8, fibroblastový rastový faktor 8b, fibroblastový rastový faktor 8c, fibroblastový rastový faktor 9, fibroblastový rastový faktor 10, kyslý fibroblastový rastový faktor,

alkalický fibroblastový rastový faktor, receptor $\alpha 1$ pre neurotrofný rastový faktor odvodený od gliálnej bunečnej línie, receptor $\alpha 2$ pre neurotrofný rastový faktor odvodený od gliálnej bunečnej línie, proteín súvisiaci s rastom, proteín súvisiaci s rastom α , proteín súvisiaci s rastom β , proteín súvisiaci s rastom γ , epidermálny rastový faktor viažúci sa na heparín, hepatocytárny rastový faktor, receptor pre hepatocytárny rastový faktor, inzulínu podobný rastový faktor I, receptor pre inzulínu podobný rastový faktor I, inzulínu podobný rastový faktor II, väzbový proteín pre inzulínu podobný rastový faktor II, keratinocytárny rastový faktor, leukemický inhibičný faktor, receptor α pre leukemický inhibičný faktor, nervový rastový faktor, receptor pre nervový rastový faktor, neurotrofín 3, neurotrofín 4, placentárny rastový faktor, placentárny rastový faktor 2, trombocytárny endotelový rastový faktor, trombocytárny rastový faktor, A reťazec trombocytárneho rastového faktoru, trombocytárny rastový faktor AA, trombocytárny rastový faktor AB, β reťazec trombocytárneho rastového faktoru, trombocytárny rastový faktor BB, receptor α pre trombocytárny rastový faktor, receptor β pre trombocytárny rastový faktor, rastový faktor pre pre-B lymfocyty, receptor pre faktor kmeňových buniek, TNF, vrátane TNF0, TNF1, TNF2, transformujúci rastový faktor α , transformujúci rastový faktor β , transformujúci rastový faktor $\beta 1$, transformujúci rastový faktor $\beta 1.2$, transformujúci rastový faktor $\beta 2$, transformujúci rastový faktor $\beta 3$, transformujúci rastový faktor $\beta 5$, latentný transformujúci rastový faktor $\beta 1$, väzbový proteín I pre transformujúci rastový faktor β , väzbový proteín II pre transformujúci rastový faktor β , väzbový proteín III pre transformujúci rastový faktor β , receptor

typu I pre faktor nekrózy nádorov, receptor typu II pre faktor nekrózy nádorov, receptor pre plazminogénový aktivátor urokinázového typu, cievny endotelový rastový faktor, a chimerické proteíny a ich biologicky alebo imunologicky aktívne fragmenty. Ďalej môže byť vhodné podať, simultánne alebo sekvenčne, účinné množstvo solubilného savčieho Mpl receptora, ktorý, ako sa zdá, spôsobuje fragmentáciu megakaryocytov na trombocyty po dozrení megakaryocytov. Tak sa predpokladá, že podanie zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu (na zvýšenie počtu zreých megakaryocytov) a potom podanie solubilného Mpl receptora (na inaktiváciu ligandu a na produkciu trombocytov zo zreých megakaryocytov) je najmä účinným postupom na stimuláciu produkcie trombocytov. Dávky uvedené vyššie sa upravujú s ohľadom na také ďalšie zložky v terapeutických prostriedkoch. Vývoj stavu liečeného pacienta môže byť sledovaný bežnými spôsobmi.

V prípade, že sú zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu pridané k trombocytárnym a/alebo megakaryocytárnym prípravkom alebo prípravkom príbuzných buniek, tak sa použité množstvo určí experimentálne za použitia techník a testov známych v odbore. Napríklad je možné použiť dávky od 0,1 μg do 1 mg zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu na 10^6 buniek.

Je potrebné si uvedomiť, že použitie spôsobov podľa predkladaného vynálezu pre určitý problém alebo situáciu, je schopný odborník v odbore uskutočniť podľa opisu vynálezu. Príklady prostriedkov podľa predkladaného vynálezu a reprezentatívnych spôsobov na ich izoláciu, použitie a výrobu, sú uvedené ďalej.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Tento príklad opisuje spôsoby na prípravu niektorých zlúčenín prvej skupiny.

A. Materiály a metódy

Všetky aminokyselinové deriváty (všetky v L-konfigurácii) a živice použité pri syntéze peptidov boli kúpené od Novabiochem. Činidlá na peptidovú syntézu (DCC, HOBT., atď.) boli kúpené vo forme roztokov od Applied Biosystems, Inc. Dva PEG deriváty boli od Shearwater Polymers, Inc. Všetky rozpúšťadlá (dichlórmetan, N-metylpyrrolidon, metanol, acetonitril) boli od EM Sciences. Analytická HPLC bola uskutočnená na Beckman systéme s Vydac kolónou (0,46 cm x 25 cm, C18 reverzná fáza, 5 mm) pri prietoku 1 ml/min a pri duálnej UV detekcii pri 220 a 280 nm. Pre všetky HPLC kroky boli použité lineárne gradienty s dvoma mobilnými fázami: pufo A - H₂O (0,1% TFA) a pufo B - acetonitril (0,1% TFA). Použité číslovanie peptidov, napríklad 17b, 18, 19 a 20, sa vzťahuje na tabuľku 1 a niektoré z týchto peptidov sú ďalej ilustrované na obr. 2 a 3.

Syntéza peptidov: Všetky peptidy boli pripravené dobre známou metódou syntézy na pevnej fáze. Syntéza na pevnej fáze s Fmoc činidlami bola uskutočnená za použitia ABI Peptide Synthetiser. Obvykle začala syntéza peptidu s dopredu naplnenou Wangovou živicom v 0,1 mmol mierke. Fmoc odstránenie chrániacich skupín bolo uskutočnené podľa štandardného piperidínového protokolu. Kopulácia bola

uskutočnená za použitia DCC/HOBt. Chrániace skupiny pre vedľajšie reťazce boli: Glu (O-t-Bu), Thr (t-Bu), Arg (PBF), Gln (Trt), Trp (t-Boc) a Cys (Trt). Pre prvý peptidový prekursor na pegyláciu bol na chránenie vedľajšieho reťazca Lys na spájacej skupine použitý Dde a Boc-Ile-OH bol použitý na poslednú kopuláciu. Dde bol odstránený za použitia bezvodového hydrazínu (2% v NMP, 3x2 minúty) a potom sa uskutočnila kopulácia s anhydridom kyseliny brómoctovej pôsobením DCC. Pre peptid 18 bol vedľajší reťazec cysteínu v spájacej skupine chránený tritylovou skupinou. Konečné odstránenie chrániacich skupín a štiepenie všetkých peptidylových živíc bolo uskutočnené pri teplote okolia počas 4 hodín za použitia kyseliny trifluóroctovej (TFA) obsahujúcej 2,5% H₂O, 5% fenol, 2,5% triizopropylsilán a 2,5% tioanisol. Po odstránení TFA sa odštiepený peptid vyzrážal chladným bezvodovým éterom. Tvorba disulfidových väzieb v cyklickom peptide bola uskutočnená priamo na surovom materiáli za použitia 15% DMSO v H₂O (pH 7,5). Všetky surové peptidy boli prečištené preparatívnou HPLC s reverznou fázou a ich štruktúry boli potvrdené ESI-MS a aminokyselinovou analýzou.

Alternatívne môžu byť peptidy opísané vyššie pripravené za použitia t-Boc postupu. V tomto prípade je východnou živicom klasická Merrifieldova alebo Pam živica a chrániacimi skupinami pre vedľajšie reťazce sú: Glu (Obzl), Thr(Bzl), Arg(Tos), Trp (CHO), Cys(p-MeBzl). Fluórovodík (HF) môže byť použitý na konečné štiepenie peptidylových živíc.

Všetky tandemové dimérne peptidy opísané v tomto príklade, ktoré obsahujú spájacie skupiny zložené z prirodzených aminokyselín, môžu byť tiež pripravené rekombinantnou DNA technikou.

PEGylácia. Bola vyvinutá nová, konvergentná stratégia na pegyláciu syntetických peptídov, ktorá zahŕňa kombinovanie - prostredníctvom vytvorenia konjugačnej väzby v roztoku - peptídu a PEG skupiny, ktoré obsahujú každá špeciálnu funkciu, ktorá je reaktívna s funkciou druhej skupiny. Prekursorové peptídy môžu byť ľahko pripravené technikou syntézy na pevnej fáze, ako bola opísaná vyššie. Ako bolo opísané vyššie, tieto peptídy sú "preaktivované" vhodnou funkčnou skupinou na špecifickom mieste. Prekursorové peptídy môžu byť prečistené a plno charakterizované pred reakciou s PEG skupinou. Ligácia peptídu s PEG obvykle prebieha vo vodnej fáze a môže byť ľahko sledovaná analytickou HPLC s reverznou fázou. Pegylované peptídy môžu byť ľahko prečistené preparatívnou HPLC a charakterizované analytickou HPLC, aminokyselinovou analýzou a hmotnostnou spektrometriou s desorpciou laserom.

Príprava peptídu 19. Peptíd 17b (12 mg) a MeO-PEG-SH5000 (30 mg, 2 ekv.) sa rozpustí v 1 ml vodného pufru (pH 8). Zmes sa inkubuje pri teplote okolia počas približne 30 minút a reakcia sa sleduje analytickou HPLC, ktorá ukáže viac ako 80% dokončenie reakcie. Pegylovaný materiál sa izoluje preparatívnou HPLC.

Príprava peptídu 20. Peptíd 18 (14 mg) a MeO-PEG-mleimid (25 mg) sa rozpustí v 1,5 ml vodného pufru (pH 8). Zmes sa inkubuje pri teplote okolia počas približne 30 minút, keď je 70 % transformácie dokončené, ako je sledované analytickou HPLC pomocou aplikácie podielu vzorky do HPLC kolóny. Pegylovaný materiál sa izoluje preparatívnou HPLC.

Test biologickej aktivity

TPO in vitro biotest je mitogénny test využívajúci klon myších 32D buniek závislých na IL-3, ktoré boli transfektované ľudským Mpl receptorom. Tento test je podrobne opísaný vo WO 95/26746. Bunky sa kultivujú v MEM médiu obsahujúcom 10% Fetal Clone II a 1 ng/ml mIL-3. Pred pridaním vzorky sa bunky pripravujú dvojakým prepláchnutím kultivačným médiom bez IL-3. Určí sa predĺžená dvanásťbodová TPO štandardná krivka v rozsahu od 3333 do 39 pg/ml. Pre každú vzorku sa pripravujú štyri riedenia spadajúce do lineárnej časti štandardnej krivky (1000 až 125 pg/ml) a tieto sa spracujú trikrát. 100 µl každého riedenia vzorky alebo štandardu sa pridá do vhodných jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platni obsahujúcej 10000 buniek/jamku. Po 44 hodinách pri 37 °C a 10% CO₂ sa do každej jamky pridá MTS (tetrazoliová zlúčenina, ktorá je biologicky redukovaná bunkami na formazan). Približne o 6 hodín neskôr sa odpočíta optická densita na čítačke platní pri 490 nm. Vytvorí sa krivka dávka-odpoveď (log koncentrácia TPO vs. O.D. pozadie) a uskutoční sa lineárna regresná analýza bodov, ktoré spadajú do lineárnej časti štandardnej krivky. Koncentrácia neznámych testovaných vzoriek sa určí za použitia získanej lineárnej rovnice a za použitia korekcie na nariadenie.

Skratky: HPLC: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia; ESI-MS: hmotnostná spektrometria s ionizáciou postrekom elektrónmi; MALDI-MS: hmotnostná spektrometria s ionizáciou desorpciou laserom na matrici; PEG: polyetylén glykol. Všetky aminokyseliny sú uvedené v štandardnom trojpísmenovom alebo jednopísmenovom kóde. t-Boc: terc-butoxykarbonyl; tBu: terc-butyl; Bzl: benzyl; DCC: dicyklohexylkarbodiimid; HOBt: 1-

hydroxybenztriazol; NMP: N-metyl-2-pyrrolidon; Pbf:
 2,2,4,6,7-pentametyldihydro-benzfuran-5-sulfonyl; Trt:
 trityl; Dde: 1-(4,4-dimetyl-2,6-dioxo-cyklohexyliden)etyl.

B. Výsledky

TMP tandemové diméry s polyglycínovými spájacími skupinami. Vývoj sekvenčne viazaných TMP dimérov bol založený na predpoklade, že dimérne formy TMP sú nutné na účinnú interakciu s c-Mpl (TPO receptor) a na tom, že podľa toho, ako sú navzájom umiestnené vzhľadom na receptor, môžu byť dve MTP molekuly navzájom viazané na C- alebo N-konci tak, že nie je narušená celková dimerná konformácia. Je jasné, že aktivita tandemovo viazaných dimérov závisí tiež na správnom výbere dĺžky a zložení spájacej skupiny spájajúcej C- a -konce dvoch sekvenčne umiestnených TMP monomérov. Pretože nie je dostupná žiadna informácia o štruktúre TMP naviazaného na c-Mpl, bola syntetizovaná séria dimerných peptídov so spájacími skupinami zloženými z 0 až 10 a 14 glycínových zostatkov (Tabuľka 1). Glycín bol vybratý pre svoju jednoduchosť a flexibilitu. Predpokladalo sa, že flexibilný polyglycínový peptídový reťazec umožní voľné skladanie dvoch spojených TMP jednotiek do požadovanej konformácie. Zatiaľ čo viac stericky obmedzené aminokyselinové sekvencie môžu mať nežiadúce sekundárne štruktúry, ktorých rigidita by mohla narušiť správne skladanie dimérneho peptídu vo vzťahu k receptoru.

Výsledné peptídy je možné pripraviť bežnými technikami peptídovej syntézy na pevnej fáze (Merrifield, R.B., Journal of the American Chemical Society 85: 2149 (1963)), za použitia Fmoc alebo t-Boc techniky. Oproti syntéze C-koncovo viazaných paralelných dimérov (SEQ ID NO: 2), ktorá vyžaduje

použitie ortogonálne chráneného lysínového zostatku ako počiatočného miesta vetvenia na prípravu dvoch peptídových reťazcov pseudosymetrickým spôsobom (Cwirla, S.E. et al., Science 276: 1696-1699 (1997)), je syntéza našich tandemových dimérov priame, postupné zostavovanie kontinuálneho peptídového reťazca od C- do N-konca. Pretože má dimerizácia TMP dramatickejší vplyv na proliferáciu aktivitu ako na väzbovú afinitu, ako je preukázané pre C-koncový dimér (Cwirla, S.E. et al., Science 276: 1696-1699 (1997)), boli syntetické peptídy testované priamo na biologickú aktivitu v teste proliferácie TPO dependentných buniek za použitia IL-3 dependentného klonu myších 32D buniek transfektovaných kompletným c-Mpl (Palacios, R. et al., Cell 41: 727 (1985)). ako ukazujú výsledky testu (pozri tabuľku 1, ďalej), vykazovali všetky polyglycínom spojené tandemové diméry > 1000-násobné zvýšenie účinnosti v porovnaní s monomérom a boli v tomto proliferáčnom teste účinnejšie ako C-koncový dimér. Absolutná aktivita C-koncového diméru v našom teste bola nižšia ako aktivita prirodzeného TPO proteínu, čo je odlišné od skorších zistení, v ktorých bol C-koncový dimér rovnako aktívny ako prirodzený ligand (Cwirla, S.E. et al., Science 276: 1696-1699 (1997)). Toto môže byť spôsobené odlišnými podmienkami použitými v obidvoch testoch. Rozdiely v aktivite medzi tandemovými dimérmi (C-koniec prvého monoméru je naviazaný na N-koniec druhého monoméru) a paralelnými dimérmi (C-koniec prvého monoméru je naviazaný na C-koniec druhého monoméru) v rovnakom teste ale jasne dokazujú lepšie vlastnosti tandemovo dimerizovanej zlúčeniny v porovnaní s paralelne dimérizovanou zlúčeninou. Je zaujímavé, že sú možné rôzne dĺžky spájacej skupiny. Optimálna spájacia skupina použitá s vybratými TMP monomérmi (SEQ ID NO: 1) je zložená z 8 glycínov.

Iné tandemové diméry. Po tejto prvej sérii TMP tandemových dimérov bolo navrhnutých niekoľko ďalších molekúl, buď s inými spájacími skupinami, alebo s modifikáciami monoméru. Prvá z týchto molekúl, peptíd 13, má spájaciu skupinu zloženú z GPNG, čo je sekvencia, o ktorej je známe, že ľahko vytvára sekundárnu štruktúru typu β -skrutkovice. Aj keď je ešte stále asi 100-krát účinnejšia ako monomér, je tento peptíd 10-krát menej aktívny ako GGGG-viazaný analóg. Preto sa zdá, že použitie relatívne rigidnej β -skrutkovice ako spájacej skupiny spôsobuje mierne narušenie optimálnej agonistickej konformácie v tejto forme s krátkou spájacou skupinou.

Trp 9 v TMP sekvencii je vysoko konzervovaný zostatok v aktívnych peptídoch izolovaných z knižníc náhodných peptídov. Existuje tiež vysoko konzervovaný Trp v konvenčných sekvenciách EPO mimetických peptídov a bolo zistené, že tento Trp zostatok sa zúčastňuje tvorby hydrofóbného jadra medzi dvoma EPO mimetickými peptídmi (EMP) a prispieva na hydrofóbné interakcie s EPO receptorom (Livnah, O. et al., Science 273: 464-471 (1996)). Analogicky sa predpokladá, že Trp9 zostatok v TMP môže mať podobnú funkciu v dimerizácii peptídového ligandu a v pokuse o modulovanie a hodnotenie vplyvov nekovalentných hydrofóbných síl vo dvoch indólových kruhoch sa konštruovalo niekoľko analógov vzniknutých mutáciou Trp. V peptíde 14 bol Trp zostatok v každom z dvoch TMP monomérov nahradený Cys a oxidáciou bola vytvorená intramolekulová disulfidová väzba medzi dvoma cysteínmi, ktorá mala napodobňovať hydrofóbné interakcie medzi dvoma Trp zosťatkami v dimérizácii peptídu. Peptíd 15 je redukovanou formou peptídu 14. V peptíde 16 boli dva Trp zosťatky nahradené Ala. Ako ukazujú výsledky testov, boli všetky tri analógy inaktívne. Tieto dáta ďalej ukazujú, že Trp je

významný pre aktivitu TPO mimetického peptídu a nie len na tvorbu diméru.

Ďalšie dva peptídy (peptíd 17 a 18) obsahovali obidva vo svojej 8-aminokyselinovej spájacej skupine Lys alebo Cys zostatok. Tieto dve zlúčeniny sú prekurzormi dvoch pegylovaných peptídov (peptídu 19 a 20), v ktorých je vedľajší reťazec Lys alebo Cys modifikovaný polyetylénglykolovou (PEG) skupinou. PEG skupina bola vložená do stredu relatívne dlhej spájacej skupiny, takže bola veľká PEG zložka (5 kDa) dostatočne ďaleko od významných väzbových miest v molekule peptídu. PEG je známy biokompatibilný polymér, ktorý sa stále častejšie používa na kovalentnú modifikáciu za účelom zlepšenia farmakokinetických profilov peptídových a proteínových terapeutických činidiel.

Na bežnú pegyláciu syntetických alebo rekombinantných peptídov bola použitá modulárna metóda v roztoku. Tento spôsob je založený na dobre známej chemoselektívnej ligačnej stratégii, ktorá využíva špecifické reakcie medzi párom navzájom reaktívnych skupín. Tak bol pre pegylovaný peptíd 199 vedľajší reťazec lysínu preaktivovaný brómacetylovou skupinou za vzniku peptídu 17b, ktorý bol pripravený na reakciu s PEG derivatizovaným tiólom. Na chránenie ϵ -amínu lysínu bola použitá ortogonálna chrániaca skupina, Dde. Po zostavení celého peptídového reťazca bol N-koncový amín znovu chránený T-Boc. Dde skupina bola potom odstránená, aby bola umožnená bromacetylácia. Táto stratégia vedie na získanie surového peptídu vysokej kvality, ktorý môže byť ľahko prečistený za použitia bežnej HPLC s reverznou fázou. Ligácia peptídu s PEG modifikovaným tiólom prebieha v vodnom pufre pri pH 8 a reakcia je dokončená počas 30 minút. MALDI-MS analýza prečisteného, pegylovaného materiálu ukázala

charakteristické, zvonovité spektrum s krokmi 44 Da medzi susednými píkmi. Pre PEG-peptíd 20 bol cysteínový zostatok umiestnený do spájacieho regiónu a jeho tiólová skupina vedľajšieho reťazca mohla slúžiť ako miesto naviazania pre PEG obsahujúci maleimíd. Podobné podmienky boli použité na pegyláciu tohto peptídu. Ako ukázali výsledky testu, majú tieto dva pegylované peptídy ešte väčšiu biologickú aktivitu in vitro ako ich nepegylované náprotivky.

Peptíd 21 obsahuje vo svojej 8-amínokyselinovej skupine potenciálny glykosylačný motív, NGS. Pretože sú tieto príkladné tandemové diméry tvorené prirodzenými aminokyselinami viazanými peptídovými väzbami, vedie expresia takej molekuly vo vhodnom eukaryotickom bunčnom systéme na produkciu glykopeptídu s karbohydrátovou skupinou pridanou na karboxamidový vedľajší reťazec Asn. Glykosylácia je bežnou posttranslačnou modifikáciou, ktorá môže mať veľa priaznivých účinkov na biologickú aktivitu daného proteínu, pretože zvyšuje jeho rozpustnosť vo vode a stabilitu in vivo. Ako ukazujú výsledky testov, viedla inkorporácia tohto glykosylačného motívu do spájacej skupiny na zachovanie vysokej biologickej aktivity. Syntetický prekurzor potenciálneho glykopeptídu mal aktivitu porovnateľnú s - (Gly)₈- viazaným analógom. Po glykosylácii sa predpokladá, že bude tento peptíd mať rovnakú aktivitu ako pegylované peptídy, z dôvodu podobných chemicko-fyzikálnych vlastností PEG a karbohydrátovej skupiny.

Posledným peptídom je dimér dimérov. Tento peptíd bol pripravený oxidáciou peptídu 18, ktorá viedla na vznik intermolekulovej disulfidovej väzby medzi dvoma cysteínovými zosťatkami v tejto spájacej skupine. Tento peptíd bol navrhnutý preto, aby bolo zistené, či je TMP aktívny ako

tetramer. Výsledky testu ukázali, že tento peptíd nebol aktívnejší ako priemerný tandemový dimér po úprave na molárnej báze, čo nepriamo podporuje myšlienku, že aktívnou formou TMP je určite dimér, pretože inak by dimerizácia tandemového diméru mala ďalší vplyv na biologickú aktivitu.

Nasledujúca tabuľka 1 zhrňa relatívne aktivity zlúčenín uvedených vyššie z hľadiska EC_{50} v testoch in vitro, ako boli opísané vyššie.

Tabuľka 1

Zlúčenina	Relatívna účinnosť
<u>(EC_{50})</u>	
TPO	4.0
TMP monomér (SEQ ID NO: 1)	1.0
TMP C-C dimér (SEQ ID NO: 2)	3.5
TMP-(Gly) _n -TMP:	
1 n=0	4.5
2 n=1	4.0
3 n=2	4.0
4 n=3	4.0
5 n=4	4.0
6 n=5	4.0
7 n=6	4.0
8 n=7	4.0
9 n=8	4.5
10 n=9	4.0
11 n=10	4.0
12 n=14	4.0

13	TMP-GPNG-TMP (SEQ ID NO.10)	3.0
14	IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA _____ (SEQ ID NO. 11)	0.5
15	IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (SEQ ID NO.12)	0.5
16	IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ ID NO.13)	0.5
17a	TMP-GGGKGGGG-TMP (SEQ ID NO.14)	4.0
17b	TMP-GGGK(BrAc)GGGG-TMP (SEQ ID NO.15)	ND
18	TMP-GGGCGGGG-TMP (SEQ ID NO.16)	4.0
19	TMP-GGGK(PEG)GGGG-TMP (SEQ ID NO.17)	5.0
20	TMP-GGGC(PEG)GGGG-TMP (SEQ ID NO.18)	5.0
21	TMP-GGGNGSGG-TMP (SEQ ID NO.19)	4.0
22	TMP-GGGCGGGG-TMP (SEQ ID NO.20) TMP-GGGCGGGG-TMP	4.0

Poznámka: V tabuľke 1 označujú čísla približne 1 log aktivitu, takže rozdiel medzi aktivitou "1" a "4" je približne 1000-násobný. Zvýšenie o 0,5 je zvýšenie o strednú hodnotu, takže rozdiel medzi aktivitou "1" a "3,5" je približne 500-násobný. "ND" = nie je stanovené.

Príklad 2

Následujúci príklad opisuje spôsoby prípravy niektorých zlúčenín druhej skupiny.

A. Príprava Fc fúzných zlúčenín typu uvedeného na obr. 6C.

DNA sekvencia kódujúca Fc región ľudského IgG1 fúzovaná v čítacom rámci s dimérom TPO mimetického peptidu (SEQ ID NO:


```

AAAGGTGGAGGTGGTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCT
1-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
                      CCAGGCTGAGACGCAGTCACCGACCGACGAGCACGA
   K  G  G  G  G  G  I  E  G  P  T  L  R  Q  W  L  A  A  R  A
GTGGGTGGAGGTGGCGGCGGAGGTATTGAGGGCCCAACCCTTCGCCAATGGCTTGAGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCACCACCTCCACCGCCGCCTCCATTACTCCCGGGTTGGGAAGCGGTTACCGAACGTCGT
   G  G  G  G  G  G  G  I  E  G  P  T  L  R  Q  W  L  A  A
CGCGCA
-----148
GCGCGTATTAGAGCTCCTAGGAAAAAAA

```

R A *

SEQ ID NO: 39 (ko-lineárne oligonukleotídy 1830-52 a 1830-54)
 SEQ ID NO: 40 (ko-lineárne oligonukleotídy 1830-53 a 1830-55)
 a SEQ ID NO: 41 (kódovaná aminokyselinová sekvencia).

Tento duplex bol amplifikovaný PCR reakciou za použitia 1830-52 a 1830-55 ako kódujúcich a protizmyslových primérov.

Fc časť molekuly bola pripravená PCR reakciou s Fc DNA za použitia primérov:

1216-52 AAC ATA AGT ACC TGT AGG ATC G (SEQ ID NO:42)

1830-51 TTCGATACCACCACCTCCACCTTTACCCGGAG-
 ACAGGGAGAGGCTCTTCTGC (SEQ ID NO:43)

Oligonukleotídy 1830-51 a 1830-52 obsahujúce prekrývajúcich sa 24 nukleotídov, čo umožňuje fúzovanie týchto dvoch génov dohromady v správnom čítacom rámci kombinovaním vyššie uvedených PCR produktov v tretej reakcii za použitia vonkajších primérov, 1216-52 a 1830-55.

Génový produkt poslednej PCR (kompletný fúzny gén) sa trávil restriktčnými endonukleázami XbaI a BamHI a potom sa ligoval do vektoru pAMG21 (pozri ďalej), tiež trávenom XbaI a BamHI. Ligovaná DNA sa transformovala do kompetentných hostiteľských buniek E. coli kmeňa 2596 (GM221, pozri ďalej). Klony sa vyšetrovali na schopnosť produkovať rekombinantný proteín a na prítomnosť génovej fúzie majúcej správnu nukleotídovú sekvenciu. Úroveň expresie proteínu bola stanovená z hodnotenia 50 ml skúmaviek. Lyzáty celých buniek boli analyzované na prítomnosť fúzneho proteínu na PAGE géloch farebných Coomasie modrošťou.

Aminokyselinová sekvencia fúzneho proteínu je uvedená pod zodpovedajúcou nukleotídovou sekvenciou.

```

XbaI
|
TCTAGATTGTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGACAAAACACACATGTC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
AGATCTAAACAAAATTGATTAATTTCTCCTTATTGTATACCTGTTTGTAGTGTGTACAG
M D K T H T C P

CACCTTGTCCAGCTCCGGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTGGAACAGGTTCGAGGCCCTTGAGGACCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTTG
P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P

CCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGTTCTCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGAACCTCCAGTGTACGCACCACCACCTGCACT
K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S

GCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTAC
H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A

CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGTTCTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCGTGCATGGCACACCAGTCGCAGGAGT
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T

CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GGCAGGACGTGGTCTGACCGACTTACCGTTCCTCATGTTACGTTCCAGAGGTTGTTTC
V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A

CCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTGGTG
L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q

AGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCCTTGGTCCAGTCGGACTGGA
V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C

```

```

GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCG
  L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P

CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCCTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GCCTCTTGTGTGATGTTCTGGTGCAGGGGACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGA
  E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y

ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
TGTCGTTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCCCTTGAGAAGAGTACGAGGC
  S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V

TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCAT
  M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

AAGGTGGAGGTGGTGGTATCGAAGGTCCGACTCTGCGTCAGTGGCTGGCTGCTCGTGCTG
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TTCCACCTCCACCACCATAGCTTCCAGGCTGAGACGCAGTCACCGACCGACGAGCACGAC
  G G G G G I E G P T L R Q W L A A R A G

GTGGTGGAGGTGGCGGCGGAGGTATTGAGGGCCCAACCTTCGCCAATGGCTTGCAGCAC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CACCACCTCCACCGCGCCTCCATAACTCCCGGTTGGGAAGCGGTTACCGAACGTCTGTG
  G G G G G I E G P T L R Q W L A A R

          BamHI
          |
GCGCATAATCTCGAGGATCCG
841 -----+-----+-----+ 861
CGCGTATTAGAGCTCCTAGGC
  A

```

SEQ ID NO: 44 (jeden reťazec čítaný 5'→3'),

SEQ ID NO: 45 (jeden reťazec čítaný 3'→5'), a

SEQ ID NO: 46 (kódovaná aminokyselinová sekvencia)

pAMG21

Expresný plazmid pAMG21 je dostupný od ATCC pod prírastkovým číslom 98113 a bol uložený 24.7.1996.

GM221 (Amgén hostiteľský kmeň č. 2596)

Amgén hostiteľský kmeň č. 2596 je K-12 kmeň E. coli, ktorý bol modifikovaný tak, aby obsahoval ako lambda represor cI857s7 citlivý na teplotu vo včasnom ebg regióne, tak lacI^Q represor v pozdnom ebg regióne (68 minút). Prítomnosť týchto dvoch represorových génov umožňuje použitie tohto hostiteľa s

mnohými expresnými systémami, ale, obidva tieto represory sú irelevantné pre expresiu z lucP_R. Netransformovaný hostiteľ nemá rezistenciu na antibiotiká.

Väzbové miesto pre ribosomy cI857s7 génu bolo modifikované tak, aby obsahovalo posilnené RBS. Bolo inzertované do ebg operónu medzi nukleotídmi 1170 a 1411, podľa číslovania v GenBank prírastkové číslo M64441Gb_Ba s deléciou vymedzerenej ebg sekvencie.

Konštrukt bol presunutý do chromozómu za použitia rekombinantného fágu nazvaného MMeBg-cI857s7 s vloženým RBS č. 4 do F'tet/393. Po rekombinácii a rozdelení zostávali v bunkách len chromozomálne inzerty. Tieto boli označené F'tet/GM101.

F'tet/GM101 boli potom modifikované vložením lacI^Q konštraktu do ebg operónu medzi nukleotídy 2493 a 2937, podľa číslovania v GenBank prírastkové číslo M64441Gb_Ba s deléciou vymedzerenej ebg sekvencie.

Konštrukt bol presunutý do chromozómu za použitia rekombinantného fágu nazvaného AGebg-LacIQč.5 do F'tet/393. Po rekombinácii a rozdelení zostávali v bunkách len chromozomálne inzerty. Tieto boli označené F'tet/GM221. F'tet epizom bol odstránený z kmeňa pomocou akridínovej oranžovosti v koncentrácii 25 µg/ml v LB. Takto spracovaný kmeň bol citlivý na tetracyklín a bol označený GM221.

Fc fúzny konštrukt obsiahnutý v plazmide pAMG21 (ktorý je tu označený ako pAMG21-Fc-TMP-TMP), ktorý bol potom vložený do hostiteľského kmeňa GM221, bol uložený v ATCC pod prírastkovým číslom 98957, 22.10.1998.

Expresia

Kultúry pAMG21-Fc-TMP-TMP v *E. coli* GM221 v Luria Broth médiu obsahujúcom 50 µg/ml kanamycínu boli inkubované pri 37 °C pred indukciou. Indukcia expresie Fc-TMP-TMP génu z luxPR promotora bola uskutočnená pridaním syntetického autoindukčného činidla N-(3-oxohexanoyl)-DL-homoserínolaktónu do kultivačného média v konečnej koncentrácii 20 ng/ml a kultúra bola inkubovaná pri 37 °C počas 3 hodín. Po troch hodinách sa bakteriálne kultúry znovu vyšetrovali mikroskopicky na prítomnosť inkluzných teliesok a potom sa odstredili. V indukovaných kultúrach boli pozorované refraktívne inkluzné telieska, čo naznačuje, že Fc-TMP-TMP bol najpravdepodobnejšie produkovaný v *E. coli* v nerozpustnej frakcii. Bunečné pelety boli lyzované priamo resuspendovaním v Laemmli vzorkovom pufri obsahujúcom 10% β-merkaptóetanol a boli analyzované SDS-PAGE. Na SDS-PAGE géli bol pozorovaný 30 kD a pásik intenzívne zafarbený Coomassie farbivom. Predpokladaný génový produkt by mal mať dĺžku 269 aminokyselín a molekulovú hmotnosť 29,5 kDa. Tiež bola uskutočnená fermentácia za štandardných podmienok v 10 l, ktorá viedla na podobnú expresiu Fc-TMP-TMP ako pri produkcii v menšom množstve.

Prečistenie Fc-TMP-TMP

Bunky sa rozdrvili vo vode (1/10) homogenizáciou pri vysokom tlaku (2 kolá pri 14000 psi) a inkluzné telieska sa získali odstredením (4200 rpm v J-6B počas 1 hodiny). Inkluzné telieska sa solubilizovali v 6M guanidíne, 50 mM Tris, 8 mM DTT, pH 8,7 počas 1 hodiny pri pomere 1/10.

Solubilizovaná zmes sa nariedila 20-násobne v 2 M močovine, 50 mM Tris, 160 mM arginínu, 3 mM cysteínu, pH 8,5. Zmes sa miesila cez noc v chlade. V tejto dobe Fc-TMP-TMP monoméry dimerizujú za vzniku disulfidovo viazaných zlúčenín majúcich štruktúru uvedenú na obr. 6C a potom sa zahustia približne 10-krát ultrafiltráciou. Potom sa nariedia 3-krát 10 mM Tris, 1,5 M močovinou, pH 9. pH tejto zmesi sa potom upraví na pH 5 kyselinou octovou. Zrazenina sa odstráni odstredením a supernatant sa vnesie do SP-Separózi Fast Flow kolóny uvedenej do rovnováhy v 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, pH 5 (10 mg/ml proteínová náplň, teplota okolia). Proteín sa eluuje za použitia 20 objemov kolóny gradientom 100 mM NaCl až 500 mM NaCl rovnakého pufru. Materiál získaný z kolóny sa nariedi 3-krát a vnesie sa do SP-Separózovej HP kolóny v 20 mM NaAc, 150 mM NaCl, pH 5 (10 mg/ml proteínová náplň, teplota okolia). Proteín sa eluuje za použitia 20 objemov kolóny gradientom 150 mM NaCl až 400 mM NaCl rovnakého pufru. Pík sa odeberie a prefiltruje sa.

Príklad 3

Tento príklad zhŕňa výsledky získané pomocou myši *in vivo* pre rôzne zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu.

Myši: Normálne samice BDF1 staré približne 10-12 týždňov.

Odbery krvi: Desať myši na skupinu bolo liečených v deň 0, dve skupiny začali o 4 dni pozdejšie (celkom 20 myši). V každú uvedenú dobu bol uskutočnený odber krvi 5 myši a odbery boli uskutočňované najmenej trikrát týždenne. Myši boli uvedené do anestézie izofluranom a punkciou orbitálneho sínu sa získalo celkovo 140-160 μ l krvi. Krv sa hodnotila na Technicon H1E analyzátore za použitia softwaru pre myšiu krv.

Meranými parametrami boli leukocyty, erytrocyty, hematokrit, hemoglobín, trombocyty a neutrofily.

Liečba: Myšiam boli podávané podkožné bolusové injekcie alebo im bola implantovaná 7 denná mikroozmotická pumpa na kontinuálne podanie. Ozmotické pumpy boli vložené do kožnej incisie medzi lopatkami anestézovaných myší. Zlúčeniny boli nariadené v PBS s 0,1% BSA. Všetky pokusy zahŕňali jednu kontrolnú skupinu, ktorá bola liečená len nosičom. Koncentrácia testovaných zlúčenín v pumpách bola upravená tak, aby kalibrovaný tok z púmp viedol na dosiahnutie koncentrácií uvedených v grafoch.

Zlúčeniny: Dávka zlúčeniny bola podaná myšiam pomocou 7-dennej mikroozmotickej pumpy. Myši boli liečené rôznymi zlúčeninami v jednej dávke 100 µg/kg v 7-dennej ozmotickej pumpe. Niektoré z týchto zlúčenín boli myšiam podané vo forme jedinej bolusovej injekcie.

Výsledky testu aktivity. Výsledky testov aktivity sú uvedené na obr. 4 a 5. V testoch dávka-odpoveď uskutočnených za použitia 7-denných mikroozmotických púmp (dáta nie sú uvedené) bol maximálny účinok pozorovaný pre zlúčeninu SEQ ID NO: 18 pri 100 µg/kg/deň; dávka 10 µg/kg/deň dosahovala približne 50% maximálnej aktivity a dávka 1 µg/kg/deň bola najnižšia dávka, pri ktorej mohla byť v tomto testovacom systéme pozorovaná aktivita. Dávka 10 µg/kg/deň zlúčeniny bola rovnako aktívna ako dávka 100 µg/kg/deň nepegylovaného rHu-MGDF v rovnakom pokuse.

Diskusia

Je dobre známe, že MGDF pôsobí podobným spôsobom ako ľudský rastový hormón (hGH), t.j. jedna molekula proteínového ligandu sa viaže na dve molekuly receptora, čo spôsobí aktiváciu receptora (Wells, J.A: et al., Ann. Rev. Biochem. 65: 609-634 (1996)). Táto interakcia je napodobňovaná pôsobením oveľa menšieho TMP peptídu. Predkladané štúdie ale naznačujú, že toto napodobnenie vyžaduje koordinované pôsobenie dvoch TMP molekúl, pretože kovalentná dimerizácia TMP buď C-C paralelne, alebo C-N sekvenčne, zvyšuje biologickú účinnosť pôvodného monoméru in vitro viac ako 1000-krát. Relatívne nízka biologická účinnosť monoméru je pravdepodobne spôsobená neúčinnou tvorbou nekovalentného diméru. Výhodný kovalentný dimér môže eliminovať entropickú bariéru na tvorbu nekovalentného diméru, ktorý je tvorený výlučne slabými, nekovalentnými interakciami medzi dvoma molekulami malého peptídu tvoreného 14 zosťatkami.

Je zaujímavé, že väčšina tandemových dimérov je účinnejšia ako C-koncové paralelné diméry. Zdá sa, že tandemová dimerizácia spôsobuje lepšiu konformáciu molekuly ako C-C paralelná dimerizácia. Zdanlivo nesymetrický charakter tandemového diméru môže približovať tento dimér prirodzenému ligandu, ktorý, pretože je asymetrickou molekulou, využíva dve rôzne miesta pre väzbu na dve identické receptorové molekuly. Vloženie PEG molekuly bolo uskutočnené za účelom zvýšenia aktivity modifikovaného peptídu in vivo tým, že bude brániť proteolytickej degradácii a spomalí jeho vylučovanie renálnou filtráciou. Nepredpokladalo sa, že pegylácia ďalej zvýši biologickú aktivitu tandemového dimerizovaného TMP peptídu in vitro v teste bunecnej proliferácie.

Príklad 5

Nasledujúci príklad zhrňa výsledky testov in vivo na opiciach pre rôzne zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu.

Na hodnotenie hematologických parametrov samíc opíc makak rhesus po podkožnom podaní AMP2 bol navrhnutý a uskutočnený nasledujúci protokol. Opice boli rozdelené do piatich skupín po troch. Skupina 1 slúžila ako kontrola a bol jej podaný acetátový pufor (20 mM octan sodný, 0,25 M chlorid sodný, pH 5) neobsahujúci ani AMP2, ani pegylovaný, rekombinantný ľudský MGDF (PEG-rHuMGDF). Skupine 2 bola podaná jedna alebo viac dávok AMP2 v uvedených intervaloch; skupine 3 bolo podané 1000 µg/kg AMP2 v uvedených intervaloch; skupine 4 bolo podané 5000 µg/kg AMP2 v uvedených intervaloch; a skupine 5 bolo podané 100 µg/kg PEG-rHuMGDF v uvedených intervaloch.

Deň, kedy bola podaná prvá dávka, bol označený ako deň 0 cyklu 1. V cykle 2 boli dávky podávané v dňoch 21, 23, 25, 28, 30 a 32. Počas cyklu 3 bola podaná jedna dávka v deň 84 a v cykle 4 bola podaná jedna dávka v deň 123. U zvierat boli pozorované klinické príznaky raz denne počas aklimatizačného obdobia, trikrát denne (pred podaním dávky, 30 minút po podaní dávky a 2 až 3 hodiny po podaní dávky) v dňoch aplikácie dávok a raz denne v dňoch bez podania dávky. Príjem potravy bol počítaný denne podľa počtu podanej potravy a ponechanej potravy pre každé zviera 7 dní pred zahájením liečby a na konci sledovania. Telesná hmotnosť každého zvieraťa bola meraná dvakrát pred liečbou a dvakrát počas liečby a rekonvalescencie. Vzorky na hematologické vyšetrenie boli odebrané raz pred liečbou a potom v dňoch 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 22, 24, 26, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 55, 62, 69, 76, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97,

99, 101, 103, 105, 111, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 150. Na analýzu farmakokinetiky boli 0,5 ml vzorky séra odobrané raz pred podaním dávky a 1, 4 a 24 hodín po podaní dávky. Vzorky boli odoberané v dňoch 0, 21, 32, 84 a 123 a boli uskladnené pri približne -70°C do analýzy. Na analýzu protilátok boli 2 ml vzorky krvi odobrané jeden týždeň pred jednou dávkou a v dňoch 0 (pred podaním dávky), 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83, 90, 97, 104, 111, 118, 129, 136, 143 a 150. Vzorky boli uskladnené pri -70°C do analýzy.

Výsledky ukazujú, že hodnoty trombocytov sa zvýšili vo všetkých liečených skupinách s najvyšším zvýšením v skupine liečenej PEG-rHuMGDF a najvyššou dávkou AMP2. V cykle 1 sa pиковé hodnoty trombocytov zvýšili približne 3,3-násobne a 3,1-násobne v skupine liečenej PEG-rHuMGDF (deň 9) a AMP2 v dávke 5000 $\mu\text{g/kg}$ (deň 9), v príslušnom poradí, v porovnaní s priemerným počtom trombocytov v kontrolnej skupine. Najnižšia dávka AMP2 zvýšila hodnoty trombocytov približne 1,05-násobne v porovnaní s kontrolou v rovnakých dňoch testu. Podobné odpovede neboli zaznamenané v ďalších cykloch.

V cykle 4 ale nevykázala skupina liečená PEG-rHuMGDF také vysoké zvýšenie počtu trombocytov ako v predchádzajúcich cykloch. Skupina liečená PEG-rHuMGDF vykazovala približne 2-násobné zvýšenie počtu trombocytov v porovnaní s kontrolnou skupinou v deň 9 tohto cyklu. Na porovnanie, priemerný počet trombocytov v skupine liečenej najvyššou dávkou AMP2 v cykle 4 bol 3,3-násobne vyšší ako v kontrolnej skupine. Ďalej, zvieratá liečené PEG-rHuMGDF mali priemerný počet trombocytov o 53% nižší ako bol priemerný počet trombocytov v kontrolnej skupine na začiatku 4 cyklu (na dávku) a priemerný počet trombocytov pre túto skupinu na konci cyklu 4 *(27 dní po

podaní dávky) bol o 79% nižší ako v kontrolnej skupine. Pre všetky zvieratá liečené MAP2 bol priemerný počet trombocytov na začiatku a na konci cyklu $4 \pm 15\%$ počtu trombocytov v kontrolnej skupine.

V cykle 1 a 2 bol zaznamenaný trend smerom na zníženie erytrocytov (RBC) vo všetkých liečených skupinách. Pokles bol najvýraznejší v dňoch 41 až 43 a najvyšší pokles RBC bol zaznamenaný v skupine liečenej PEG-rHuMGDF. Počty sa vrátili k normálu (v porovnaní s kontrolou) už v deň 47. Počet leukocytov (WBC) počas cyklov 1 a 2 bol výrazne zvýšený (2,6-násobne) v porovnaní s kontrolou v deň 35. Mierne zvýšenie bolo zaznamenané v skupine liečenej 5000 µg/ml AMP2 v deň 33. Hodnoty sa vrátili k normálnym (kontrolným) hodnotám na začiatku dňa 37. Podobná odpoveď bola pozorovaná v cykle 3 a žiadna zmena v leukocytoch nebola pozorovaná v žiadnej skupine v cykle 4.

Počas cyklu 3 bol počet erytrocytov mierne znížený v deň 13 (po jedinej dávke cyklu 3) vo všetkých liečených skupinách s výnimkou skupiny liečenej 500 µg/kg AMP2. Hodnoty erytrocytov sa vrátili k normálnym (kontrolným) hodnotám na začiatku dňa 17.

Počas cyklu 4 bol počet erytrocytov znížený vo všetkých liečených skupinách s výnimkou skupiny liečenej 500 µg/kg AMP2. Oproti iným cyklom bol v tomto cykle prítomný viac ako jeden nadir. Toto zníženie sa vyskytovalo medzi dňami 1-9 po podaní dávky a upravovalo sa od dňa 11.

Výsledky ukazujú, že zvýšenie počtu trombocytov nad hodnoty pri kontrolných zvieratách, môže byť detekované 7 až

9 dní po podaní dávok pri všetkých liečených zvieratách vo všetkých testovaných cykloch. Zdá sa, že opakovaná aplikácia vedie na vyššiu odpoveď v produkcii trombocytov v porovnaní s jedinými dávkami. V cykle 4 bola trombocytárna odpoveď vyvolaná PEG-rHuMGDF nižšia v porovnaní s predchádzajúcimi cyklami a v porovnaní s odpoveďou na vysokú dávku AMP2. Zníženie počtu erytrocytov bolo pozorované v cykloch 1, 2, 3 a 4 vo všetkých liečených skupinách počas každého cyklu štúdie, ale všetky hematologické parametre sa vrátili na normálne hodnoty (kontrólne) po ukončení dávkovania.

Dohromady tieto výsledky ukazujú, že liečba AMP2 je dobre tolerovaná pri opiciach makak rhesus a že liečba AMP2 vedie na zvýšenie počtu trombocytov po rôznych cykloch liečby. Nezdá sa, podľa výsledných počtov trombocytov, že by existovala významná imunitná odpoveď na AMP2. Naopak, liečba v rôznych cykloch PEG-rHuMGDF ukázala inhibíciu trombocytárnej odpovede v cykle 4, čo naznačuje, že boli vytvorené protilátky k PEG-rHuMGDF a že tieto protilátky môžu byť skrížene reaktívne s endogénnym TPO makaka rhesus.

Je nutné si uvedomiť, že existujú rôzne zmeny a modifikácie predkladaného vynálezu, ktoré spadajú do rozsahu vynálezu.

Zoznam sekvencií

<110> Liu, Chuan-Fa
Feige, Ulrich
Cheetam, Janet C.

<120> Trombopoetické zlúčeniny

<130> 01017/36263

<140>

<141>

<150> 60/105348

<151> 1998-10-23

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis artificioálnej sekvencie: peptíd

<400> 1

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

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificioálna sekvencia

<220>

<223> Opis artificioálnej sekvencie: peptíd

<220>

<223> Peptíd je podjednotka homodiméru: Podjednotky v homodimére sú kovalentne viazané na každom karboxylovom konci peptídovou väzbou s $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH (CONH}_2\text{)-NH-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$

<400> 2

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

<210> 3

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificioálna sekvencia

<220>

<223> Opis artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 3

```

atggacaaaa ctcacacatg tccaccttgt ccagctccgg aactcctggg gggaccgtca 60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccctgaggtc 120
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 180
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcaog 240
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 300
aagtgaagg tctccaaca agccctccca gcccctatcg agaaaacat ctccaaagcc 360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 540
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 660
agcctctccc tgtctccggg taaa                                     684

```

<210> 4

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 4

```

tacctgtttt gagtgtgtac aggtggaaca ggtcgaggcc ttgaggaccc ccctggcagt 60
cagaaggaga aggggggttt tgggttcctg tgggagtact agagggcctg gggactccag 120
tgtacgcacc accacctgca ctcggtgctt ctgggactcc agttcaagtt gaccatgcac 180
ctgccgcacc tccacgtatt acggttctgt ttcggcgccc tcctcgatcat gttgtcgtgc 240
atggcacacc agtcgcagga gtggcaggac gtggtcctga ccgacttacc gttcctcatg 300
ttcacgttcc agaggttggt tcgggagggg cgggggtagc tcttttggtg gaggtttcgg 360
tttcccgtcg gggctcttgg tgtccacatg tgggacgggg gtagggccct actcgactgg 420
ttcttggtcc agtcggactg gacggaccag tttccgaaga tagggtcgct gtagcggcac 480
ctcacctctc cgttaccctg cggcctcttg ttgatgttct ggtgcggagg gcacgacctg 540
aggctgccga ggaagaagga gatgtcgttc gagtggcacc tgttctcgtc caccgtcgtc 600
cccttgcaag agagtacgag gcactacgta ctccgagacg tgttggtgat gtgcgtcttc 660
tcggagaggg acagaggccc attt                                     684

```

<210> 5

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 5

```

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1              5              10              15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
          20              25              30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
          35              40              45

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
          50              55              60

```

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Opis artificioálnej sekvencie: peptíd

<400> 6
Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Opis artificioálnej sekvence: peptíd

<400> 7
Gly Gly Gly Asn Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis artificioálnej sekvencie: peptíd

<400> 8
 Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificioálna sekvencia

<220>
 <223> Opis artificioálnej sekvencie: peptíd

<400> 9
 Gly Pro Asn Gly
 1

<210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificioálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificioálnej sekvencie: peptíd

<400> 10
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Pro
 1 5 10 15
 Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 20 25 30

<210> 11
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificioálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificioálnej sekvencie: peptíd

<220>
 <223> Cyklický peptíd: sekundárna štruktúra je udržiavaná disulfidovou
 väzbou medzi intramolekulovými Cys zosťatkami v pozíciách 9 a 31

<400> 11
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 12
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 12
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Arg Leu Gln Cys Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 13
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 13
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 14
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 14
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 15
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Lys zostatok v pozícii 18 je brómacetylovaný

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: derivatizovaný peptíd

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

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 16
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 16
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 17
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Lys v pozícii 18 je pegylovaný

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: derivatizovaný peptíd

<400> 17

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

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 18

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Cys v pozícii 18 je pegylovaný

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: derivatizovaný peptíd

<400> 18

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

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 19

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 19

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

Gly Asn Gly Ser Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30

Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 20

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Monoméerna podjednotka homodiméru; podjednotky v homodiméri sú viazané disulfidovou väzbou medzi Cys zosťatkami v pozícii 18 na každej podjednotke

<400> 20

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

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 21

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 21

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

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Peptíd je derivatizovaný na amíno-konci kovalentne naviazaným Fc
regiónom imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 22

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

Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
20 25 30

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno a karboxylovom konci na Fc
región imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 23

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

Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
20 25 30

<210> 24

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno- konci na Fc
región imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 24

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

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
región imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 25

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

Gly Pro Asn Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala
20 25 30

Arg Ala

<210> 26

<211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
 región imunoglobulínu

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 26
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 27
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
 región imunoglobulínu

<220>
 <223> Cyklický peptíd; sekundárna štruktúra je zachovávaná
 disulfidovou väzbou medzi intramolekulovými Cys zostatkami
 v pozíciách 9 a 31
 <220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 27
 Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ala
 35

<210> 28
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
 región imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 28

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

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Cys Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 29

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
región imunoglobulínu

<400> 29

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

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Ala Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 30

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
región imunoglobulínu

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 30

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

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 31
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
región imunoglobulínu

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 31
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 32
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd
<220>
<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc
región imunoglobulínu

<400> 32
Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly
1 5 10 15

Gly Asn Gly Ser Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 33
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificiálna sekvencia

<220>
<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<220>
<223> Peptíd je podjednotkou homodiméru; podjednotky homodiméru sú

kovalentne viazané disulfidovou väzbou medzi Cys zostatkami v pozícii 18 každej podjednotky

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc región imunoglobulínu

<400> 33

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

Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
20 25 30

Ala Ala Arg Ala
35

<210> 34

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<220>

<223> Peptíd je kovalentne naviazaný na amíno konci na Fc región imunoglobulínu

<400> 34

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

Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr
20 25 30

Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
35 40

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 35

aaaggtggag gtggtggtat cgaaggtccg actctgcgtc agtggctggc tgctcgtgct 60

<210> 36

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 36
 acctccacca ccagcacgag cagccagcca ctgacgcaga gtcggacc 48

<210> 37
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 37
 ggtggtggag gtggcggcgg aggtattgag ggcccaaccc ttcgccaatg gcttgcagca 60
 cgcgca 66

<210> 38
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 38
 aaaaaaagga tcctcgagat tatgcgcgtg ctgcaagcca ttggcgaagg gttgggccct 60
 caatacctcc gccgcc 76

<210> 39
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 39
 aaaggtggag gtggtggtat cgaaggtccg actctgcgtc agtgggtggc tgctcgtgct 60
 ggtggtggag gtggcggcgg aggtattgag ggcccaaccc ttcgccaatg gcttgcagca 120
 cgcgca 126

<210> 40
 <211> 124
 <212> DNA
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 40
 ccaggctgag acgcagtcac cgaccgacga gcacgaccac cacctccacc gccgcctcca 60
 taactcccgg gttgggaagc ggttaccgaa cgtcgtgcgc gtattagagc tcctaggaaa 120
 aaaa 124

<210> 41
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 41

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu
1 5 10 15

Ala Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro
20 25 30

Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
35 40

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 42

aacataagta cctgtaggat cg 22

<210> 43

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 43

ttcgatacca ccacctccac ctttaccgag agacagggag aggctcttct gc 52

<210> 44

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificiálna sekvencia

<220>

<223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 44

tctagatttg ttttaactaa ttaaaggagg aataacatat ggacaaaact cacacatgtc 60
caccttgtcc agctccggaa ctcttggggg gaccgtcagt cttcctcttc ccccaaaaac 120
ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtgtg gtggacgtga 180
gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 240
ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 300
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 360
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 420
agggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 480
gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 540
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctt 600
acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 660
tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 720
aagggtggagg tgggtggatc gaagggtccga ctctgcgtca gtggctggct gctcgtgctg 780
gtgggtggagg tggcgggcga ggtattgagg gcccaaccct tcgccaatgg cttgcagcac 840
gcgcataatc tcgaggatcc g 861

<210> 45
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: oligonukleotíd

<400> 45
 agatctaaac aaaattgatt aatttcctcc ttattgtata cctgttttga gtgtgtacag 60
 gtggaacagg tcgaggcctt gaggaccccc ctggcagtca gaaggagaag ggggggtttg 120
 gggttcctgtg ggagtactag agggcctggg gactccagtg tacgcaccac cacctgcact 180
 cggtgcttct gggactccag ttcaagttga ccatgcacct gccgcacctc cacgtattac 240
 ggttctgttt cggcgccctc ctcgtcatgt tgctgtgcat ggcacaccag tcgcaggagt 300
 ggcaggacgt ggtcctgacc gacttaccgt tcctcatgtt cacgttccag aggttggttc 360
 gggagggtcg ggggtagctc ttttggtaga ggtttcggtt tcccgtcggg gctcttggtg 420
 tccacatgtg ggacgggggt agggccctac tcgactggtt cttgggtccag tcggactgga 480
 cggaccagtt tccgaagata gggtcgtctg agcggcacct caccctctcg ttaccgctcg 540
 gcctcttggt gatgttctgg tgcggagggc acgacctgag gctgccgagg aagaaggaga 600
 tgctgttcga gtggcacctg ttctcgtcca ccgtcgtccc cttgcagaag agtacgaggc 660
 actacgtact ccgagacgtg ttggtgatgt gcgtcttctc ggagagggac agaggcccat 720
 ttccacctcc accaccatag cttccaggct gagacgcagt caccgaccga cgagcacgac 780
 caccacctcc accgccgcct ccataactcc cgggttgagg agcggttacc gaacgtcgtg 840
 cgcgtattag agctcctagg c 861

<210> 46
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificiálna sekvencia

<220>
 <223> Opis Artificiálnej sekvencie: peptíd

<400> 46
 Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

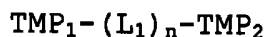
Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg
 225 230 235 240

Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ile
 245 250 255

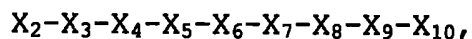
Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala
 260 265

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Zlúčenina, ktorá sa viaže na Mpl receptor a ktorá má všeobecný vzorec



kde TMP_1 a TMP_2 sú každý nezávisle vybratý zo skupiny zlúčenín obsahujúcich základnú štruktúru:



kde

X_2 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Glu, Asp, Lys, a Val;

X_3 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gly a Ala;

X_4 je Pro;

X_5 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Thr a Ser;

X_6 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, Ile, Val, Ala, a

Phe; X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg a Lys;

X_8 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Gln, Asn, a Glu;

X_9 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Trp, Tyr, a Phe;

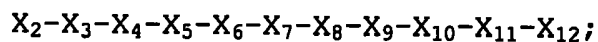
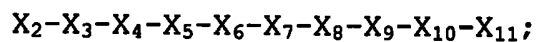
X_{10} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, a Lys;

L_1 je spájacia skupina; a

n je 0 alebo 1;

a jej fyziologicky prijateľné soli.

2. Zlúčenina podľa nároku 1, kde uvedené TMP_1 a TMP_2 sú nezávisle vybraté zo skupiny zahŕňajúcej:



$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13};$

$X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13};$

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14};$

kde

X_2-X_{10} sú rovnaké, ako boli definované vyššie;

X_1 vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ile, Ala, Val, Leu, Ser, a Arg;

X_{11} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, a Glu;

X_{12} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser a Gln;

X_{13} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, a Gly; a

X_{14} je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu a Gly.

3. Zlúčenina podľa nároku 1, kde uvedené TMP_1 a/alebo TMP_2 sú derivatizované jedným alebo viacerými z nasledujúcich spôsobov:

jedna alebo viac peptídylových väzieb $[-C(O)NR-]$ bola nahradená nepeptídylovou väzbou, ako je $-CH_2$ -karbamátová väzba $[-CH_2-OC(O)NR-]$; fosfonátovou väzbou; $-CH_2$ -sulfonamídovou $[-CH_2-S(O)_2NR-]$ väzbou; močovínovou $[NHC(O)NH-]$ väzbou; $-CH_2$ -sekundárnou amín- väzbou; alebo alkylovanou peptídylovou väzbou $[-C(O)NR^6-]$, kde R^6 je nižší alkyl;

N-koniec je $-NRR^1$ skupina; $-NRC(O)R$ skupina; $-NRC(O)OR$ skupina; $-NRS(O)_2R$ skupina; $-NHC(O)NHR$ skupina, kde R a R^1 sú vodík alebo nižší alkyl, s podmienkou, že R a R^1 nie sú oba vodík; sukcinimidová skupina; benzyloxykarbonyl-NH-(CBZ-NH-) skupina; alebo benzyloxykarbonyl-NH-skupina obsahujúca 1 až 3 substituenty na fenylovom kruhu vybraté zo skupiny zahŕňajúcej nižší alkyl, nižší alkoxy, chlór a bróm; a

C-koniec je $-C(O)R^2$, kde R^2 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej nižší alkoxy a $-NR^3R^4$, kde R^3 a R^4 sú nezávislo vybraté zo skupiny zahŕňajúcej vodík a nižší alkyl.

4. Zlúčenina podľa nároku 1, kde majú všetky aminokyseliny D-konfiguráciu.

5. Zlúčenina podľa nároku 1, kde má aspoň jedna aminokyselina D-konfiguráciu.

6. Zlúčenina podľa nároku 1, ktorá je cyklická.

7. Zlúčenina podľa nároku 1, kde TMP_1 a TMP_2 sú oba

Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala

(SEQ ID NO: 1).

8. Zlúčenina podľa nároku 1, kde L_1 obsahuje peptíd.

9. Zlúčenina podľa nároku 8, kde L_1 obsahuje Y_n , kde Y je prirodzená aminokyselina alebo jej stereoizomer a n je 1 až 20.

10. Zlúčenina podľa nároku 8, kde L_1 je $(Gly)_n$, kde n je 1 až 20 a kde, keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov substituovaná inou aminokyselinou

vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených aminokyselín alebo ich stereoizomérov.

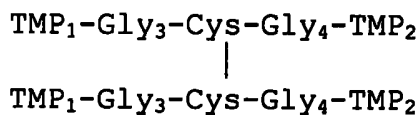
11. Zlúčenina podľa nároku 8, kde L_1 je vybratý zo skupiny zahŕňajúcej

(Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 6);
 (Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEQ ID NO: 7);
 (Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 8); a
 GlyProAsnGly (SEQ ID NO: 9).

12. Zlúčenina podľa nároku 8, kde L_1 obsahuje Cys zostatok.

13. Dimér zlúčeniny podľa nároku 12.

14. Dimér podľa nároku 13, ktorým je



15. Zlúčenina podľa nároku 1, kde L_1 obsahuje $(\text{CH}_2)_n$, kde n je 1 až 20.

16. Zlúčenina podľa nároku 1, ktorá je vybratá zo skupiny zahŕňajúcej

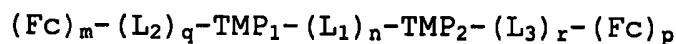
IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 9)

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cyklický)
 | _____ | (SEQ ID NO: 10)

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineárny)
 (SEQ ID NO: 11)

IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA	(SEQ ID NO: 12)
IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 13)
IEGPTLRQWLAARA-GGGK (BrAc) GGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 14)
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 15)
IEGPTLRQWLAARA-GGGK (PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 16)
IEGPTLRQWLAARA-GGGC (PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 17)
IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 18)
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	
IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 19)
IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA	(SEQ ID NO: 20)

17. Zlúčenina podľa nároku 1 alebo 2, ktorá má vzorec



kde L_1 , L_2 a L_3 sú spájacie skupiny, ktoré sú vybraté nezávisle zo skupiny zahŕňajúcej:

Y_n , kde Y je prirodzená aminokyselina alebo jej stereoizomér a "n" je 1 až 20;

$(Gly)_n$, kde n je 1 až 20 a kde, keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov substituovaná inou aminokyselinou vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených aminokyselin alebo ich stereoizomérov;

$(Gly)_3Lys(Gly)_4$ (SEQ ID NO: 6);

$(Gly)_3AsnGlySer(Gly)_2$ (SEQ ID NO: 7);

$(Gly)_3Cys(Gly)_4$ (SEQ ID NO: 8);

$GlyProAsnGly$ (SEQ ID NO: 9);

Cys zostatku; a

$(CH_2)_n$, kde n je 1 až 20;

Fc je Fc región imunoglobulínu; m , p , q a r sú každý nezávisle 0 alebo 1, kde aspoň jeden z m alebo p je 1 a ďalej

kde pokiaľ m je 0, tak q je 0, a pokiaľ p je 0, tak r je 0; a jej farmaceuticky prijateľné soli.

18. Zlúčenina podľa nároku 17, kde L_1 , L_2 a L_3 sú každý nezávisle vybraté zo skupiny zahŕňajúcej Y_n , kde Y je vybratý z prirodzených aminokyselín alebo ich stereoizomérov a n je 1 až 20.

19. Zlúčenina podľa nároku 18, kde L_1 obsahuje $(Gly)_n$, kde n je 1 až 20 a kde, keď je n väčšie ako 1, tak môže byť až polovica Gly zostatkov substituovaná inou aminokyselinou vybratou zo zostávajúcich 19 prirodzených aminokyselín alebo ich stereoizomérov.

20. Zlúčenina podľa nároku 18, kde L_1 , L_2 a L_3 sú nezávisle vybraté zo skupiny zahŕňajúcej

$(Gly)_3Lys(Gly)_4$ (SEQ ID NO: 6);
 $(Gly)_3AsnGlySer(Gly)_2$ (SEQ ID NO: 7);
 $(Gly)_3Cys(Gly)_4$ (SEQ ID NO: 8); a
 $GlyProAsnGly$ (SEQ ID NO: 9).

21. Zlúčenina podľa nároku 18, kde L_1 , L_2 alebo L_3 obsahujú Cys zostatok.

22. Dimér zlúčeniny podľa nároku 21.

23. Zlúčenina podľa nároku 17, kde L_1 , L_2 alebo L_3 obsahujúci $(CH_2)_n$, kde n je 1 až 20.

24. Zlúčenina podľa nároku 1, ktorá je vybratá zo skupiny zahŕňajúcej:

- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 21)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ ID NO: 22)
- IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ ID NO: 23)
- Fc-GG-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 24)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 25)
- Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cyklický)
 | _____ | (SEQ ID NO: 26)
- Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineárny)
 (SEQ ID NO: 27)
- Fc-IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ ID NO: 28)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 29)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 30)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 31)
- Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA
 |
 Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 32)
- Fc-GGGGG-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA
 (SEQ ID NO: 33).

25. Spôsob na zvýšenie počtu megakaryocytov alebo trombocytov pacienta potrebujúceho toto zvýšenie, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že podanie účinného množstva zlúčeniny podľa nároku 1 pacientovi.

• 26. Spôsob podľa nároku 25, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené množstvo je od 1 µg/kg do 100 µg/kg.

27. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje zlúčeninu podľa nároku 1 v zmesi s jej farmaceuticky prijateľným nosičom.

28. Polynukleotíd, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kóduje zlúčeninu podľa nároku 8.

29. Polynukleotíd, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kóduje zlúčeninu podľa nároku 13.

30. Polynukleotíd, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kóduje zlúčeninu podľa nároku 18.

31. Polynukleotíd, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že kóduje zlúčeninu podľa nároku 22.

32. Vektor, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje polynukleotíd podľa akéhokoľvek z nárokov 28-31.

33. Hostiteľská bunka, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje vektor podľa nároku 32.

34. Spôsob výroby zlúčeniny podľa nárokov 8, 13, 18 alebo 22, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zahŕňa kultiváciu uvedenej hostiteľskej bunky podľa nároku 33 vo vhodnom živnom médiu a izoláciu uvedenej zlúčeniny z uvedených buniek alebo živného média.

```

ATGGACAAAACCTCACACATGTCCACCTTGTCCAGCTCCGGAACCTCCTGGGGGGACCGTCA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACCTGTTTTGAGTGTGTACAGGTGGAACAGGTGAGGCCTTGAGGACCCCCCTGGCAGT
a  M D K T H T C P P C P A P E L L G G P S -

GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAGAAGGAGAAGGGGGGTTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAG
a  V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V -

ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TGTACGCACCACCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCAC
a  T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V -

GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CTGCCGCACCTCCACGTATTACGGTTCTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTGCGTGC
a  D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T -

TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATGGCACACCAGTCGCAGGAGTGGCAGGACGTGGTCCTGACCGACTTACCGTTCCTCATG
a  Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y -

AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTCACGTTCCAGAGGTTGTTTCGGGAGGGTCGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGG
a  K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A -

AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TTTCCCGTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGG
a  K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T -

AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TTCTTGGTCCAGTCGGACTGGACGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCAC
a  K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V -

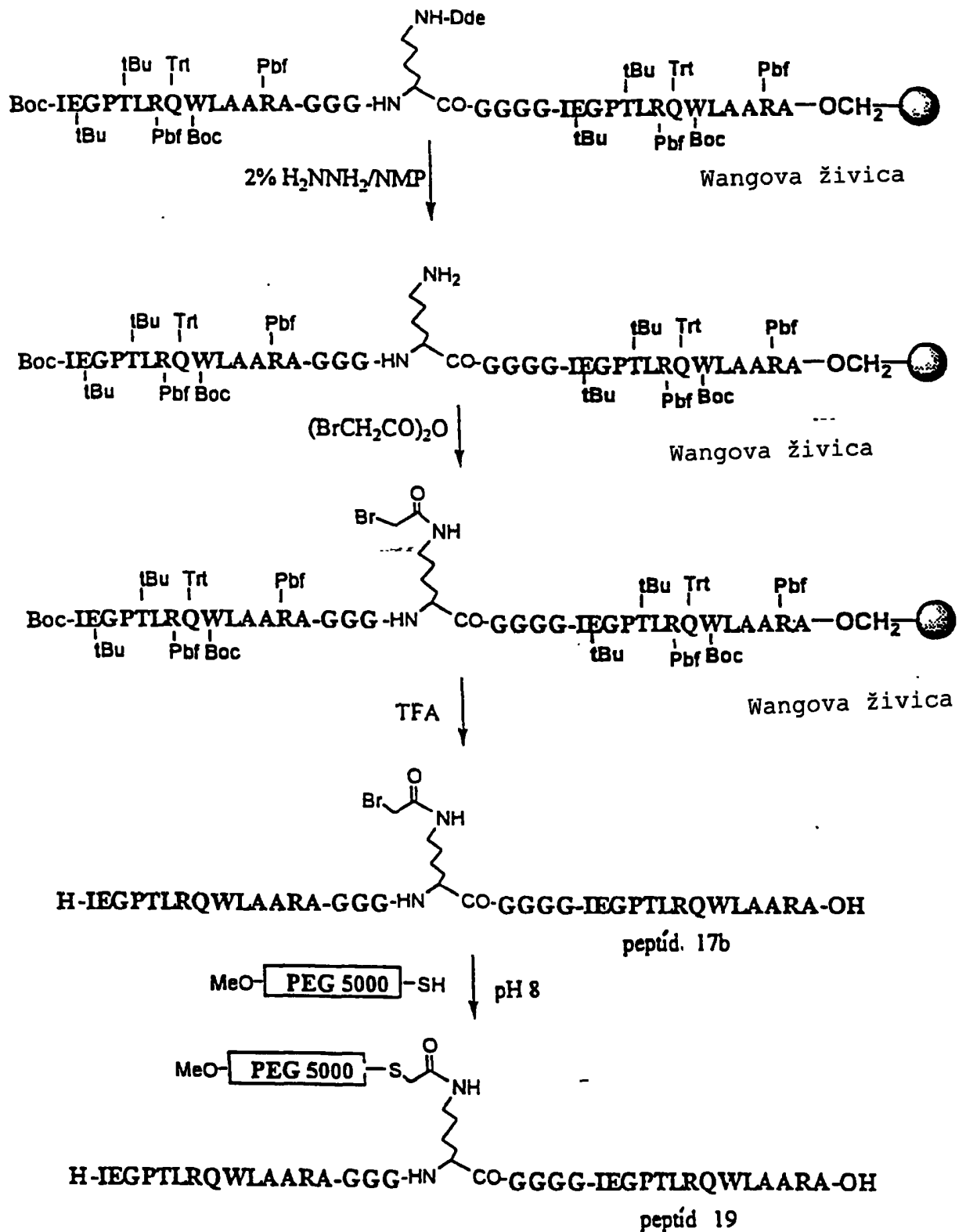
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTCACCTCTCGTTACCCGTCGGCCTCTTGTGATGTTCTGGTGCGGAGGGCACGACCTG
a  E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D -

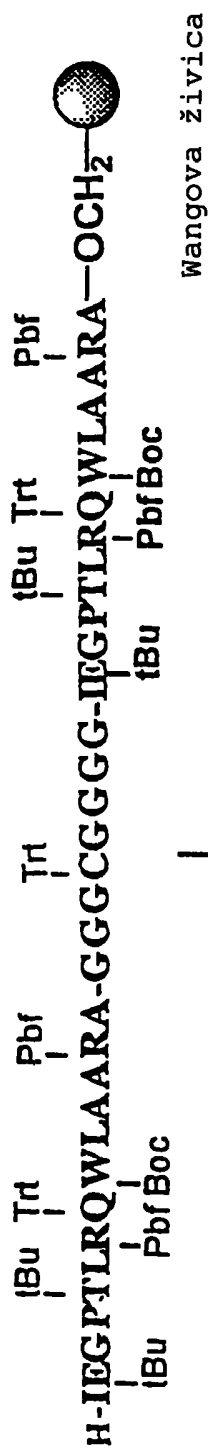
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATGTCGTTGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTC
a  S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q -

GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCCTTGCAAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGATGTGCGTCTTC
a  G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K -

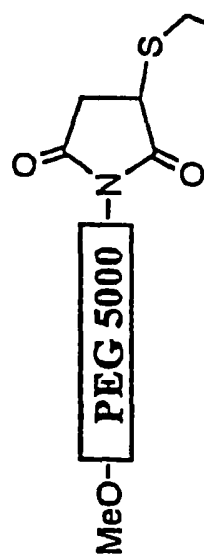
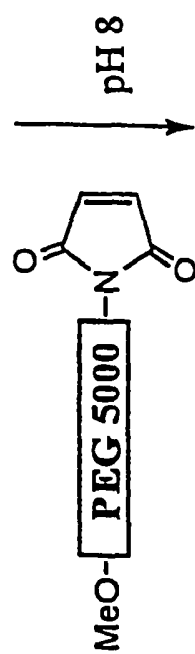
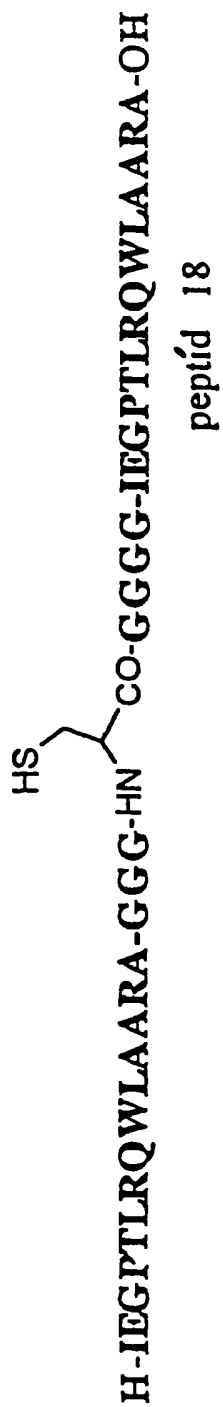
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
661  -----+-----+-----+-----+-----+ 684
TCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTT
a  S L S L S P G K

```





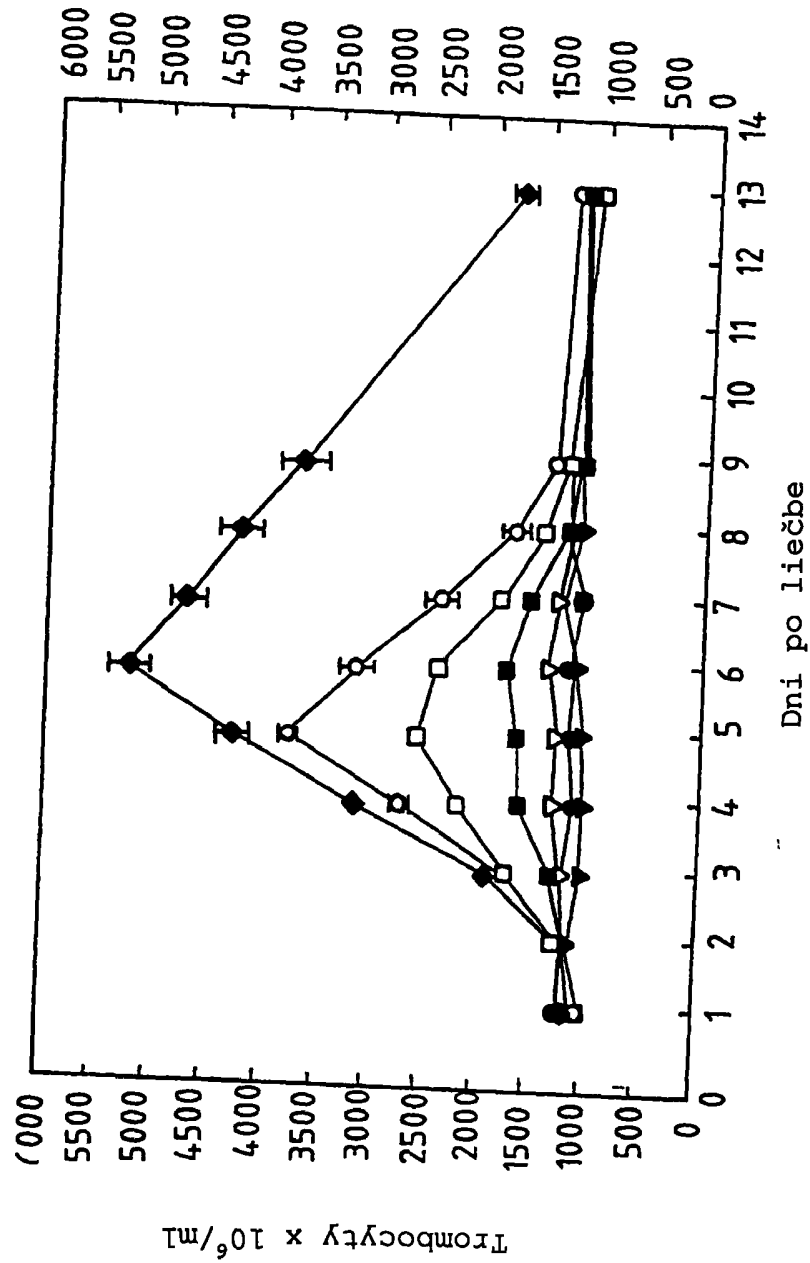
Wangova živica



peptid, 20

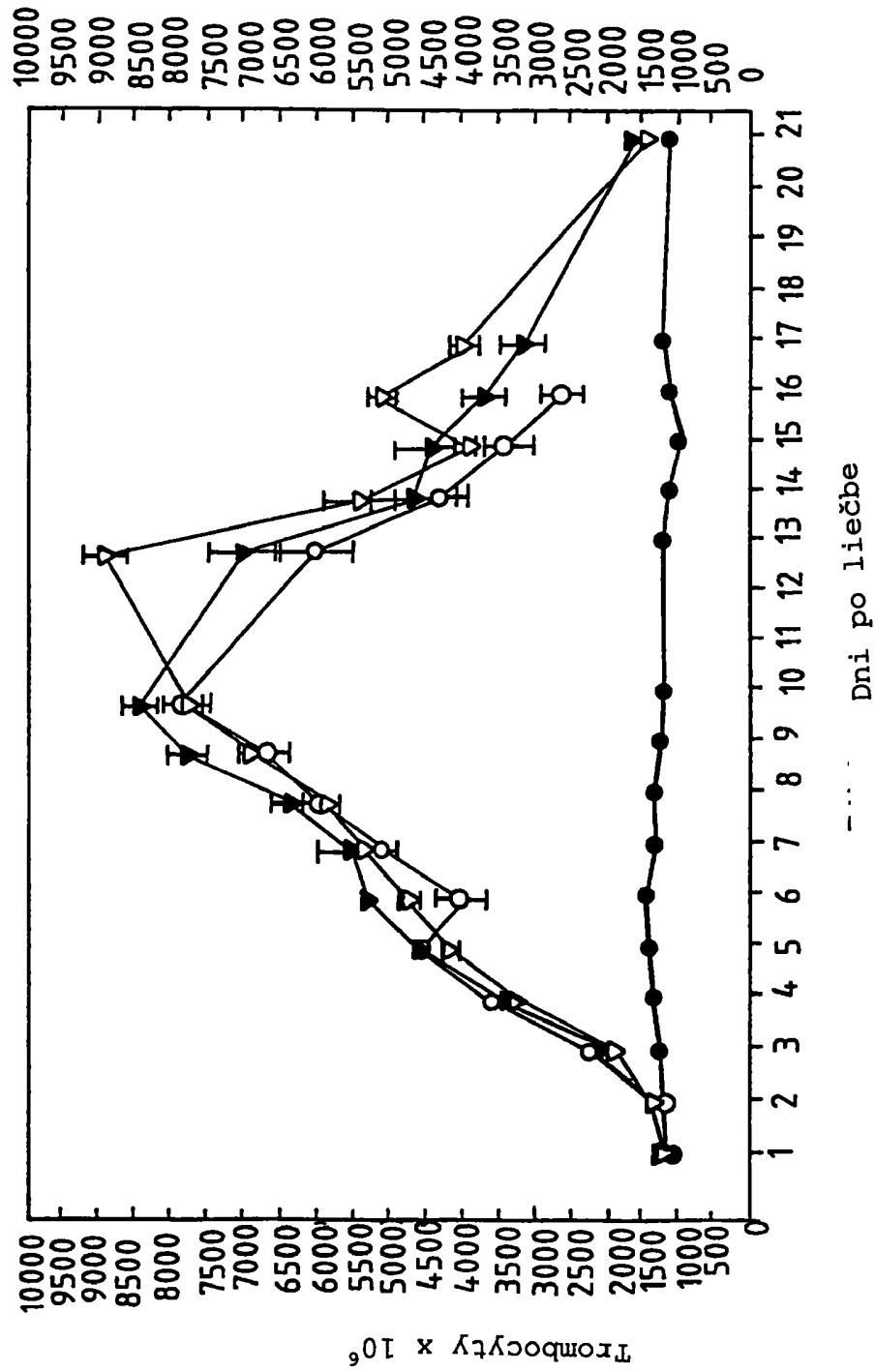
Obz. 3

09.08.01



Obr. 4h

09.08.01

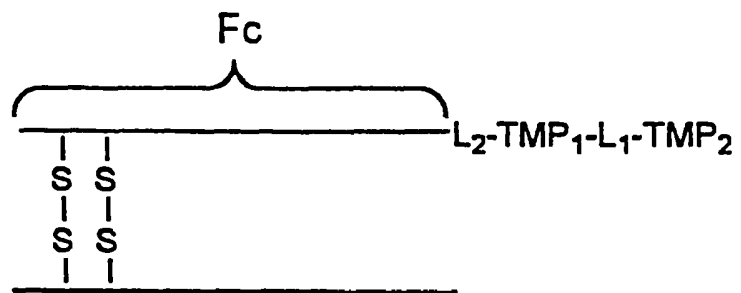
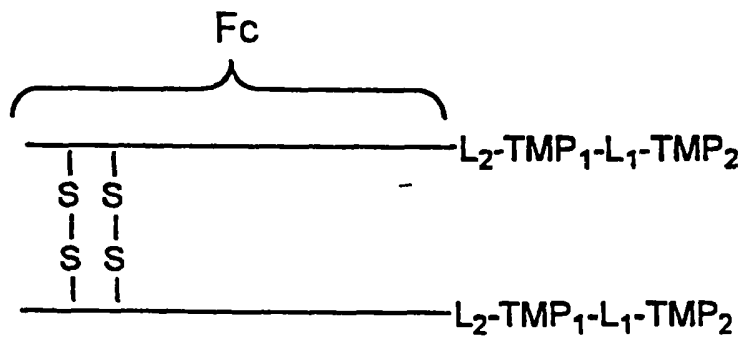


● nosič
 ○ PEG-MGDF
 ▼ TMPTMPFc dimer
 ▽ FcTMPTMP dimer

Obr. 5



Obr. 6A |

Obr. 6B₁

| Obr. 6C