

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 7/02
 C07K 7/06 C07K 7/08
 C07K 7/50 C07K 7/54
 C07K 14/52

[21] 申请号 96196142.2

[43]公开日 1998年9月9日

[11] 公开号 CN 1192749A

[22]申请日 96.6.7

[30]优先权

[32]95.6.7 [33]US[31]08 / 485,301

[32]95.6.7 [33]US[31]08 / 478,128

[86]国际申请 PCT / US96 / 09623 96.6.7

[87]国际公布 WO96 / 40750 英 96.12.19

[85]进入国家阶段日期 98.2.6

[71]申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72]发明人 W·J·道尔 R·W·巴蓄特

S·E·维尔拉 D·J·杜芬

C·M·加特斯 S·S·哈瑟登

L·C·马特基斯 P·J·斯查茨

C·R·瓦斯特罗姆 N·C·赖顿

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨九昌

权利要求书 5 页 说明书 65 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 结合血小板生成素受体的肽和化合物

[57]摘要

本发明的受体是结合并激活血小板生成素的受体的肽和肽模拟物。该肽和肽模拟物在用于治疗血液学紊乱，特别是由化疗，放疗或骨髓输血引起的血小板减少症的方法以及采用标记的肽和肽模拟物的诊断方法中 useful。

权 利 要 求 书

1. 一种结合血小板生成素受体的化合物，所说的化合物具有：

(1) 小于大于 8000 道尔顿的分子量，

(2) 与血小板生成素受体的结合亲和力表达为 IC_{50} 不超过大约
5 100 μ m。

2. 权利要求 1 的化合物，其中所说的化合物是一种肽，且其中从 0 个到全部的该肽的 $-C(O)NH-$ 键已被选自下列基团的键取代：

$-CH_2OC(O)NR-$ 键；磷酸酯键； $-CH_2S(O)_2NR-$ 键； $-CH_2NR-$ 键；
10 $-C(O)NR^6-$ 键； $-NHC(O)NH-$ 键，其中 R 是氢或低级烷基， R^6 是低级烷基，

另外，其中所说的肽或肽模拟物的 N 端选自： $-NRR^1$ 基； $-NRC(O)R$ 基； $-NRC(O)OR$ 基； $NRS(O)_2R$ 基； $-NHC(O)NHR$ 基；琥珀酰亚胺基；
15 苄氧羰基 $-NH-$ 基；在苯环上具有选自低级烷基，低级烷氧基，氯，和溴的 1 至 3 个取代基的苄氧羰基 $-NH-$ 基团，其中 R 和 R^1 独立地选自氢和低级烷基，

而且其中所说的肽或肽模拟物的 C 端具有通式 $-C(O)R^2$ ，其中 R^2 选自羟基，低级烷氧基，和 $-NR^3R^4$ ，其中 R^3 和 R^4 独立地选自氢和低级烷基且其中 $-NR^3R^4$ 的 N 原子任选可以是肽 N 端的胺基以形成环状
20 肽，

以及其生理上可接受的盐。

3. 一种药用组合物，包含与药用上可接受的载体结合的权利要求 1 的化合物。

4. 一种治疗患有对用血小板生成素激动剂治疗敏感的疾病的病人的方法，包含给病人施用治疗上有效剂量或量的权利要求 1 的化合物。
25

5. 权利要求 4 的方法，其中给病人施用的化合物是一种肽，且其中从 0 个到全部的肽的 $-C(O)NH-$ 键被选自下列基团的键取代： $-CH_2OC(O)NR-$ 键；磷酸酯键； $-CH_2S(O)_2NR-$ 键， $-CH_2NR$ 键； $-C(O)NR^6-$ 键；
30 $-NHC(O)NH-$ 键，其中 R 是氢或低级烷基， R^6 是低级烷基，

另外，其中所说的肽或肽模拟物的 N 端选自 $-NRR^1$ 基； $-NRC(O)R$ 基； $-NRC(O)OR$ 基； $-NRS(O)_2R$ 基； $-NHC(O)NHR$ 基；琥珀酰亚胺基；

苄氧羰基-NH-基；在苯环上具有选自烷基，低级烷氧基，氯和溴的 1 至 3 个取代基的苄氧羰基-NH-，其中 R 和 R¹ 独立地选自氢和低级烷基，

而且其中所说的肽或肽模拟物的 C 端具有通式-C(O)R²，其中 R² 选自羟基，低级烷氧基，和通式-NR³R⁴，其中 R³ 和 R⁴ 独立地选自氢和低级烷基，且其中-NR³R⁴ 基团的氮原子可任选是该肽 N 端的胺基以形成一个环状肽，

以及其生理上可接受的盐。

6. 权利要求 2 的化合物，其中所说的化合物包括氨基酸序列 X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇，其中 X₁ 是 C, L, M, P, Q, V；X₂ 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V；X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W；X₄ 是 20 种遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一种；X₅ 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y；X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y；X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。

7. 权利要求 6 的化合物，其中所说的氨基酸序列是环化的。

8. 权利要求 6 的化合物，其中所说的氨基酸序列是二聚体化的。

9. 权利要求 6 的化合物，其中该化合物包含氨基酸序列 CX₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇，其中 X₂ 是 K, L, N, Q, R, S, T 或 V；X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S 或 V；X₄ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个；X₅ 是 A, D, E, G, S, V 或 Y；X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y；X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。

10. 权利要求 8 的化合物，其中 X₄ 是 A, E, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T 或 W。

11. 权利要求 10 的化合物，其中 X₂ 是 S 或 T；X₃ 是 L 或 R；X₆ 是 R；X₅ 是 D, E 或 G；X₆ 是 F, L, 或 W；X₇ 是 I, K, L, R 或 V。

12. 权利要求 9 的化合物，其中所说的化合物包含氨基酸序列 X₈ C X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇，其中 X₂ 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V；X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W；X₄ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个；X₅ 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y；X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y；X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V；X₈ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个。

13. 权利要求 12 的化合物，其中 X₈ 是 G, S, Y 或 R。

14. 权利要求 12 的化合物，其中所说的化合物包含氨基酸序列：

GGCTLREWLHGGFCGG。

15. 权利要求6的化合物,其中所说的化合物包含氨基酸序列 X₈ G X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ W X₇, 其中 X₁是L, M, P, Q或V; X₂是F, R, S或T; X₃是F, L, V或W; X₄是A, K, L, M, R, S, V或T; X₅是A, E, G, K, M, Q, R, S, 或T; X₇是C, I, K, L, M或V; X₈是20种遗传编码的L-氨基酸中的任意一个。

16. 权利要求15的化合物;其中X₁是P, X₂是T; X₃是L, X₄是R; X₅是E或Q; X₇是I或L。

17. 权利要求16的化合物,其中所说的化合物包含氨基酸序列 X₉ X₈ G X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ W X₇, 其中X₈是A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T或V; X₉是A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T或V。

18. 权利要求17的化合物,其中X₈是D, E或K; X₉是A或I。

19. 权利要求18的化合物,其中所说的化合物选自GGCADGPTLREWISFCGG; GNADGPTLRQWLEGRRPKN; GGCADGPTLREWISFCGGK; TIKGPTLRQWLKSREHTS; SIEGPTLREWLTSRTPHS; LAIEGPTLRQWLHGNGRDT; CADGPTLREWISFC和IEGPTLRQWLAARA。

20. 权利要求4的方法,其中给病人施用的所说的化合物包含氨基酸序列CX₂X₃X₄X₅X₆X₇, 其中, X₂是K, L, N, Q, R, S, T或V; X₃是C, F, I, L, M, R, S或V; X₄是20个遗传编码的L-氨基酸中的任意一个; X₅是A, D, E, G, S, V或Y; X₆是C, F, G, L, M, S, V, W或Y; X₇是C, G, I, K, L, M, N, R或V。

21. 权利要求20的方法,其中X₄是A, E, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T或W。

22. 权利要求21的方法,其中X₂是S或T; X₃是L或R; X₄是R; X₅是D, E或G; X₆是F, L或W; X₇是I, K, L, R或V。

23. 权利要求22的方法,其中施用给病人的所说的化合物包含氨基酸序列GGCTLREWLHGGFCGG。

24. 权利要求4的方法,其中对用血小板生成素激动剂治疗敏感的疾病选自血液学疾病和由化疗, 放疗, 或骨髓输血(marrow transfusion)引起的血小板减少症。

25. 权利要求4的方法,其中施用给病人的所说的化合物包含氨

氨基酸序列 $X_8GX_1X_2X_3X_4X_5WX_7$ ，其中 X_1 是 L, M, P, Q 或 V; X_2 是 F, R, S 或 T; X_3 是 F, L, V 或 W; X_4 是 A, K, L, M, R, S, V 或 T; X_5 是 A, E, G, K, M, Q, R, S, 或 T; X_7 是 C, I, K, L, M 或 V; X_8 残基是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个。

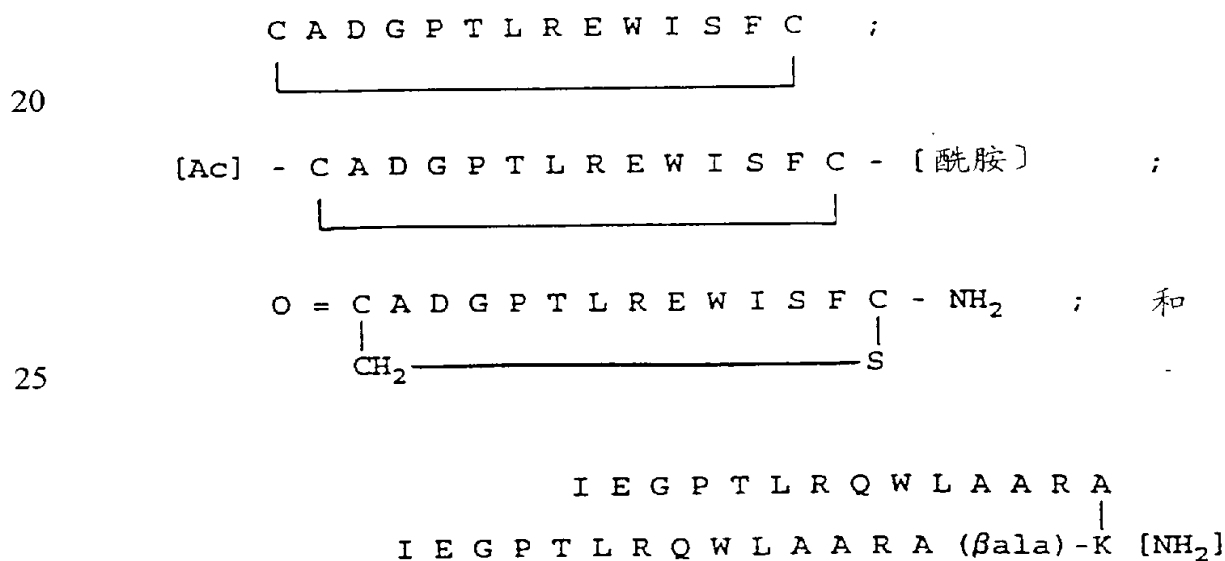
5 26. 权利要求 25 的方法，其中 X_1 是 P; X_2 是 T; X_3 是 L; X_4 是 R; X_5 是 E 或 Q; X_7 是 I 或 L。

27. 权利要求 26 的方法，其中所说的化合物包含氨基酸序列 $X_9X_8GX_1X_2X_3X_4X_5WX_7$ ，其中 X_8 是 A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T 或 V; X_9 是 A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T 或 V。

10 28. 权利要求 27 的方法，其中 X_8 是 D, E 或 K; X_9 是 A 或 I。

29. 权利要求 28 的方法，其中施用给病人的化合物选自 GGCAD
 GPTLREWISFCGG; GNADGPTLRQWLEGRRPKN; G
 GCADGPTLREWISFCGGK; TIKGPTLRQWLKSREH
 TS; SIEGPTLREWLTSRTPHS; LAIEGPTLRQWLHGN
 15 GRDT; CADGPTLREWISFC 和 IEGPTLRQWLAARA。

30. 与血小板生成素受体结合的化合物，其中所说的化合物选自：



30

31. 用于治疗患有对用血小板生成素激动剂治疗敏感的疾病的病人的方法，包含给病人施用选自下列物质的化合物：

C A D G P T L R E W I S F C ;

[Ac] - C A D G P T L R E W I S F C - [酰胺] ;

O = C A D G P T L R E W I S F C - NH₂ ; 和
|
CH₂ ————— S

I E G P T L R Q W L A A R A
I E G P T L R Q W L A A R A (βala)-K [NH₂]

说明书

结合血小板生成素受体的肽和化合物

相关申请的交叉参考

5 本申请是申请日为 1995 年 6 月 7 日的美国专利申请系列号 08/485,301 和 1995 年 6 月 7 日申请的美国专利申请系列号 08/478,128 的部分延续, 其每篇在本文中以其全文引用以供所有目的的参考。

本发明的背景

10 本发明提供了结合并激活血小板生成素受体 (c-mpl 或 TPO-R) 或否则充当 TPO 激动剂 (agonist) 的肽和化合物。本发明应用于生化和药物化学领域且特别是提供用于治疗人类疾病的 TPO 激动剂。

巨核细胞是来自骨髓的细胞, 它负责产生循环血小板。尽管在大多数种类中包括 <0.25% 的骨髓细胞, 但它们具有 >10 倍的典型骨髓细胞的体积。见 Kuter 等, 美国科学院院报: 91:11104-11108 (1994)。巨核细胞进行称为核内有丝分裂的过程, 经过该过程它们复制其细胞核但不进行细胞分裂, 从而产生多倍体细胞。与血小板数减少反应, 核内有丝分裂率增加, 形成倍性更高的巨核细胞, 巨核细胞数可增加达 3 倍。见 Harker, 临床研究杂志: 47:458-465 (1968)。相反, 与血小板数升高反应, 核内有丝分裂率减小, 形成倍性较低的巨核细胞, 巨核细胞数可减少 50 %。

20 循环血小板数调节核内有丝分裂速率和骨髓巨核细胞数的精确生理反馈机制还不清楚。现在认为涉及介导该反馈环的循环血小板生成因子是血小板生成素 (TPO)。更具体地说, 已显示在涉及血小板减少症的情况中 TPO 是主要的体液调节物。例如, 见 Metcalf 自然 369:519-520 (1994)。在一些研究中已显示 TPO 增加血小板数, 增加血小板大小, 并增加掺入受体动物血小板的同位素。具体地说, 认为 TPO 以几种方式影响巨核细胞生成: (1) 它使巨核细胞大小和数目增加; (2) 它使巨核细胞中以多倍性的形式产生 DNA 含量的增加; (3) 它增加巨核细胞的核内有丝分裂; (4) 它使巨核细胞突变增加; (5) 它使骨髓中以小乙酰胆碱脂酶阳性细胞形式的前体细胞百分数增加。

30 由于血小板 (血小板细胞) 对血液凝集是必需的且当其数目很低时, 病人有死于突变性出血的严重危险, 所以 TPO 在诊断和治疗各种

血液学紊乱，如，主要由血小板缺陷引起的疾病中具有潜在的有用应用。用 TPO 进行的临床试验表明 TPO 可安全地给病人施用。另外，最近的研究提供了在治疗血小板减小症，特别是由作为癌症或淋巴瘤治疗的化疗，放疗或骨髓移植引起的血小板减少症中 TPO 治疗的效果设计的基础。参见，例如，McDonald (1992), Am. J. Ped. Hematology/Oncology 14:8-21 (1992)。

已克隆和鉴定了编码 TPO 的基因。见 Kuter 等，美国科学院学报，91:11104-11108 (1994); Barley 等，细胞 77:1117-1124 (1994); Kaushansky 等，自然 369:568-571(1994); Wendling 等，自然 369:571-574 (1994); Sauvage 等，自然 369:533-538 (1994)。血小板生成素是具有至少两种形式的糖蛋白，表观分子量为 25kDa 和 31kDa，具有共同的 N 端氨基酸序列。见 Bartley 等，细胞，77:1117-1124 (1994)。血小板生成素似乎具有由潜在的 Arg-Arg 裂解位点分开的两个不同区域。氨基末端区域在人类和小鼠中高度保守，且与促红细胞生成素和干扰素-a 和干扰素-b 具有一定的同源性。羧基末端区域显示出广泛的种类趋异性。

已描述了人类 TPO-R(也称为 c-mpl)的 DNA 序列和编码的肽序列。见 Vigon 等，美国科学院学报 89:5640-5644 (1992)。TPO-R 是血细胞生成素生长因子受体家族的一个成员，该家族的特征在于有一个细胞外区的共同结构设计，包括在 N 端部分的 4 个保守的 C 残基和靠近跨膜区的 WSXWS 基序。见 Batan，美国科学院学报; 87:6934-6938 (1990)。该受体在造血中发挥功能的证据包括其表达在小鼠中局限于脾，骨髓或胚胎肝脏（见 Souyri 等，细胞 63:1137-1147 (1990)）且在人类中局限于巨核细胞，血小板，和 CD34⁺细胞(见 Methin 等，血液，82:1395-1401 (1993)) 的观察结果。而且，CD34⁺细胞与针对 mpl RNA 的合成反义寡核苷酸的接触明显抑制巨核细胞群体的出现而不影响红细胞或骨髓细胞集落形成。一些研究者假定该受体作为同型二聚体发挥功能，与 G-CSF 和促红细胞生成素的受体的情况相似。

TPO-R 克隆基因的获得有利于寻找该重要受体的激动剂。重组受体蛋白质的获得允许研究各种随机和半随机肽多样性产生系统中受体-配体的相互作用。这些系统包括在美国专利号 5,270,170 和 5,338,665 中描述的“质粒上的肽”系统；1991 年 6 月 20 日申请的美国专利申请系列号 07/718,577 及在 Cwirla 等，美国科学院学报，87:6378-6382 (1990)，

中描述的“噬菌体上的肽”系统；1994年9月2日申请的美国专利申请系列号08/300,262（它是以1993年10月29日申请的美国专利申请系列号08/144,775为基础的部分延续申请）和PCT WO 95/11,992中所述的“多核糖体”系统；1993年11月12日申请的美国专利申请系列号
5 08/146,886, 1992年9月16日申请的07/946,239及1991年9月18日申请的07/762,522中所述“编码的合成文库”系统和在美国专利号5,143,854；1990年12月13日公开的PCT专利公开号90/15,070；1990年12月6日申请的美国专利申请系列号07/624,120；Fodor等，科学251:767-773 (2/1991)；DOWer和Fodor Ann. Rep. Med. Chem., 26: 271-180
10 (1991), 1991年12月6日申请的美国专利申请系列号07/805,727中所述的“极大量固着的多体合成”系统；本文引用上述各专利申请和文献以供参考。

在患有血小板减少症的病人中血小板水平的缓慢恢复是一个严重的问题，因此迫切要求寻找能加速血小板再生的血液生长因子激动剂。
15 本发明提供了该激动剂。

本发明的概述

本发明部分涉及一个新的且意想不到的发现：限定的低分子量肽和肽模拟物具有与TPO-R的强烈结合特性且能激活TPO-R。因此，该肽和肽模拟物对于治疗由TPO介导的症状（例如，由化疗，放疗或骨髓
20 输血引起的血小板减少症）的治疗目的及对于研究造血机制的诊断目的和对于巨核细胞和指定的祖先细胞（committed progenitor cell）的体外扩展（expansion）有用。

以下面实施例3所述的结合亲和试验测定的适于治疗和/或诊断目的的肽和肽模拟物具有大约2mM或更小的 IC_{50} ，其中 IC_{50} 越低相应于
25 与TPO-R的结合亲和力越强。为达到药用目的，肽和肽模拟物优选具有不超过大约100 μ m的 IC_{50} ，更优选不超过500nM。在优选的实施方案中，肽或肽模拟物的分子量从大约250到大约8000道尔顿。

当用于诊断目的时，肽和肽模拟物优选可检测的标记物标记，因此，没有该标记的肽和肽模拟物用作标记的肽和肽模拟物的制备的中间
30 产物。

满足分子量和TPO-R结合亲和力限定标准的肽包括9个或更多个氨基酸，其中的氨基酸是天然存在的或合成的（非天然存在的）氨基酸。

肽模拟物包括具有一个或多个下列修饰的肽：

其中一个或多个肽基[-C(O)NR-]键(键)被诸如-CH₂-氨基甲酸酯键[-CH₂-OC(O)NR-]，磷酸酯键；-CH₂-氨磺酰[-CH₂S(O)₂NR-]键；脲[-NHC(O)NH-]键；-CH₂-仲胺键；或烷基化肽键[-C(O)NR⁶- 其中 R⁶ 是低级烷基]的非肽基键取代的肽；

其中 N 端衍变成-NRR¹基，-NRC(O)R 基；-NRC(O)OR 基；-NRS(O)₂R 基；-NHC(O)NHR 基(其中 R 和 R¹ 是氢或低级烷基，前提是 R 和 R¹ 不能同时是氢)；琥珀酰亚胺基；苄氧羰基-NH-(CBZ-NH-)基；或在苯环上具有选自低级烷基，低级烷氧基，氯和溴的 1 至 3 个取代的苄氧羰基-NH-基的肽；或

其中 C 端衍变成-C(O)R²的肽；其中 R² 选自低级烷氧基和-NR³R⁴ 其中 R³ 和 R⁴ 分别独立地选自氢和低级烷基。

因此，优选的肽和肽模拟物包含的化合物具有：

- (1) 分子量不超过大约 5000 道尔顿，和
- (2) 与 TPO-R 的结合亲和力表达为 IC₅₀ 不超过大约 100μm。

其中从 0 个到全部的肽的 -C(O)NH- 键被选自如下的键代替：-CH₂OC(O)NR-键；磷酸酯键；-CH₂S(O)₂NR-键；-CH₂NR-键；-C(O)NR⁶-键；-NHC(O)NH- 键，其中 R 是氢或低级烷基，R⁶ 是低级烷基。

而且其中所说的肽或肽模拟物的 N 端是选自-NRR¹基；-NRC(O)R 基；-NRC(O)OR 基；NRS(O)₂R 基；-NHC(O)NHR 基；琥珀酰亚胺基；苄氧羰基-NH-基；和在苯环上具有选自低级烷基，低级烷氧基，氯和溴的 1 至 3 个取代的苄氧羰基-NH-基，其中 R 和 R¹ 独立地选自氢和低级烷基。

另外，其中所说的肽或肽模拟物的 C 端具有通式-C(O)R²，(其中 R² 选自羟基，低级烷氧基)和-NR³R⁴ (其中 R³ 和 R⁴ 独立地选自氢和低级烷基)且其中-NR³R⁴ 基的 N 原子可任选是肽 N 端的胺以形成环肽，

及其生理学上可接受的盐。

在一个优选的实施方案中，本发明涉及标记的肽或肽模拟物，包含具有共价附着于其上的能检测的标记的上述肽或肽模拟物。

在本发明的有些实施方案中，使用的优选肽包括具有包含氨基酸序

列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$ 的核心结构的肽, 其中 X_1 是 C, L, M, P, Q, V; X_2 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X_3 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W; X_4 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X_5 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y; X_6 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X_7 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。

5 在一个优选的实施方案中, 核心肽包含氨基酸序列: $X_8 G X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 W X_7$, 其中 X_1 是 L, M, P, Q 或 V; X_2 是 F, R, S, 或 T; X_3 是 F, L, V 或 W; X_4 是 A, K, L, M, R, S, V, 或 T; X_5 是 A, E, G, K, M, Q, R, S 或 T; X_7 是 C, I, K, L, M 或 V; 每个 X_8 残基独立地选自 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个, 其立体异构体 D - 氨基酸; 和非天然氨基酸。优选的是, 各 X_8 残基独立地选自 20 个遗传编码的 L - 氨基酸及其立体异构体 D - 氨基酸中的任意一个。在一个优选的实施方案中, X_1 是 P, X_2 是 T; X_3 是 L; X_4 是 R; X_5 是 E 或 Q; X_7 是 I 或 L。

更优选的是, 核心肽包含氨基酸序列:

15 $X_9 X_8 G X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 W X_7$

其中, X_9 是 A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T 或 V; X_8 是 A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T 或 V。更优选的是 X_9 是 A 或 I; X_8 是 D, E 或 K。

特别优选的肽包括: GGCADGPTLREWISFCGG; GNA
20 DGPTLRQWLEGRRPKN; GGCADGPTLREWISFCGG
K; TIKGPTLRQWLKSREHTS; SIEGPTLREWLTSTRTP
HS; LAIEGPTLRQWLHGNGRDT; CADGPTLREWISF
C 和 IEGPTLRQWL AARA。

在本发明的进一步的实施方案中, 优选的用于本发明的肽包括具有包含下列氨基酸序列的核心结构的肽: $C X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$

25 其中, X_2 是 K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X_3 是 C, F, I, L, M, R, S 或 V; X_4 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X_5 是 A, D, E, G, S, V 或 Y; X_6 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X_7 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。
在更优选的实施方案中, X_4 是 A, E, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T 或 W。
在另一实施方案中, X_2 是 S 或 T; X_3 是 L 或 R; X_4 是 R; X_5 是 D, E
30 或 G; X_6 是 F, L 或 W; X_7 是 I, K, L, R 或 V。特别优选的肽包括: G
GCTLREW L HGGFCGG。

在另一实施方案中, 优选的用于本发明的肽包括具有包含氨基酸序

列 X₈CX₂X₃X₄X₅X₆X₇ 的结构肽，其中 X₂ 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W; X₄ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X₅ 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y; X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V; X₈ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个。在一些实施方案中，X₈ 优选是 G, S, Y 或 R。

本文所述的化合物对于预防和治疗由 TPO 介导的疾病，特别是对于治疗血液学疾病，包括但不限于由化疗，放疗或骨髓输血引起的血小板减少症有用。因此，本发明还提供了治疗病人的方法，其中，该病人具有对 TPO 激动剂的治疗敏感失调，该病人接受或施用治疗上有效剂量或量的本发明的化合物。

本发明还提供了包含一个或多个本文所述的化合物和生理学上可接受的载体的药用组合物。这些药用组合物可以是各种形式，包括口服剂量形式，以及可吸入的粉末和溶液和可注射及可输注的溶液。

附图的简要描述

图 1A-B 说明了在各种肽存在下的功能性试验的结果；试验在实施例 2 中描述。图 1A 是用于本发明选择的肽的 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞增殖试验的结果的图示：

■ 指 GGCADGPTLREWISFCGGK (生物素) 的结果；

× 指 GGCADGPTLREWISFCGG 的结果；

△ 指 LAIEGPTLRQWLHGNGRDT 的结果；

○ 指 GNADGPTLRQWLEGRRPKN 的结果；和

+ 指 TIKGPTLRQWLKSREHTS 的结果。

图 1B 是用相同的肽和亲代细胞系的结果的图示。

图 2A-C 显示了用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞增殖试验的肽寡聚化结果。图 2A 显示了对于转染的和亲代细胞系复合生物素标记的肽 (具有链霉抗生物素蛋白 (SA) 的 AF12285) 的试验结果。图 2B 显示了对于转染的和亲代细胞系游离生物素标记的肽 (A12285) 的试验结果。图 2C 显示了对于转染的和亲代细胞系单独的链霉抗生物素蛋白的测定结果。

图 3A-G 显示了一系列对照实验的结果，显示了使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系和其相应的亲代细胞系或 EPO 依赖型细胞系时 TPO，本发

明的肽, EPO, EPO-R 结合肽在细胞增殖中的活性。图 3A 描绘了使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系和其相应的亲代细胞系时 TPO 在细胞增殖试验中的结果。图 3B 描绘了 EPO 在使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系和其相应的亲代细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3C 描绘了在 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系中复合的生物素标记的肽(具有链霉抗生物素蛋白(SA)的 AF12285) 和复合形式的生物素标记的 EPO-R 结合肽(具有 SA 的 AF11505) 的结果。相应的亲代细胞系的结果在图 3D 中显示。图 3E 描绘了 TPO 在使用 EPO 依赖型细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3F 描绘了 EPO 在使用 EPO - 依赖型细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3G 描绘了复合生物素标记的肽(具有链霉抗生物素蛋白(SA)的 AF12885) 和复合形式的生物素标记的 EPO-R 结合肽(具有 SA 的 AF11505) 在 EPO - 依赖型细胞系中的结果。

图 4A-C 说明了在载体 pJS142 中在质粒上的肽文库的构建。图 4A 显示了基因的限制性图谱和位置。文库质粒包括 *rrnB* 转录终止子, 允许在氨苄青霉素上选择的 *bla* 基因, 允许挽救单链 DNA 的 M13 噬菌体基因内区域(M13 IG), 质粒复制起点(*ori*), 两个 *lacO₅* 序列, 允许正调节和负调节促使 *lac* 融合基因表达的 *araB* 启动子的 *araC* 基因。图 4B 显示了在 *lacI* 基因 3' 端克隆区的序列, 包括在文库构建期间使用的 *SfiI* 和 *EagI* 位点。图 4C 显示了退火文库寡核苷酸 ON-829 和 ON-830 连接到 pJS142 的 *SfiI* 位点以产生一个文库。序列中的单个间隔表示连接位点。

图 5A-B 说明了克隆进 pELM3 和 pELM15 MBP 载体。图 5A 显示了在 *malE* 融合基因的 3' 端的序列, 包括 MBP 编码序列, 多天冬酰胺连接子, 因子 Xa 蛋白酶裂解位点, 和可用的克隆位点。载体的其它部分来自可从 New England Biolabs 获得的 pMALc2 (pELM3) 和 pMALp2 (pELM15)。图 5B 显示了将 *BspEII-ScaI* 文库片段转移进 *AgeI-ScaI* 消化的 pELM3/pELM15 后的载体序列。转移的序列包括编码来自 pJS142 文库的 GGG 肽连接子的序列。

图 6A 描绘了用于在载体 pCMG14 中构建头状二聚体文库 (headpiece dimer library) 的基因的限制性图谱和位置。文库质粒包括: *rrnB* 转录终止子, 允许在氨苄青霉素上选择的 *bla* 基因, 允许挽救单链 DNA 的 M13 噬菌体基因内区域(M13 IG), 质粒复制起点(*ori*),

一个 lacO_s 序列，允许正调节和负调节促使头状二聚体融合基因表达的 araB 启动子的 araC 基因。图 6B 描绘了在头状二聚体基因 3' 端克隆区域的序列，包括文库构建中使用的 SfiI 和 EagI 位点。图 6C 显示了退火的 ON-1679, ON-829 和 ON-830 连接到 pCMG14 的 SfiI 位点以产生文库。

5 序列中的单一间隔表示连接位点。

图 7 到 9 显示了评价本发明的肽和肽模拟物的活性的进一步试验的结果。在这些试验中，小鼠用 carboplatin 使其血小板减少。图 7 描述了在第 0 天用 carboplatin (125mg/kg, 腹膜内注射) 处理 Balb/C 小鼠时的典型结果。虚线代表三个实验中的未处理的动物。实线代表三个实验
10 中 carboplatin 处理的组。粗实线代表以前的数据。图 8 描绘了 carboplatin 滴定对用所示量的 carboplatin (mg/kg, 在第 0 天腹膜内(ip)注射) 处理的小鼠中血小板计数的影响。图 9 描绘了以肽 AF12513 (513) 在第 10 天对 carboplatin 诱导的血小板减少症的改善。carboplatin (CBP; 50-125mg/kg, 经腹膜内) 在第 0 天施用。AF12513 (1mg/kg, ip) 在第
15 1 - 9 天给药。

具体实施方案的描述

I. 定义和一般参数

下面阐述的定义用来说明和限定本文用于描述本发明的各种术语的意义和范围。

20 “激动剂”指结合其互补的生物学活性受体并激活后者以引起受体的生物学反应或增强受体已经存在的生物学活性。

“药用上可接受的盐”指无毒性的碱金属，碱土金属和常用于制药工业的铵盐，包括钠，钾，锂，钙，镁，钡，铵，和鱼精蛋白锌盐，它们用本领域熟知的方法制备。该术语也包括无毒性的加酸盐，一般经过
25 将本发明的化合物与合适的有机或无机酸反应来制备。有代表性的盐包括盐酸盐，氢溴酸盐，硫酸盐，硫酸氢盐，乙酸盐，草酸盐，戊酸盐，油酸盐，月桂酸盐，铟酸盐，苯甲酸盐，乳酸盐，磷酸盐，苯甲磺酸盐，柠檬酸盐，马来酸盐，延胡索酸盐，琥珀酸盐，酒石酸盐，napsylate 等。

30 “药用上可接受的加酸盐”指保留生物学效力和自由基特征的且与诸如盐酸，氢溴酸，硫酸，硝酸，磷酸等的无机酸和诸如乙酸，丙酸，羟乙酸，丙酮酸，草酸，苹果酸，丙二酸，琥珀酸，马来酸，延胡索酸，

酒石酸，柠檬酸，苯甲酸，肉桂酸，扁桃酸，甲烷磺酸，乙烷磺酸，对苯甲磺酸，水杨酸等的有机酸不是生物学或其他方面不合需要的，形成的那些盐。对于作为前药描述的药用上可接受的加酸盐见 Bundgaard H., 出处同上。

5 “药用上可接受的酯”所指的那些酯在水解酯键时保留生物学效力及羧酸或醇的特性且不是生物学或其他方面不合需要的。对于作为前药描述的药用上可接受的酯见 Bundgaard H. 编辑，前药的设计， Elsevier 科学出版社， Amsterdam (1985)。这些酯典型地从相应的羧酸和醇形成。一般来说，酯形成可经常规合成技术实现。（见，例如， Mach, 有机化学进展，第3版， John Wiley 和 Sons, 纽约 (1985), p. 1157 及其中引用的参考文献， Mark 等，化学技术大全， John Wiley & Sons, 纽约 (1980)）。酯的醇组成一般包括 (i) $C_2 - C_{12}$ 的脂肪族醇，可含有或不含有一个或多个双键且可含有或不含有分枝的碳原子，或 (ii), $C_7 - C_{12}$ 芳香族或杂环芳香族醇。本发明也包含使用是本文所述的酯，同时又是其药用上可接受的加酸盐的那些组合物。

15 “药用上可接受的酰胺”指在水解酰胺键时保留生物学效力及羧酸或胺的特性，且不是生物学或其他方面不合需要的。关于作为前药描述的药用上可接受的酰胺见 Bundgaard, H. 编辑，前药的设计， Elsevier 科学出版社， Amsterdam (1985)。这些酰胺典型地从相应的羧酸和胺形成。一般来说，可经过常规合成技术实现酰胺的形成。（见，例如， March. 有机化学进展，第三版， John Wiley & Sons, 纽约 (1985) p.1152 和 Mark 等、化学技术大全， John Wiley & Sons, 纽约 (1980)）。本发明也包含使用的组合物既是本文所述的酰胺，同时又是其药用上可接受的加酸盐。

25 “药用上或治疗上可接受的载体”指不干扰活性成份的生物学活性效力且对宿主或病人无毒性的载体介质。

“立体异构体”指与另一化合物具有相同分子量，化学组成和结构但具有不同原子排列的化合物。这就是说，某些相同的化学基团在空间上具有不同取向，因此，当纯化时，具有旋转偏振光平面的能力。然而，有些纯化的立体异构体具有轻微的旋光性，用目前的仪器不可检测出来。本发明的化合物可具有一个或更多个不对称碳原子，因此包括各种立体异构体。所有的立体异构体都包括在本发明的范围内。

应用于本发明的组合物的“治疗上或药用上有效的量”指足以诱导所需生物学结果的组合物的量。该结果可以是减轻疾病的症征，症状或病因，或任何其它所需的生物学系统的改变。在本发明中，该结果典型地包含对感染或组织损伤的免疫学和/或炎症反应的减轻。

5 肽中的氨基酸残基缩写如下：苯丙氨酸是 Phe 或 F；亮氨酸是 Leu 或 L；异亮氨酸是 Ile 或 I；甲硫氨酸是 Met 或 M；缬氨酸是 Val 或 V；丝氨酸是 Ser 或 S；脯氨酸是 Pro 或 P；苏氨酸是 Thr 或 T；丙氨酸是 Ala 或 A；酪氨酸是 Tyr 或 Y；组氨酸是 His 或 H；谷氨酰胺是 Gln 或 Q；天冬酰胺是 Asn 或 N；赖氨酸是 Lys 或 K；天冬氨酸是 Asp 或 D；
10 谷氨酸是 Glu 或 E；半胱氨酸是 Cys 或 C；色氨酸是 Trp 或 W；精氨酸是 Arg 或 R；甘氨酸是 Gly 或 G。另外，Bu 是丁氧基，B₂₁ 是苜基，CHA 是环己胺，Ac 是乙酰基，Me 是甲基，Pen 是青霉胺，Aib 是氨基异丁酸，Nva 是正缬氨酸，Abu 是氨基丁酸，Thi 是噻吩丙氨酸，OBn 是邻苜基，hyp 是羟脯氨酸。

15 除了仅由天然存在的氨基酸组成的肽外，还提供了肽模拟物或肽类似物。常用于制药工业的肽类似物是具有类似于模板肽的特征的非肽药物。这类非肽化合物称为“肽模拟物”或“肽的模拟物”（Fauchere, 药品研究进展杂志 15:29 (1986); Veber 和 Freidinger TINS p.392 (1985); Evans 等, 医用化学杂志, 30: 1229 (1987), 本文作为参考文献引用）。
20 在结构上相似于治疗上有用的肽的肽模拟物可用于产生相当的或增强的治疗或预防效果。一般来说，肽模拟物在结构上相似于范例多肽（即，具有生物学或药理活性的多肽），如天然存在的结合受体的多肽，但任选一个或多个肽键被选自 -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-（顺式和反式），-COCH₂-, -CH(OH)CH₂-和 -CH₂SO- 的键经本领域
25 已知的方法取代，它在下列参考文献中有进一步的描述：Spatola, A. F. 氨基酸，肽和蛋白质的化学和生物化学，B. Weinstein 编辑，Marcel Dekker. 纽约，p. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (1983 年 3 月), Vol.1, Issue 3. 肽链修饰（综述）；Morley, 药物科学动态(1980), pp.463-468（综述）；Hudson, D. 等, 国际肽，蛋白质研究杂志, 14: 177-185 (1979) (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola 等, 生命科学 38: 1243-1249 (1986) (-CH₂-S-); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314 (1982) (-CH-CH-, 顺式和反式); Almquist 等, 医用化学杂志, 23:

1392-1398 (1980) (-COCH₂-); Jennings-White 等, Tetrahedron Lett. 23: 2533 (1982) (-COCH₂-); Szelke 等, European Appln. EP 45665 CA(1982); 97: 39405 (1982)(-CH(OH)CH₂-); Holladay 等, Tetrahedron Lett. 24: 4401-4404 (1983) (-CH(OH)CH₂-); 和 Hruby. 生命科学, 31: 189-199
5 (1982) (-CH₂-S-); 本文引用每一篇作为参考文献。特别优选的非肽键是-CH₂NH-。该肽模拟物相对于多肽实施方案具有明显的优势, 包括, 例如: 生产更经济, 化学稳定性更大, 药理特性增强(半寿期, 吸附性, 潜力, 效力等), 特异性改变(例如, 生物学活性的广谱性), 抗原性减小, 和其它。肽模拟物的标记通常涉及将一个或多个标记物直接或通
10 过间隔子(例如, 酰胺基)附着到经定量结构活性数据和/或分子模拟推测的肽模拟物的非干扰位置上。该非干扰性位置一般是与大分子(例如, 免疫球蛋白超家族分子)不形成直接接触的位置, 肽模拟物与该大分子结合后产生治疗效力。肽模拟物的衍变(例如, 标记)应基本上不干扰该肽模拟物所需的生物学或药理学活性。一般来说, 结合受体的肽
15 的肽模拟物以高亲和力结合受体且具有可检测的生物学活性(即, 是对于一个或多个受体介导的表型改变的激动剂或拮抗剂)。

用相同类型的 D - 氨基酸系统取代一个或多个共有序列的氨基酸(例如, 用 D - 赖氨酸代替 L - 赖氨酸)可用于产生更多稳定的肽。另外, 含有共有序列或基本上相同的共有序列变异的限定肽可以本领域
20 已知的方法产生(Rizo 和 Gierasch 生化回顾年鉴, 61: 387 (1992), 本文引用作为参考文献); 例如, 经过加入能形成分子内二硫键使肽环化的内部半胱氨酸残基可产生。

合成的或非天然存在的氨基酸指在天然状态下不存在于体内但可掺入本文所述的肽结构中的氨基酸。优选的合成氨基酸是天然存在的 L
25 - α - 氨基酸的 D - α - 氨基酸以及由通式 H₂NCHR⁵COOH 代表的非天然存在的 D - 和 L - α - 氨基酸, 其中 R⁵ 是 1) 低级烷基, 2) 从 3 到 7 个碳原子的环烷基, 3) 从 3 到 7 个碳原子的杂环且 1 至 2 个杂原子选自氧, 硫和氮, 4) 从 6 到 10 个碳原子的芳香残基, 任选在芳香核上具有选自羟基, 低级烷氧基, 氨基, 羧基的 1 到 3 个取代, 5) 亚烷基
30 基 - Y, 其中亚烷基是从 1 到 7 个碳原子的亚烷基, Y 选自 (a) 羟基, (b) 氨基, (c) 从 3 到 7 个碳原子的环烷基和环亚烷基, (d) 从 6 到 10 个碳原子的芳基, 任选在芳核上具有选自羟基, 低级烷氧基,

氨基和羧基的 1 到 3 个取代, (e) 从 3 到 7 个碳原子的杂环, 且 1 至 2 个杂原子选自氧, 硫和氮, (f) $-C(O)R^2$, 其中 R^2 选自氢, 羟基, 低级烷基, 低级烷氧基, 和 $-NR^3R^4$, 其中 R^3 和 R^4 独立地选自氢和低级烷基, (g) $-S(O)_nR^6$, 其中 n 是从 1 到 2 的整数, R^6 是低级烷基, 前提是 R^5 不限制天然存在的氨基酸的侧链。

其它优选的合成氨基酸包括氨基被超过一个的碳原子与羧基分开的氨基酸, 如 b - 氨基丙酸, g - 氨基丁酸, 等。

作为举例, 特别优选的合成氨基酸包括天然存在的 L - 氨基酸的 D - 氨基酸, L - 1 - 萘基 - 丙氨酸, L - 2 - 萘基丙氨酸, L - 环己烷基丙氨酸, L - 2 - 氨基异丁酸, 甲硫氨酸的亚砷和砷衍生物) 即, $HOOC-(H_2NCH)CH_2CH_2-S(O)_nR^6$, 其中 n 和 R^6 限定如上所述, 以及甲硫氨酸的低级烷氧衍生物, (即, $HOOC-(H_2NCH)CH_2CH_2-OR^6$, 其中 R^6 按上面限定)。

“可检测的标记”指当共价附着于本发明的肽和肽模拟物上时, 允许在已施用该肽或肽模拟物的病人体内检测该肽和肽模拟物的物质。合适的可检测的标记是本领域中熟知的且作为举例, 它包括放射性同位素, 荧光标记 (例如荧光素) 等。具体采用的可检测的标记不是关键的, 且其选择涉及所采用的标记物的量以及在所用的该标记物的量下该标记物的毒性。涉及这些因素的标记物的选择完全在本领域的技术范围内。

可检测的标记物共价附着于该肽或肽模拟物上经过本领域熟知的常规方法实现。例如, 当 ^{125}I 放射性同位素用作可检测的标记物时, ^{125}I 共价附着于肽或肽模拟物上可经过将氨基酸酪氨酸掺入肽或肽模拟物中然后碘化该肽来实现。如果酪氨酸不存在于肽或肽模拟物中, 可用熟知的化学法实现将酪氨酸掺入肽或肽类似物的 N 或 C 末端。同样, ^{32}P 可作为磷酸基团掺入到肽或肽模拟物中, 例如, 通过使用常规化学法掺入到肽或肽类似物的羟基上。

II. 综述

本发明提供了结合并激活 TPO-R 或否则作为 TPO 激动剂发挥作用的化合物。这些化合物包括“榜样” (lead) 肽化合物和“衍生”化合物, 后者限定为与榜样化合物具有相同或相似的分子结构或形状但与榜样化合物的区别在于对水解或蛋白裂解的敏感性和/或其它的生物学

特征，如，对受体的亲和力增加。本发明也提供了包含有效量的 TPO 激动剂的组合物，更具体地说是一种对治疗血液学紊乱，特别是与化疗，放射或骨髓输血相联的血小板减少症有用的化合物。

III. TPO - 激动剂的鉴定

5 对 TPO-R 具有结合亲和力的肽以与亲和力富集过程偶联的随机肽多样性产生系统能较容易地鉴定。

具体地说，随机肽多样性产生系统包括在美国专利号 5,270,170 和 5,338,665 中描述的“在质粒上的肽”系统：1991 年 6 月 20 日申请的美国专利申请系列号 07/718,577（它是 1990 年 6 月 20 日申请的美国专利
10 申请系列号 07/541,108 的部分延续）和在 Cwirla 等，美国科学院学报 87:6378-6382 (1980)中描述的“噬菌体上的肽”系统；在 1994 年 9 月 2 日申请的美国专利申请系列号 08/300,262（它是以 1993 年 10 月 29 日申请的美国专利申请系列号 08/144,775 为基础的部分连续申请）和 PCT WO 95/11,992 中所述的“多核糖体系统”；1993 年 11 月 12 日申
15 请的美国专利申请系列号 08/146,886（它是 1992 年 9 月 16 日申请的美国专利申请系列号 07/946,239 的部分连续申请，而后者又是 1991 年 9 月 18 日申请的美国专利申请系列号 07/762,522 的部分连续申请）中所述的“编码的合成文库 CESL”系统；及在美国专利号 5,143,854；1990 年 12 月 13 日公开的 PCT 专利公开号 90/15,070；1990 年 12 月 6 日申
20 请的美国专利申请系列号 07/624,120；Fodor 等，科学 251:767-773 (2/1991)；Dower 和 Fodor, Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180 (1991), 1991 年 12 月 6 日申请的美国专利申请系列号 805,727 中所述的“极大量固着多聚体合成”系统。

使用上面所述的程序，一般将随机肽设计成在长度上具有限定数目的氨基酸残基（例如，12 个）。为了产生编码随机肽的寡核苷酸集合，
25 使用密码子基序 (NNK)_x 限定从 NNK 基序产生的 32 个可能的密码子中的任意一个，1 代表 12 个氨基酸中的任意一个，2 代表 5 个氨基酸中的任意一个，3 代表 3 个氨基酸中的任一个，且只有 3 个终止密码子中的一个，其中 N 是核苷酸 A, C, G 或 T（等摩尔，根据所用的方法，
30 可使用其它核苷酸），K 是 G 或 T（等摩尔），且 x 是相应于肽中氨基酸数目的整数（例如 12）。因此，NNK 基序编码了全部氨基酸，仅编码一个终止密码子，且减小了密码子偏性 (codon bias)。

在所用的系统中，随机肽作为包含噬菌体 fd 衍生物的 pIII 或 pVIII 外膜蛋白的融合蛋白质的一部分存在于噬菌体颗粒的表面（在噬菌体上的肽）或作为与 LacI 肽融合蛋白质的融合蛋白结合于质粒上（在质粒上的肽）。

5 包含编码该肽的 DNA 的噬菌体或质粒使用固着 TPO-R 经亲和富集过程鉴定并分离。亲和富集过程有时称为“淘选”，包含多轮将噬菌体质粒或多核糖体与固着受体温育，收集结合于受体上的噬菌体，质粒或多核糖体（以及所伴随的 DNA 或 RNA）并产生更多所收集的噬菌体或质粒（以及所伴随的 LacI - 肽融合蛋白）。TPO-R 的细胞外区域
10 （ECD）典型地在淘选期间使用。

经过几轮亲和富集后，经 ELISA 检查噬菌体或质粒及所附的肽以确定该肽是否特异性地结合 TPO-R。以在亲和富集过程中所用的程序相似的程序进行该试验，除了去掉未结合的噬菌体后，先用兔抗噬菌体抗体，然后用碱性磷酸酶（AP）连接的羊抗兔抗体典型地处理孔。用
15 标准方法测定各孔中碱性磷酸酶的量。用于在质粒上的肽系统中的相似的 ELISA 程序在下面详细描述。

经过比较试验孔与对照孔（无受体），可测定融合蛋白质是否特异性地结合于受体上。使用放射性标记的单价受体在以菌落转移探测方式筛选所发现的结合于 TPO-R 上的噬菌体合并液。使用蛋白激酶 A 磷酸
20 化融合到可溶性受体 C 末端的肯普肽序列可生产该探针。然后将 TPO 受体的“改造”形式在宿主细胞，典型地是 CHO 细胞中进行表达。经 PI-PLC 收获该受体后，测验该受体与 TPO 或 TPO-R 特异性的噬菌体克隆的结合。然后用 ³²P 将该受体标记成高比活用作使用菌落转移鉴定高亲和力配体的单价探针。

25 然后作为游离肽（例如、无噬菌体）合成发现特异性地结合受体的肽并在抑制试验中测试。以与 ELISA 相似的方式进行抑制试验，除了在融合蛋白前向孔中加入 TPO 或参考肽（对照孔有 2 类：（1）无受体；（2）无 TPO 或参考肽）。与受体的结合受 TPO 或对照肽抑制的融合蛋白质含有在作为本发明优选的、化合物的随机肽部分中的肽。

30 TPO-R 及其细胞外区域在重组宿主细胞中产生。TPO-R 的一个有用的形式经过使用标准方法在杆状病毒转化的宿主细胞中以可溶蛋白质的形式表达该蛋白质来构建；另一个有用的形式以用于蛋白质分泌和

用于糖磷脂膜锚着附着的信号肽来构建。该锚着附着的形式称为“PIG-尾”。见 Caras 和 Wendell, 科学, 243:1196-1198 (1989), Lin 等, 科学, 249:677-679 (1990)。

5 使用 PIG 尾系统, 可用磷脂酶 C 以表达该受体的细胞表面 (例如, 用细胞分选仪选择高水平表达受体的转化的 CHO 细胞) 裂解该受体。裂解的受体仍包含来自用于膜附着的信号蛋白的羧基末端氨基酸序列, 称为“HPAP 尾”且无需进一步纯化就可固着。重组受体蛋白质可经过用抗-HPAP 尾抗体 (Ab 179 或 Mab 179) 覆盖微滴度平板, 用 PBS 中的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭非特异性结合, 然后将裂解的重
10 组受体结合到抗体上来固着。使用该程序时, 应以不同浓度的受体进行固着反应以确定用于给定制品的最佳量, 因为重组蛋白的不同制品常含不同量的所需蛋白质。另外, 在亲和富集过程中应确保固着抗体完全被封闭 (用 PTO 或一些其它的封闭化合物)。否则, 未封闭的抗体在亲和富集程序中可结合所需的噬菌体。可使用与固着抗体结合的肽以封闭
15 受体固着后剩余的未结合位点来避免该问题或可简单地将受体直接固着于微滴度平板的孔中, 无需借助于固着抗体。见 1992 年 9 月 18 日中请的美国专利申请系列号 07/947,339, 本文引用作为参考文献。

20 当使用允许多价配体-受体相互作用的随机肽产生系统时, 应认识到固着受体的密度在测定能结合固着受体的配体的亲和力中是重要因素。受体密度越高 (例如, 用 0.25 至 0.5mg 受体处理每个用抗受体的抗体覆盖的孔), 与较低的受体密度 (例如, 用 0.5 至 1ng 受体处理每个用抗受体的抗体覆盖的孔) 相比发生多价结合的可能性更大。如果发生多价结合, 那么分离具有相对较低亲和力的配体的可能性越大, 否则将使用高密度的固着受体来鉴定榜样化合物并使用较低的受体密度来
25 分离更高亲和力的衍生化合物。

为了辨别更高亲和力的肽, 常使用单价受体探针。使用蛋白激酶 A 磷酸化融合到可溶性受体 C 端的肯普肽序列可生产该探针。然后在宿主细胞, 典型地是 CHO 细胞中表达 TPO 受体的“改造”形式。经 PI-PLC 收获受体后, 试验该受体与 TPO 或 TPO-R 特异性的噬菌体克隆的结
30 合。然后用 ^{32}P 将该受体标记成高比活以用作单价探针来使用菌落转移鉴定高亲和力的配体。

帮助鉴定结合 TPO-R 的肽的优选的筛选方法包含首先鉴定结合受

体细胞外区域的榜样肽，然后制备类似于榜样肽的其它肽。具体地说，使用在噬菌体上的基于 pIII 或 pVIII 的肽系统，可筛选随机文库以发现存在结合 TPO-R 的肽的噬菌体。测序噬菌体 DNA 以确定在噬菌体表面的肽。

- 5 从随机线型 10 聚体 pVIII 文库和随机环状 10 聚体和 12 聚体 pVIII 文库鉴定能特异性结合 TPO-R 的克隆。这些肽的序列用作构建其它肽文库的基础该文库设计成含高频率的开始鉴定的肽的衍生物。可合成这些文库以帮助生产与结合肽仅有几个残基区别的肽。这一方案包括合成具有结合肽编码序列的寡核苷酸，除了在合成中不使用四种核苷三磷酸中的每一种的纯制品，而使用四种核苷三磷酸的混合物（即，55%的“正确”核苷酸及其它三种核苷酸各 15%是用于该目的的优选的混合物，10 70%的“正确”核苷酸及其它三种核苷酸各 10%是用于该目的的另一优选的混合物）以产生编码该结合肽的序列的衍生物。

使用各种方法经过制备“基序诱变”文库来衍变榜样肽。这些包括 15 pVIII 噬菌粒诱变文库，该文库以 70:10:10:10 频率诱变的共有序列为基础，用随机残基在各末端延伸以产生包括序列 XXXX (C, S, P 或 R) TLREWL XXXXX X(C 或 S) 的克隆。使用在质粒上的肽系统构建相似的延伸/诱变文库以产生包括序列 XXXXX (C, S, P 或 R) TLREWL XXXXXXXX 的克隆。使用多核糖体演示系统构建另一延伸/诱变文库，20 XXXX (C, S, P 或 R) TLREWL XXXXXXXX (C 或 S)。用肽洗脱筛选所有这三个文库并用放射性标记的单价受体探测。

“在质粒上的肽”技术也用于肽筛选和诱变研究并在美国专利号 5,338,665 中有更详细的描述，本文引用该文献作为参考文献用于各种目的。根据本方法，通过从携带融合基因的质粒载体进行表达将随机肽 25 融合到 LacI 的 C 末端。LacI-肽融合物与其编码的 DNA 的连接经过在质粒上的 LacO 序列进行，形成稳定的肽 - LacI - 质粒复合物，它能在固着受体上经亲和纯化（淘选）进行筛选。然后以电穿孔将由此分离的质粒重新导入大肠杆菌中以扩增用于另一轮筛选或用于单个克隆检查的选定群体。

30 另外，使用修饰的 C - 端 Lac-I 演示系统进行筛选和诱变研究，其中演示效价减小（“头状二聚体”演示系统）。筛选该文库，并将所得的 DNA 插入片段作为一个集合克隆进麦芽糖结合蛋白（MBP）载体中

使其作为 C 端融合蛋白表达。然后按上面所讨论的，以 ELISA 方式分析随机挑选的单个 MBP 融合克隆的粗制细胞裂解产物的 TPO-R 结合。

5 使用多核糖体显示系统也进行了肽诱变研究，如在 1994 年 9 月 2 日申请的共同未决申请美国专利申请系列号 08/300,262（它是以 1993 年 10 月 29 日申请的美国专利申请系列号 08/144,775 为基础的部分连续申请）和 PCT WO 95/11,992 中所述，本文引用其每一篇作为参考文献用于各种目的。根据序列 XXX X(C, P, R 或 S)tlrefl XXXXXX(C 或 S)构建诱变文库，其中 X 代表随机 NNH 密码子，小写字母代表在
10 位置 1 和 2 含 70:10:10:10 诱变，在密码子位置 3 是 K（G 或 T）的氨基酸密码子。用固着在磁珠上的 TPO 受体淘选该文库 5 轮。第 5 轮后，将 PCR 扩增库克隆进 pAFF6 且测序 ELISA 阳性克隆。将该序列亚克隆进 MBP 载体，经 MBP ELISA 测定其结合亲和力。

15 为了固着用于多核糖体筛选的 TPO-R，按厂家所述首先将 Ab 179 化学连接到甲苯磺酰激活的磁珠（可从 Dynal Corporation 获得）。用在 0.5M 硼酸缓冲液（pH9.5）中的抗体在室温下保温磁珠过夜。洗涤磁珠并与含 TPO-R 的“HPAP”尾结合。将抗体覆盖的磁珠和受体在 4℃培养 1 小时，在加入多核糖体文库前再次洗涤磁珠。

20 按上面所述筛选各文库产生的 TPO 受体结合肽在下面表 1 和 2 中显示，其它未在本文中列出。

表 1

肽												
R E G P T L R Q W M												
R E G P T L R Q W M												
S R G M T L R E W L												
E G P T L R G W L A												
R E G Q T L K E W L												
E R G P F W A K A C												
R E G P R C V M W M												
C S G L T L R E W L V C												
C L T G P F V T Q W L Y E C												
C G E G L T L T Q W L E H C												
C R A G P T L L E W L T L C												
C R A G P T L L E W L T L C												
C R Q G P T L T A W L L E C												
C A D G P T L R E W I S F C												
C E L V G P S L M S W L T C												
C G T E G P T L S T W L D C												
C D Q L G V T L S R W L E C												
S G T G L T L R E W L G S F S L L S												
C P E G P T L L Q W L K R G Y S S C												
R G D G P T L S Q W L Y S L M I M C												
M V A G P T L R E F I A S L P I H C												
S M Q G P T F R E W V S M M K V L C												
S V Q C G P T L R Q W L A A R N H L S												
G N A D G P T L R Q W L E G R R P K N												
S V R C G P T L R Q W L A A R T H L S												
L A I E G P T L R Q W L H G N G R D T												
H G R V G P T L R E W K T Q V A T K K												
C A D G P T L R E W I S F C												
I S D G P T L K E W L S V T R G A S												

5

S	I	E	G	P	T	L	R	E	W	L	T	S	R	T	P	H	S	
T	I	K	G	P	T	L	R	Q	W	L	K	S	R	E	H	T	S	
G	N	A	D	G	P	T	L	R	Q	W	L	E	G	R	R	P	K	N
S	I	E	G	P	T	L	R	E	W	L	T	S	R	T	P	H	S	
I	S	D	G	P	T	L	K	E	W	L	S	V	T	R	G	A	S	

表 2

10

肽																	
C	S	L	E	D	L	R	K	R	C								
C	R	R	S	E	L	L	E	R	C								
C	T	F	K	Q	F	L	D	G	C								
C	T	R	G	E	W	L	R	C	C								
C	T	L	R	Q	W	L	Q	G	C								
C	T	L	E	E	L	R	A	C	C								
C	T	R	E	E	L	M	R	L	C								
C	Q	R	A	D	L	I	N	F	C								
C	N	R	N	D	L	L	L	F	C								
C	T	R	T	E	W	L	H	G	C								
C	T	L	E	F	M	N	G	C									
C	S	L	G	E	L	R	R	L	C								
C	N	I	N	Q	L	R	S	I	C								
C	T	M	R	Q	F	L	V	C	C								
C	T	R	S	E	W	L	E	R	C								
C	T	L	H	E	Y	L	S	G	C								
C	T	R	E	E	L	L	R	Q	C								
C	T	F	R	E	F	V	N	G	C								
C	S	R	A	D	F	L	A	A	C								
C	S	C	A	Q	V	V	Q	C	C								
C	T	L	R	Q	W	I	L	L	G	M	C						

CTLREWLHGGFC
CTLRRAWLMSETC
CTLRRAWLMESCC
CTFQVWKLARNC
CLLREWLDXRTC
CVLREWLLXXSC
CLLSEFLAGQQC
CSLRQYLD FGLGSC
CTLQELKQSSLYEC
CDLSELKTHGYAYC
CKLSDWLMNGVAAC
CSLQEF LSHGGYVC
CSLKEFLHSGLMQC
CTFRQLLEYGVSSC
CTMREFLVASGVAC
CTLAEF L ASGVEQC
CTLAEF L ASGVEQC
CTLKEWLVSHEVWC
CTLREF L SLGMNAC
CTLREF L DPTTAVC
CSLLEFLALGVALC
GGGRGCTLKQWKQGD CGRS
CNRSQLLAAC
CTLQQWLSGC
CTLREFKAGC
CTRAQFLKGC
CTLREFNRGC
CTLSDFKRG C
CTFRQWKEAC
CTLSEFRGGC
CTLQEFLEGC
CTLQQWKDGC

CTRSQWLEGC
CSLQEFKHGC
CTLGEWK RGC
CTLWGCGKRGC
CTLQEW RGGC
CTRLSGCWLC
CTRTQWLLDC
CTLAEFR RGC
CTSTQWLLAC
CSRSQFLRSC
CTLREWLEGC
CTLREFLLMGAC
CTLKEWLLWSSC
CTLLEWLRNPVC
CTLRQWLGDAWC
CTLGQWLQMGMC
CTLREWVFAGLC
CLLLEFLSGADC
CTLGEFLAGHLC
CRLREFLVDLTC
CSFRSWLV DQTC
CTLREWLEDLGC
CTLQDWLVSWTC
CTLSEWLS ELS C
CTLMQWLG GWPC
CTLREWLS YGTC
CTLQEWLSGGLC
GSHGCTLREWLCMKIVPC
QWQGCTLRDCILRGV FWS
SVNSCTLREFLTGCRVFC
SYDGCTLRHWLMDIYGDC
Q RSGCTLRDWVLLNCLAS

	N Y R G C T L S Q W V S E Q I V G C
	G R S G C T L R E Y L G G M C Y L S
	A S W Y C T V P E L M E M Q L P E C
5	G S T G C T L R E X L H M L G L D C
	A C E G C T L R Q W L E Y V R V G C
	A Q R G C T L Q Y F V S Y G X D M C
	G V C G C T L R E F L A I P H T S C
	S E G G C T L R E W V A S S L A N C
10	S N S R C T L R E W I I Q G C D F S
	S N S R C T L R E W I I Q G C D F S
	C L G C T L S Q W R K R T R C D T H
	Y R G C S R A Q L L G G E C R K K
	G R G C T L K Q W K Q G D C G R S
15	V R G G C A L R D W V A G E C F D W T
	L W R G C T L N G F K S R H C G S P E
	C T L R S W K H R G C A P
	G R G C T R A Q W L A G C C T G H
	R A G C T L R E F R K G C L A L
20	K R G C T L A E M I R G C N R S N
	G R G C T L K Q W K Q G D C G R S
	R W R G C S L A K L K K G A A C G R G
	R G G C T L R E W R R V R V I N
	G R G C T L K Q W K Q G D C G R S
25	R Y G C T R H Q W L V G T C V R H

一些其它有代表性的肽的 IC_{50} 值在下表中给出。可使用各种方法来评价 IC_{50} 值。例如，使用 MBP-TPO 或 lacI-肽示踪物的平衡结合 ELISA 试验来测定该肽是否抑制 TPO 与 TPO 受体的细胞外区域的结合。典型地是，使用自由肽测定 IC_{50} 值。使用任选可 C 端酰胺化或可作为酯或其它羧基酰胺制备的自由肽可测定 IC_{50} 值。

为了再创造在噬菌体上出现的精确序列，在合成肽的 N 端和 C 端

氨基酸前常加上一个或两个甘氨酸残基。据信这些甘氨酸对结合或活性不是必须的。同样，为模拟在多核糖体上出现的肽的精确序列，常在合成肽的 C 端氨基酸之前加上序列 MAS。据信该序列对结合或活性也不是必须的。

- 5 IC_{50} 值用符号 “-”， “+” 和 “++” 来表示。例如，显示 IC_{50} 值超过 $200\mu M$ 的那些肽表示为 “-”。 IC_{50} 值小于或等于 $200\mu M$ 的那些肽表示为 “+”， 产生 IC_{50} 值为 $500nm$ 或更小的那些肽表示为 “++”。 产生的 IC_{50} 值位于或靠近特定符号的临界点的那些肽用杂合标记、例如 “+/-” 表示。 IC_{50} 值检测不到的那些肽列为 “N.D”。 具有
- 10 结构 GGCTLREWLHGGFCGG 的肽的 IC_{50} 值为 $500nm$ 或更小。（注意在 N 端和 C 端氨基酸前加两个甘氨酸以再产生由噬菌体显示的精确序列。据信这些甘氨酸对结合或活性不是必须的）。

表 3

15

肽	亲和力
G G C A D G P T L R E W I S F C G G	++
G N A D G P T L R Q W L E G R R P K N	++
G G C A D G P T L R E W I S F C G G K	++
20 T I K G P T L R Q W L K S R E H T S	++
G P T L R Q W L	-
L A I E G P T L R Q W L H G N G R D T	++
S I E G P T L R E W L T S R T P H S	++

25

上述表格，特别是在表 3 中说明了优选的核心肽包含氨基酸序列 $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7$ ，其中， X_1 是 C, L, M, P, Q, V; X_2 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X_3 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W; X_4 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X_5 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y; X_6 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X_7 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。

30

在优选的实施方案中，核心肽包含氨基酸序列 $X_8 G X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 W X_7$ ，其中， X_1 是 L, M, P, Q 或 V; X_2 是 F, R, S 或 T; X_3 是 F, L, V, 或

W; X₄ 是 A, K, L, M, R, S, V 或 T; X₅ 是 A, E, G, K, M, Q, R, S 或 T; X₇ 是 C, I, K, L, M 或 V; 且每个 X₈ 残基独立地选自 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个, 其立体异构体 D - 氨基酸和非天然氨基酸。优选的是, 各 X₈ 残基独立地选自 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个及其立体异构体 D - 氨基酸。在一个优选的实施方案中, X₁ 是 P, X₂ 是 T; X₃ 是 L; X₄ 是 R; X₅ 是 E 或 Q; X₇ 是 I 或 L。

更优选的是, 核心肽包含氨基酸序列 X₉ X₈ G X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ W X₇, 其中 X₉ 是 A, C, E, G, I, L, M, P, R, Q, S, T 或 V; X₈ 是 A, C, D, E, K, L, Q, R, S, T 或 V。更优选的是, X₉ 是 A 或 I; X₈ 是 D, E 或 K。

10 特别优选的肽包括: GGCADGPTLREWISFCGG; GNA DGPTLRQWLEGRRPKN; GGCADGPTLREWISFCGG K; TIKGPTLRQWLKSREHTS; SIEGPTLREWLTSTRTP HS; LAIEGPTLRQWLHGNGRDT; CADGPTLREWISF C; 和 IEGPTLRQWLAARA。

15 本发明的另一实施方案中, 用于本发明的优选的肽包括具有包含氨基酸序列 CX₂X₃X₄X₅X₆X₇ 的核心结构的肽; 其中 X₂ 是 K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S 或 V; X₄ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X₅ 是 A, D, E, G, S, V 或 Y; X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V。在一个更优选的实施方案中, 20 X₄ 是 A, E, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T 或 W。在另一实施方案中, X₂ 是 S 或 T; X₃ 是 L 或 R; X₄ 是 R; X₅ 是 D, E 或 G; X₆ 是 F, L, 或 W; X₇ 是 I, K, L, R 或 V。特别优选的肽包括: GGCTLREWHLHG GFCGG。

25 在另一实施方案中, 用于本发明的优选的肽包括具有包含氨基酸序列 X₈CX₂X₃X₄X₅X₆X₇ 的结构, 其中 X₂ 是 F, K, L, N, Q, R, S, T 或 V; X₃ 是 C, F, I, L, M, R, S, V 或 W; X₄ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个; X₅ 是 A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V 或 Y; X₆ 是 C, F, G, L, M, S, V, W 或 Y; X₇ 是 C, G, I, K, L, M, N, R 或 V; X₈ 是 20 个遗传编码的 L - 氨基酸中的任意一个。在一些实施方案中, X₈ 优选是 G, S, Y 或 30 R。

具有 IC₅₀ 大于大约 100 μ M 的肽和肽模拟物缺乏允许用于本发明的诊断或治疗方面的足够结合力。优选的是, 对于诊断目的, 肽和肽模拟

物 IC₅₀ 大约为 2mM 或更少，对于药用目的，肽和肽模拟物 IC₅₀ 为大约 100μM 或更少。

5 结合的肽序列也提供了测定本发明的结合 TPOR 的化合物的最小大小。使用“编码的合成文库”（ESL）系统或“极大量固着多聚体合成”系统不仅可测定具有该活性的肽的最小大小，也可制备所有形成与优选的基序（或该基序的最小大小）有一个，2 个或多个残基区别的肽组中的肽。然后可筛选该肽的集合与 TPO - 受体结合的能力。这些固着多聚体合成系统或其它肽合成方法也可用于合成截短的类似物，缺失类似物，取代类似物及本发明的所有肽化合物的组合。

10 本发明的肽和肽模拟物也在血小板生成素依赖型细胞增殖试验中进行了评价，如在下面实施例 2 中进行了更详细的描述。用本领域已知的技术测量细胞增殖，如与 ³H - 胸苷掺入作细胞增殖指示相关的 MTT 试验（见 Mossmann，免疫学方法杂志，65: 55 (1983)）。试验的肽以剂量依赖性方式刺激 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞的增殖，如图 1A 所示。
15 这些肽对亲代细胞系无影响，如图 1B 所示。

图 7 至 9 显示了评价本发明的肽和肽模拟物的活性的进一步试验的结果。在该试验中，用 carboplatin 制备血小板减少症的小鼠。图 7 描绘了在第 0 天用 carboplatin（125mg/kg, 腹膜内）处理 Balb/C 小鼠时的典型结果。虚线代表三个实验中未处理的动物。实线代表在三个实验中
20 carboplatin 处理的组。粗实线代表以前的数据。图 8 描绘了用所示量的 carboplatin（mg/kg, 在第 0 天腹膜内(ip)注射)处理的小鼠中 carboplatin 滴定对血小板计数的影响。图 9 描绘了用肽 AF12513（513）在第 10 天对 carboplatin 诱导的血小板减少症的改善。在第 0 天施用 carboplatin（CBP; 50-125mg/kg, 腹膜内注射）。在第 1 - 9 天施用 AF 12513
25（1mg/kg, ip）。这些结果显示了本发明的肽能改善小鼠模型中的血小板减少症。

另外，本发明的某些肽可二聚体化或寡聚体化，从而增加该化合物的亲和力和/或活性。为了研究肽二聚体化/寡聚化对细胞增殖试验中 TPO 模拟潜力的影响，合成了肽 GGCADGPTLREWISFCGG
30 的 C 端生物素化类似物（GGCADGPTLREWISFCGGK(生物素)）。用在无血清的 HEPES 缓冲的 RPMI 中的链霉抗生素蛋白以 4:1 的摩尔比预培养该肽。试验该复合物对 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞的细胞

增殖的刺激, 如上所述, 对游离的生物素标记的肽和未用生物素标记的亲本肽进行平行实验。图 2A 显示了对转染的和亲本细胞系, 复合的生物素标记的肽 (具有链霉抗生物素蛋白(SA)的 AF12885) 的试验结果。图 2B 显示了对转染的和亲本细胞系, 游离的生物素标记的肽 (AF12285) 的试验结果。图 2C 显示了对转染的和亲本细胞系, 链霉抗生物素蛋白单独试验的结果。这些附图说明了预先形成的复合物的效力大约是自由肽的 10 倍。

经过研究肽对促红细胞生成素受体 (EPO-R) 的交叉反应性也检查了本发明的肽的结合特异性和活性。EPO-R 与 TPO-R 一样, 也是血细胞生成素生长因子受体家族的一个成员。在使用 EPO - 依赖型细胞系的细胞增殖试验中检查了本发明的肽, 以及 TPO, EPO 和已知的 EPO 结合肽。该试验利用了 FDCP-1, 一种生长因子依赖型鼠多潜能原始造血祖先细胞系 (见, 例如, Dexter 等, 实验方法杂志, 152: 1036-1047 (1981)) 作为亲代细胞系。当补充 WEHI-3-条件培养基 (含 IL-3, ATCC 号 T1B68 的培养基) 时, 该细胞系能增殖, 但不能分化。用人或鼠 EPO-R 转染亲代细胞系以产生 FDCP-1-EPO-R 细胞系。在人或鼠 EPO 存在的条件下, 这些转染的细胞系能增殖, 但不能分化。

在必需生长因子存在下细胞生长到半静止期密度。然后将细胞在 PBS 中洗涤, 并在无生长因子的全培养基中饥饿 16 - 24 小时。测定细胞的存活力后, 制备贮液 (在无生长因子的全培养基中) 以产生每 50 微升 10^5 个细胞的溶液。在 96 孔组织培养平板中以每孔 50 μ l 的终体积制备待测化合物的系列稀释液 (典型地是, 相对于结合相或其它结合或固着肽的游离溶液相肽)。向各孔中加入细胞 (50 μ l), 细胞培养 24 - 48 小时, 此时阴性对照死亡或休眠。然后用本领域已知的技术, 如 MTT 试验测量细胞增殖。

图 3A-G 显示了一系列对照实验的结果; 显示了 TPO, 本发明的肽, EPO 和 EPO-R 结合肽在使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系及其相应的亲代细胞系, 或 EPO 依赖型细胞系及其相应的亲代细胞系的细胞增殖试验中的活性。图 3A 描述了 TPO 在使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系及其相应的亲代细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3B 描述了 EPO 在使用 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系及其相应的亲代细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3C 描述了复合的生物素标记的肽 (具有链霉抗生物素蛋白(SA)

的 AF12285) 和生物素标记的 EPO-R 结合的肽的复合形式 (具有 SA 的 AF11505) 在 TPO-R 转染的 Ba/F₃ 细胞系中的结果。相应的亲代细胞系的结果在图 3D 中显示。图 3E 描述了 TPO 在使用 EPO 依赖型细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3F 描述了 EPO 在使用 EPO 依赖性细胞系的细胞增殖试验中的结果。图 3G 描述了复合的生物素标记的肽(具有链霉抗生物素蛋白(SA)的 AF12285) 和生物素标记的 EPO-R 结合肽的复合形式 (具有 SA 的 AF11505) 在 EPO - 依赖性细胞系中的结果。这些结果表明本发明的肽以高度特异性结合并激活 TPO-R。

IV. 肽和肽模拟物的制备

10 A. 固相合成

本发明的肽可用本领域已知的经典方法, 例如, 经过使用标准固相技术来制备。标准方法包括专一固相合成, 部分固相合成方法, 片段浓缩, 经典溶液合成, 甚至使用重组 DNA 技术。见, 例如, Merrifield, 美国化学学会杂志, 85: 2149 (1963), 本文作为参考文献引用。在固相上, 使用 α - 氨基保护的树脂典型地从肽的 C 末端开始合成。可制备合适的起始物质, 例如, 经过将所需的 α - 氨基附着到氯甲基化的树脂, 羟甲基树脂或二苯甲基胺树脂上。一种这类氯甲基化树脂是由 Bio Rad 实验室, Richmond, CA 以商品名 BIO-BEAPS SX-1 提供的固体, 羟甲基树脂的制备由 Bodonszky 等, Chem. Ind. (伦敦) 38: 1597 (1966) 15 所述。二苯甲基胺 (BHA) 树脂由 Pietta 和 Marshall Chem. Commn. 650 (1970)描述且可从 Beckman Instrument, Inc., Palo Alto, CA 以盐酸形式买到。

因此, 根据 Gisin Helv. Chim. Acta: 56:1467 (1973) 所述的方法借助于, 例如碳酸氢铯催化剂将 α - 氨基保护的氨基酸偶联到氯甲基化树脂上可制备本发明的化合物。开始偶联后, 经过选择在有机溶剂中的包括三氟乙酸 (TFA) 或盐酸 (HCl) 溶液的试剂在室温下去掉 α - 氨基保护的基团。 25

α 氨基保护基团是已知在肽的合成步骤领域中有用的那些基团。包括酰基类保护基团 (例如, 甲酰基, 三氟乙酰基, 乙酰基), 芳香族尿烷类保护基团 (例如, 苄氧羰基(cbz)和取代的 cbz), 脂肪族尿烷保护基团 (例如, t-丁氧基羰基(Boc), 异丙氧基羰基, 环己氧基羰基) 和烷基型保护基团 (例如, 苄基, 三苯基甲基)。 Boc 和 Fmoc 是优选 30

的保护基团。侧链保护基团在偶联期间保持完整，且在氨基末端保护基团去保护期间或偶联期间不被裂解。在完成最终肽合成时，在不改变靶肽的反应条件下侧链保护基团应可去掉。

Tyr 的侧链保护基团包括四氢吡喃基，叔丁基，三苯甲氧基，苄基，
5 Cbz, Z-Br-Cbz, 和 2, 5 - 二氯苄基。 Asp 的侧链保护基团包括苄基 2, 6 - 二氯苄基，甲基，乙基和环己烷基。 Thr 和 Ser 的侧链保护基团包括乙酰基，苯甲酰基，三苯甲氧基，四氢吡喃基，苄基， 2, 6 - 二氯苄基和 Cbz。 Thr 和 Ser 的侧链保护基团是苄基。 Arg 的侧链保护基团包括硝基，甲苯磺酰基(Tos), Cbz, 金刚烷氧基羰基，苯磺酰基(Mts)或
10 Boc。 Lys 的侧链保护基团包括 Cbz, 2 - 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Cbz), 2 - 溴苄氧基羰基 (2 - BrCbz), Tos 或 Boc。

去掉 α - 氨基保护基后，剩余的保护氨基以所需的顺序分步偶联。过量的各种保护的氨基酸一般在溶液，例如，在二氯甲烷 (CH_2Cl_2)，二甲基甲酰胺 (DMF) 的混合物中与合适的羧基激活剂，如二环己烷
15 基碳化二亚胺 (DCC) 使用。

完成所需的氨基酸序列后，经过用诸如三氟乙酸或氟化氢 (HF) 的试剂处理从树脂支持物上裂解下所需的肽，所用的试剂不仅从树脂上裂解下肽，而且还裂解所有剩余的侧链保护基团。当使用氯甲基化的树脂时，氟化氢处理导致形成游离的肽酸。当使用二苯甲基胺树脂时，氟
20 化氢处理直接产生游离的肽酰胺。另外，当使用氟甲基化树脂是，经过用氟处理肽树脂可裂解侧链保护的肽以产生所需侧链保护的酰胺或用烷基胺处理产生侧链保护的烷基酰胺或二烷基酰胺。然后经过用氟化氢处理以通常的方式去掉侧链保护以产生自由酰胺，烷基酰胺或二烷基酰胺。

25 这些固相肽合成程序在本领域中是熟知的且在 Stewart 的固相肽合成 (Freeman 和 Co., San Francisco, (1969)) 中有进一步的描述。

使用在 1990 年 3 月 7 日申请的美国专利申请系列号 07/492,462; 1990 年 12 月 6 日申请的 07/624,120 ; 和 1991 年 12 月 6 日申请的 07/805,727 中描述的“编码的合成文库”或极大量固着多聚体合成”系
30 统; 不仅可测定具有该活性的肽的最小大小，还能制备形成与优选的基序 (或该基序的最小大小) 具有一个，二个或多个残基区别的肽组的所有肽。然后可筛选该肽

的集合中结合 TPO-R 的能力。也可使用固着多聚体合成系统或其它的肽合成方法以合成本发明的所有肽化合物的截短类似物，缺失类似物和截短及缺失组合的类似物。

B. 合成的氨基酸

- 5 也可使用这些程序合成这样一类肽，其中在本发明的任一化合物的一个，二个或多个位置被不同于 20 个天然存在的，遗传编码的氨基酸的其它氨基酸取代。例如，萘基丙氨酸可取代色氨酸，有利于合成。可取代进本发明的肽中的其它合成氨基酸包括 L-羟丙基，L-3,4-二羟基苯丙氨酰基，d 氨基酸，如 L-d-羟基赖氨酰基和 D-d-甲基丙氨酰基，L- α -甲基丙氨酰基，b 氨基酸和异喹啉基。D 氨基酸和 10 非天然存在的合成氨基酸也可掺入本发明的肽中。

- 可用其它侧链取代 20 种遗传编码的氨基酸（或 D 氨基酸）的天然存在的侧链，例如，所用的基团有：烷基，低级烷基，环状 4-, 5-, 6-至 15 7 数的烷基，酰胺，酰胺低级烷基，酰胺二（低级烷基），低级烷氧基，羟基，羧基及其低级酯衍生物，和具有 4-, 5-, 6-, 到 7 个原子数的杂环。特别是可使用脯氨酸类似物，其中脯氨酸残基的环大小从 5 个变成 4, 6 或 7 个原子数。环状基团可以是饱和的或不饱和的，且如果是不饱和的，可以是芳香族或非芳香族的。

- 环状基团可以是饱和的或非饱和的，且如果是非饱和的，可以是芳香族的或非芳香族的。杂环基团优选含有一个或多个氮，氧和/或硫杂原子。该基团的例子包括 furazanyl，咪喃基，咪唑烷基，咪唑基，咪唑啉基，异噻唑基，异噁唑基，吗啉基（例如，吗啉代），噁唑基，哌嗪基（例如，1-哌嗪基），哌啶基（例如，1-哌啶基，哌啶子基），吡喃基，吡嗪基，吡唑烷基，吡啶啉基，吡唑基，哒嗪基，吡啶基，嘧啶基，吡咯烷基（例如 1-吡咯烷基），吡咯啉基，吡咯基，噻二唑基，噻唑基，噻吩基，硫吗啉基（例如，硫吗啉代），和三唑基。这些杂环基团可以是取代的或未取代的。如果该基团是取代的，取代基可以是烷基，烷氧基，卤素，氧或取代的或未取代的苯基。

- 经磷酸化也可较容易地修饰本发明的肽，制备本发明的化合物的肽 30 衍生物的方法在 Hruby 等中描述。因此，本发明的肽化合物也用作制备具有相似生物学活性的肽模拟物的基础。

包括太模拟物的本发明的肽化合物可共价修饰到一个或多个各种

非蛋白质类多聚体上，例如，聚乙二醇，聚丙二醇或聚氧链烯烃上，修饰方式在美国专利号 4,640,835；美国专利号 4,496,689；美国专利号 4,301,144；美国专利号 4,670,417；美国专利号 4,791,192，或美国专利号 4,179,337 中阐述，本文以参考文献引用这些文献的全文。

5 C. 末端修饰

本领域的技术人员认识到可获得各种技术用于构建与相应的肽化合物具有相同或相似的所需生物学活性但在可溶性，稳定性和对水解及蛋白裂解的敏感性方面具有更合适的活性的肽模拟物。例如，见 Morgan 和 Gainor, *Ann. Rep. Med Chem.* 24:243-252 (1989)。下面描述了用于制备在
10 N 端氨基，C 端羧基修饰的，和/或将肽中的一个或多个酰胺键改变成非酰胺键的肽模拟物的方法。应明白 2 个或多个这类修饰可偶联于一个肽模拟结构中（例如，在 C 端羧基的修饰且包含在该肽的两个氨基酸之间有一个 $-\text{CH}_2-$ 氨基甲酸酯键。

1. N 端修饰

15 典型地是，以游离酸的形式合成肽，但如上所述以酰胺或酯的形式也能较容易地制备肽。也可修饰本发明的肽化合物的氨基和/或羧基末端以生产本发明的其它化合物。氨基末端修饰包括甲基化（即， $-\text{NHCH}_3$ 或 $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ 。乙酰基化，加入苄氧羰基，或用含 $\text{RCOO}-$ 限定的羧基化官能团的封闭基团封闭氨基末端，其中 R 选自萘基，吡啶基，甾族基
20 和相似基团。羧基末端修饰包括用羧酰胺基取代游离酸或在羧基末端形成环内酰胺以导入结构限制。

氨基末端修饰如上所述且包括烷基化，乙酰基化，加上苄氧羰基，形成琥珀酰亚胺等。具体地说，N-端氨基可按如下反应：

（a）.为了形式通式 $\text{RC}(\text{O})\text{NH}-$ 的酰胺基，其中 R 限定如上，经过
25 与酰基卤[例如， $\text{RC}(\text{O})\text{Cl}$] 或酸酐进行反应。典型的是，经过将大约等摩尔或过量（例如，大约 5 当量）的酸酐与惰性稀释剂（例如，二氯甲烷）中的肽接触进行反应，优选含过量（例如，大约 10 当量）的叔胺，如二异丙基乙胺以清除反应期间产生的酸。另外，反应条件是常规的（例如，室温 30 分钟）。将末端氨基烷基化以提供低级烷基 N-取代，接着
30 与上面所述的酸酐反应，以提供通式 $\text{RC}(\text{O})\text{NR}-$ 的 N-烷基酰胺基。

（b）.与琥珀酸酐反应形成琥珀酰亚胺。与前面一样，可使用大约等摩尔量或过量的琥珀酸酐（例如，大约 5 当量），用本领域熟知的

方法将氨基转变成琥珀酰亚胺，包括使用过量（如，10当量）的叔胺，如在合适的惰性溶剂（例如，二氯甲烷）中的二异丙基乙胺。例如，见 Wollenberg 等，美国专利号 4,612,132，本文引用其全文作为参考文献。应明白可用例如，以常规方式制备的 C₂ - C₆ 烷或 -SR 取代基取代琥珀

5 酸基以提供在肽的 N 端的取代的琥珀酰亚胺。以 Wollenberg 等，出处同上，所述的方式经过将低级烯烃（C₂ - C₆）与马来酸酐反应制备该烷基取代，经过将 RSH 与马来酸酐反应制备 -SR 取代基，其中 R 限定如上；

（c）. 经过与存在于合适的惰性稀释剂（例如，二氯甲烷）中的大约等当量或过量的 CBZ-Cl（即苄氧羰基氯）或取代的 CBZ-Cl 反应

10 形成苄氧羰基-NH-或取代的苄氧羰基-NH-，优选含有叔胺以清除反应中产生的酸；

（d）. 经过与在合适的惰性稀释剂（二氯甲烷）中的等量或过量（例如，5当量）的 R-S(O)₂Cl 反应形成氨磺酰基，将末端胺转变成氨

15 磺酰，其中 R 如上面所限定。优选的是，惰性稀释剂含过量叔胺（例如，10当量）如二异丙基乙胺以清除反应期间产生的酸。另外，反应条件是常规的（例如，室温下 30 分钟）；

（e）. 经过与在合适的惰性稀释剂（例如，二氯甲烷）中的等量或过量（例如，5当量）的 R-OC(O)Cl 或 R-OC(O)OC₆H₄-P-NO₂ 反应形

20 成氨基甲酸酯，将末端胺转变成氨基甲酸酯，其中 R 限定如上。优选的是，惰性稀释剂含过量（例如，大约 10 当量）叔胺，如二异丙基乙胺，以清除反应过程中产生的酸。另外，反应条件是常规的（例如，室温 30 分钟）；

（f）. 经过与在合适的惰性稀释剂（例如，二氯甲烷）中的等量或

25 过量（例如，5当量）的 R-N=C=O 反应形成脲基，将末端胺转变成脲（即，RNHC(O)NH-）基，其中 R 限定如上。优选的是，惰性稀释剂含过量（例如，大约 10 当量）的叔胺，如二异丙基乙胺。另外，反应条件是常规的（例如，室温下大约 30 分钟）。

2. C 端修饰

30 在制备 C 端羧基被酯（即 -C(O)OR，其中 R 限定如上）取代的肽模拟物时，采用用于制备肽酸的树脂，侧链保护的肽用碱和合适的醇，如甲醇裂解。然后经过用氟化氢处理以常规方式去掉侧链保护的基团以

获得所需的酯。

在制备 C 端羧基被酰胺 $-C(O)NR^3R^4$ 取代的肽模拟物时，使用二苯甲基胺树脂作为肽合成的固相支持物，合成完成时，氟化氢处理从支持物上释放该肽直接产生游离的肽酰胺（即，C 端是 $-C(O)NH_2$ ）。另外，在肽合成过程中使用氯甲基化的树脂，结合与氨反应以便从支持物上裂解下侧链受保护的肽产生游离肽酰胺，与烷基胺或二烷基胺反应产生侧链受保护的烷基酰胺或二烷基酰胺（即，C 端是 $-C(O)NRR^1$ ，其中 R 和 R^1 限定如上）。然后经过用氟化氢处理以常规方式去掉侧链保护以产生游离酰胺，烷基酰胺或二烷基酰胺。

在另一任意的实施方案中，经过分别用 N 端氨基内部取代羧基或酯上的 $-OH$ 或酯 ($-OR$) 诱导 C 端羧基或 C 端酯环化形成环状肽。例如，合成并裂解产生肽酸后，用合适的羧基激活物，如在二氯甲烷 (CH_2Cl_2)，二甲基酰胺 (DMF) 混合物的溶液中的二环己烷基碳化二亚胺 (DCC) 将游离酸转变成激活的酯。然后经过用 N 端胺内部取代激活的酸形成环状肽。与聚合相反，经过使用极稀的溶液可增强内部环化。该方法在本领域中是熟知的。

也可环化本发明的肽或在肽末端掺入脱氨基或脱羧基的残基，以便没有末端氨基或羧基，以减小对蛋白酶的敏感性或限制该肽的构象。本发明的化合物的 C 端官能团包括酰胺，酰胺低级烷基，酰胺二（低级烷基），低级烷氧基，羟基和羧基，及其低级酯衍生物和其药用上可接受的盐。

D. 主链修饰

制备本发明的化合物的肽衍生物的其他方法在 Hruby 等，生化杂志，268(2): 249-262 (1990) 中描述，本文引用作为参考文献。因此，本发明的肽化合物也用作具有相似生物学活性的非肽类化合物的结构模型。本领域的技术人员认识到可使用各种技术来构建与榜样肽化合物具有相同或相似的所需生物学活性但在可溶性，稳定性和对水解和蛋白裂解的敏感性方面比榜样肽具有更合适的活性的化合物。见 Morgan 和 Gainor, Ann. Rep. Med. Chem. 24: 243-252 (1989), 本文以参考文献引用。这些技术包括用由磷酸化物，酰胺化物，氨基甲酸酯，氨磺酰，仲胺，和 N - 甲基氨基酸。

一个或多个肽基键 $[-C(O)NH-]$ 被诸如 $-CH_2-$ 氨基甲酸酯键，磷酸酯

键, $-\text{CH}_2$ -氨磺酰键, 脲键, 仲胺 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$) 键和烷基化肽酰键 [$-\text{C}(\text{O})\text{NR}^6$ -其中 R^6 是低级烷基]的键取代的肽模拟物在常规肽合成期间制备, 这经过在合成期间的适当时间点仅仅用适当保护的氨基酸类似物取代氨基酸试剂。

5 合适的试剂包括, 例如, 氨基酸类似物, 其中氨基酸的羧基用适于形成一个上述键的基团取代。例如, 如果需要用 $-\text{CH}_2$ -氨基甲酸酯键 ($-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{NR}-$) 取代肽中的 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$ 键, 那么将适当保护的氨基酸的羧基 ($-\text{COOH}$) 首先还原成 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基, 然后用常规方法转变成 $-\text{OC}(\text{O})\text{Cl}$ 官能团或对-硝基羧基 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{P}-\text{NO}_2$ 官能团。将任一这类官能团与在固相支持物上发现的部分装配的肽 N 端的游离胺或烷基化胺
10 反应导致形成 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{NR}-$ 键。对该 $-\text{CH}_2$ -氨基甲酸酯键形成的更详细的描述见 Cho 等, 科学, 261: 1303-1305 (1993)。

同样, 以膦酸酯键取代肽中的氨基键可用在美国专利申请系列号 07/943,805, 08/081,577 和 08/119,700 (本文以参考文献引用其说明书
15 的全文) 中所述的方式实现。

用 $-\text{CH}_2$ -氨磺酰键取代肽中的酰胺键可经过将适当保护的氨基酸的羧基 ($-\text{COOH}$) 还原成 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基, 然后用常规方法将羟基转变成诸如甲苯磺酰基的合适的离去基团来实现。甲苯磺酰化的衍生物与诸如硫代乙酸反应后水解并经氯化来氧化可提供取代其它适当保护的氨基酸的羧基的 $-\text{CH}_2-\text{S}-(\text{O})_2\text{Cl}$ 官能团。肽合成中该适当保护的氨基酸类似物的使用提供了包含取代肽中酰胺键的 $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{NR}-$ 键, 从而提供了一种肽模拟物。关于氨基酸的羧基转变成 $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{Cl}$ 基的更完整的描述见例如, Weinstein, Boris, 氨基酸, 肽和蛋白质的化学和生物化学,
20 Vol. 7, pp. 267-357, Marcel Dekker, Inc., 纽约(1983), 本文以参考文献引用。
25 用。

用脲键取代肽中的酰胺键可以美国专利申请系列号 No. 08/147,805 中描述的方式 (本文以参考文献引用该申请的全文) 实现。

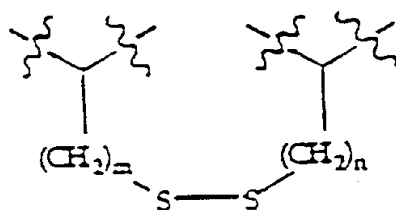
其中 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 键取代肽中的酰胺键的仲胺键可经过采用, 例如, 合适的保护的二肽类似物来制备, 其中酰胺键的羧基键用常规方法还原成 CH_2 基。例如, 如果是二甘氨酸, 去保护 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 后, 产生酰胺还原成胺, 然后在下一步偶联反应中以 N-保护形式使用。经过还原二肽中酰胺键的羧基来制备该类似物在本领域中是熟知的。
30

适当保护的氨基酸类似物按与相应的氨基酸相同的方式在常规肽合成中使用。例如，典型地是大约 3 当量的保护的氨基酸类似物用于该反应。使用诸如二氯甲烷或 DMF 的惰性有机稀释剂，当酸作为反应副产物产生时，反应溶剂典型地含有过量的叔胺以清除反应期间产生的酸。一个特别优选的叔胺是二异丙基乙胺，它典型地以大约过量 10 倍使用。反应导致将具有非肽酰键的氨基酸类似物掺入肽模拟物中。该取代可按需要进行重复，使肽中从 0 个到全部的酰胺键被非酰胺键取代。

也可环化本发明的肽，或在肽末端掺入脱氨基或脱羧基的残基，使没有末端氨基或羧基以减小对蛋白酶的敏感性或限制肽构象。本发明的化合物的 C 端官能团包括酰胺，酰胺低级烷基，酰胺二（低级烷基），低级烷氧基，羟基，和羧基，及其低级酯衍生物和其药用上可接受的盐。环化化合物的例子在表 4，5，6，8 和 9 中提供。

E. 二硫键形成

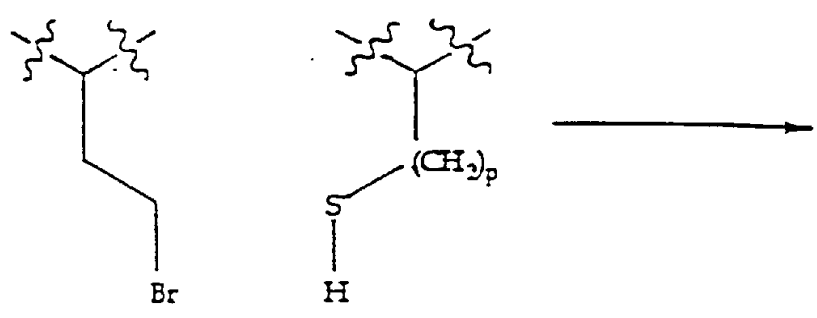
本发明的化合物可以在半胱氨酸的硫醇基之间具有分子内二硫键的环化形式存在。另外，可产生半胱氨酸的硫醇基之间的分子间二硫键以产生二聚体（或更高寡聚体）化合物。也可用高半胱氨酸取代一个或多个半胱氨酸残基。这些分子内或分子间二硫键衍生物可用如下所示的图解来代表：



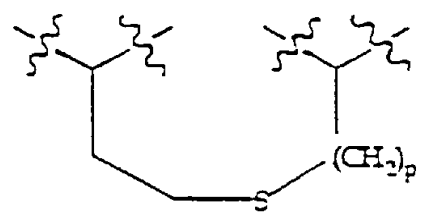
其中 m 和 n 独立地是 1 或 2。

本发明的其它实施方案提供了这些二硫键衍生物类似物，其中一个硫被 CH₂ 基团或硫的其它同型空间配位体取代。这些类似物使用下面所示的本领域已知的方法经分子内或分子间取代来制备：

5



10



15

其中 p 是 1 或 2。本领域的技术人员将容易预料到使用上面所示的 α -氨基- γ -丁酸衍生物的其它类似物和高半胱氨酸也能进行取代。

20

另外，可用 α -取代的乙酸在该肽的氨基末端加上一个帽，其中 α 取代基是离去基团，如 α -卤代乙酸，例如 α -氯乙酸， α -溴乙醚、或 α -碘乙酸。本发明的化合物也可经过用半胱氨酸或高半胱氨酸残基的硫取代离去基团来环化或二聚体化。例如，见 Barker 等，化学方法杂志，35: 2040-2048 (1992) 和 Or 等，有机化学杂志，56: 3146-3149 (1991)，本文引用其每一篇作为参考文献。二聚体化化合物的例子在表 7，9 和 10 中提供。

V. 应用

25

本发明的化合物在体外用作了解 TPO 生物学作用的专一性工具，包括评价认为影响 TPO 生产和受体结合过程的及受其影响的许多因子。该化合物也在形成结合并激活 TPO-R 的其它化合物中 useful，因为该化合物提供了应利于其形成的关于结构和活性间关系的重要信息。

30

该化合物也在筛选新 TPO 受体激动剂的试验中用作竞争性结合剂。在该试验实施方案中，本发明的化合物可不经修饰被使用或可用各种方式进行修饰；例如，经过标记，如共价或非共价连接到直接或间接提供可检测信号的基团上。在任一这类试验中，该物质可直接或间接标记。直接标记的可能性包括的标记基团有例如，诸如 ^{125}I 的放射性标记，

诸如过氧化物酶和碱性磷酸酶的酶（美国专利 3,645,090），能监测荧光强度，波长变化或荧光极化改变的荧光标记（美国专利号 3940475）。间接标记的可能性包括对一种结构进行的生物素标记，然后结合偶联有一个上述标记基团的抗生物素蛋白上。如果化合物附着于固相支持物上，该化合物也可包括间隔子或连接子。

而且，基于其结合 TPO 受体的能力，本发明的肽可用作在活细胞，固定细胞，生物学液体，组织匀浆，纯化的，天然生物学物质等中检测 TPO 受体的试剂。例如，经过标记该肽，可鉴定其表面具有 TPO-R 的细胞。另外，基于其结合 TPO 受体的能力，本发明的肽可用于原位染色，FACS（荧光激活的细胞分选），Western 印迹，ELISA 等。另外，基于其结合 TPO 受体的能力，本发明的肽可用于受体纯化，或纯化在细胞表面（或内部透化的细胞）上表达 TPO 受体的细胞。

本发明的化合物也可用作各种医学研究和诊断用途的商用试剂。该用途包括但不限于：（1）在各种功能性试验中用作定量候选 TPO 激动剂的活性的校准标准品；（2）用于维持 TPO - 依赖性细胞系的增殖和生长；（3）用于通过共同结晶对 TPO 受体进行结构分析；（4）用于研究 TPO 信号转导/受体激活的机制；（5）优选 TPO - 受体被激活或该激活对已知量的 TPO 激动剂等进行常规校准的其它研究和诊断应用。

本发明的化合物可用于与其它细胞因子结合或独自在体外扩展巨核细胞及其指定的祖先细胞。例如，见 GiGiusto 等，PCT 公开号，95/05843，本文作为参考文献引用。化疗和放疗经杀死快速分裂，更成熟的巨核细胞群体而引起血小板减少症。然而，这些治疗处理也减少了未成熟的，分裂活性较小的巨核细胞前体细胞的数目和活力。因此，由 TPO 或本发明的化合物对血小板减少症的改善可在化疗或放疗后用体外培养富集巨核细胞和未成熟前体细胞的其自身细胞的群体输注病人来促进。

本发明的化合物也可施用给温血动物，包括人类以激活体内的 TPO-R，因此，本发明包含治疗处理 TPO 相关性疾病的方法，包含施用足以模拟体内 TPO 对 TPO-R 的效力的量的本发明的化合物。例如，可施用本发明的肽和化合物以治疗各种血液学疾病，包括但不限于血小板疾病和血小板减少症，特别是与骨髓输血，放疗和化疗相关的疾病。

在本发明的一些实施方案中，优选首先给进行化疗或放疗的病人施用 TPO 拮抗剂，随后施用本发明的 TPO 激动剂。

5 本发明的化合物的活性在 McDonald. 美国儿科血液学/癌症学杂志 14: 8-21 (1992) (本文以参考文献引用) 所述的众多模型的一个中在体外或体内进行评价。

根据一个实施方案，本发明的组合物对于治疗与骨髓输血，放疗或化疗相联的血小板减少症有用。典型地是在化疗，放疗或骨髓移植前或其后以预防性施用该化合物。

10 因此，本发明也提供了药用组合物，包含作为一种活性成分的至少一种本发明的肽或肽模拟物与一种药用载体或稀释剂相联。本发明的化合物可经口服，肺内，肠胃外（肌肉内，腹膜内，静脉内(IV)或皮下注射），吸入（以细粉末组合物），经皮肤，鼻内，阴道，直肠或舌下途径用药，且可配制成为适于各种用药途径的剂量形式。例如，见 Bernstein 等，PCT 专利公开号 WO93/25221；Pitt 等，PCT 专利公开号
15 WO94/17784；和 Pitt 等，欧洲专利申请 613,683，本文引用其中每一篇作为参考文献。

口服的固体剂量形式包括胶囊，片剂，药丸，粉末，和颗粒体。在这类固体剂量形式中，活性化合物与至少一种惰性药用上可接受的载体，如蔗糖，乳糖或淀粉混合。该剂量形式与正常实践一样也可包含非
20 惰性稀释剂的其它物质，例如，诸如硬脂酸镁的润滑剂。如果是胶囊，片剂和药丸，剂量形式也可包含缓冲剂。另外片剂和药丸可肠衣制备。

用于口服的液体剂量形式包括具有含常用于本领域的惰性稀释剂如水的配剂的药用上可接受的乳剂，溶液，悬液，糖浆。除了这些惰性
25 稀释剂外，组合物也可包括佐剂，如加湿剂，乳化剂和悬浮剂，增甜，调味和加香剂。

用于肠胃外用药的根据本发明的制品包括无菌含水或不含水的溶液，悬液或乳剂。不含水的溶剂或载体的例子有丙二醇，聚乙二醇，植物油，如橄榄油和玉米油，明胶和可注射的有机酯，如油酸乙酯。这些
30 剂量形式还可含有佐剂，如保护剂，加湿剂，乳化剂和分散剂。它们可经过例如，通过滞留细菌的滤器过滤，经过向组合物中掺入灭菌剂，经过辐射组合物，或经过加热组合物来灭菌。它们也可使用无菌水或一些其它的无菌可注射介质在用前立即生产。

用于直肠或阴道用药的组合物优选是栓剂，除活性物质外，它可含有赋形剂，如椰子油或栓剂蜡。用于鼻内或舌下用药的组合物也可用本领域熟知的标准赋形式来制备。

5 含有该化合物的组合物可用于预防性和/或治疗性处理而用药。在治疗应用中，按上面所述给已患有疾病的病人施用足以治愈或至少部分控制该疾病及其并发症的的症状的量的化合物。足以达到该目的量定义为“治疗上有效的剂量”。对该用途有效的量取决于该疾病的严重性和病人的体重和一般状态。

10 本发明的组合物也可用例如 Tice 和 Bibi 的方法（关于控制药物传递的论文，A. Kydonieus, Marcel Dekker. N. Y. (1992), pp. 315-339）进行微粒包装。

在预防应用中，含有本发明的化合物的组合物施用给对特定疾病敏感或有感染该疾病危险的病人。这样一种量定义为“预防上有效的剂量”。在该用途中，准确的量也取决于病人的健康状态和体重。

15 有效治疗所必需的 TPO 激动剂的量取决于许多不同的因素，包括用药方式，靶位点，病人的生理状态，和施用的其它药物。因此，治疗剂量应定量以优选安全和有效。典型地是，用于体外的剂量可对于体内施用这些试剂有用的量提供有用的指导。用于治疗特定疾病的有效剂量的动物试验可为人类剂量提供进一步的预示。诸多方面的考虑在下列文献中进行了描述：例如，在 Gilman 等（编辑），Goodman 和 Gilman's：治疗的药理学基础，第 8 版，Pergamon 出版社(1990)；和 Remington 的药品科学，第 7 版，Mack 出版公司，Easton, Penn. (1985)；本文引用各篇作为参考文献。

25 本发明的肽和肽模拟物以每天大约 0.001mg 至大约 10mg/kg 体重的剂量范围用药时在治疗 TPO 介导的症状中有效。使用的具体剂量受所治疗的具体症状，用药途经及临床医师根据诸如症状严重性，病人的年龄和一般状况等的因素作出的判断来调节。

30 尽管上文只具体描述了本发明的优选的实施方案，但可预料到在不背离本发明的实质和所要求的范围的前提下对本发明作出修改或变化是可能的。

实施例 1

固相肽合成

使用 Merrifield 固相合成技术（见 Steward 和 Young, 固相肽合成, 第二版, Pierce Chemical, Rockford, IL (1984) 和 Merrifield, 美国化学学会杂志, 85:2149 (1963)）在 Milligen/Bio search 9600 自动仪器或应用生物系统公司 431A 型肽合成仪合成本发明的各种肽。使用应用生物系统公司系统软件 1.01 版的标准方法装配该肽。每次偶联用 BOP（苯并三唑基 N-oxtris 二甲基胺磷六氟磷酸酯）和 HOBt（1-羟基苯并三唑）进行 1 - 2 小时。

10 使用的树脂是 HMP 树脂或 PAL（Milligen/Bioserch），它是以 5 -（4'-Fmoc-氨基甲基 - 3,5'-二甲氧基苯氧基）戊酸作衔接物的交联的聚苯乙烯。使用 PAL 树脂导致从树脂上裂解肽时产生羧基端酰胺官能团。裂解时，HMP 树脂在终产物的 C 端产生羧酸基团。大多数试剂，树脂和保护的氨基酸（游离的或在树脂上的）从 Millipore 或应用生物系统公司购买。

在偶联程序中 Fmoc 基团用于氨基保护。氨基酸的伯胺保护用 Fmoc 实现，侧链保护基团对于丝氨酸，酪氨酸，天冬酰胺，谷氨酸和苏氨酸是 t-丁基，对于谷氨酰胺是三苯甲基；对于精氨酸是 Pmc（2,2,5,7,8-pentamethylchroma sulfonate）；对于色氨酸是 N-t-丁氧基羰基；对于组氨酸和谷氨酰胺是 N-三苯甲基，对于半胱氨酸是 S-三苯甲基。

20 用试剂 K 或对其略作修饰进行处理实现从树脂上取下肽并同时侧链官能团去保护。另外，在这些肽的合成中，用 90% 三氟乙酸，5% 的乙二硫醇，和 5% 的水的混合物起始 4℃ 并逐渐增加到室温裂解具有酰胺化羧基末端的完全装配的肽。用二乙基醚沉淀去保护的肽。在所有情况下，在 C₁₈ 结合的硅胶柱中用在 0.1% 三氟乙酸中的乙腈/水梯度经预制，反相，高效液相色谱进行纯化。以快速原子轰击质谱仪或电子喷射质谱仪及氨基酸分析（如果可能的话）鉴定匀质肽。

实施例 2

生物学试验

30 使用血小板生成素依赖型细胞增殖试验可测量该肽的生物活性。用全长的人 TPO-R 转染鼠 IL-3 依赖性 Ba/F3 细胞。缺乏 IL-3 时（WEHI-3 条件培养基），这些细胞的增殖依赖于 TPO。亲代未转染的细胞系不

与人 TPO 反应，但保持 IL-3 依赖性。

使用来自文库筛选的合成肽对上述两种细胞系进行生物测定。在含 10 % WEHI-3 条件培养基的完全 RPMI-10 培养基中生长细胞，然后在 PBS 中洗涤 2 次，并以 2×10^4 个细胞/孔加入含肽或 TPO 稀释液的孔中。细胞在加湿的 5 % CO_2 空气中 37 °C 培养 48 小时，经过将 MTT 还原成甲臃，在 ELISA 平板阅读器上测量 570nm 下的吸光率测定代谢活性。试验的肽以剂量依赖性方式刺激 TPO-R 转染的 Ba/F3 细胞的增殖。这些肽对亲代细胞系无影响。

实施例 3

10

结合亲和力

在竞争结合试验中测定了化学合成的肽对 TPO-R 的结合亲和力。微滴度平板的孔用 1mg 链霉抗生物素蛋白覆盖，用 PBS/1%BSA 封闭，接着加入 50ng 生物素标记的抗-受体固着抗体 (Ab179)。然后用 1:10 稀释的可溶性 TPO-R 产物处理各孔。将各种浓度的肽或肽类似物与恒量的融合到麦芽糖结合蛋白上的由残基 1 - 156 组成的 TPO 的截短形式 (MBP-TPO₁₅₆) 混合。将肽 MBP-TPO₁₅₆ 混合物加入 TPO-R 覆盖的孔中，4 °C 培养 2 小时，然后用 PBS 洗涤。经过加入针对 MBP 的兔抗血清，接着加入碱性磷酸酶连接的羊抗兔 IgG 测量平衡时结合的 MBP - TPO₁₅₆ 的量。然后使用标准方法测定各孔中碱性磷酸酶的量。

15

在一定范围的肽浓度内进行该试验，对结果绘图，y 轴代表结合的 MBP-TPO₁₅₆ 的量，x 轴代表肽或肽模拟物的浓度。可测量肽或肽模拟物减少结合于固着 TPO-R 上的 MBP-TPO₁₅₆ 50%(IC₅₀) 的量时的浓度。肽的解离常数 (kd) 应相似于使用上述试验条件测定的 IC₅₀。

实施例 4

25

在质粒上的肽

pJS142 载体用于文库构建且在图 4 中显示。构建文库需要 3 个寡核苷酸序列: ON-829 (5'ACC ACC TCC GG); ON-830(5'TTA CTT AGT TA)和感兴趣的文库特异性寡核苷酸 (5' GA GGT GGT{NNK}_nTAA CTA AGT AAA GC)，其中{NNK}_n代表所需长度和序列的随机区域。在合成期间或用多核苷酸激酶纯化后可将寡核苷酸的 5'端经化学法磷酸化。然后将它们以 1:1:1 的摩尔比退火并连接到载体上。

30

优选用于淘选的大肠杆菌菌株具有基因型: $\Delta(\text{srl-recA})\text{endA1 nupG}$

lon-11 sulA1 hsdR17 Δ (ompT-fepC)266 Δ clpA319::kan Δ lacI lac ZU118, 它可从具有基因型 lon-11 sulA1 的来自耶鲁大学大肠杆菌遗传保藏中心的大肠杆菌菌株 (E. coli b/r, 保藏中心登记号: CGSC:6573) 制备。除了 10 % 的甘油用于所有洗涤步骤外, 按 Dower 等, 核酸研究, 16:6127
5 (1988)所述制备上述大肠杆菌用于电穿孔。使用 1 μ g Bluescript 质粒 (Stratagene) 试验该细胞的效力。将这些细胞用于生成原始文库和用于每轮淘选后扩增富集的群体。

经过使用溶菌酶轻微消化细胞壁从细胞释放质粒上的肽用于淘选。沉淀细胞碎片后, 可直接在大多数受体上使用粗制裂解产物。如果
10 需要对质粒复合物进行一些其它的纯化, 可使用凝胶过滤柱去掉粗制裂解产物中的许多低分子量污染物。

在盐浓度比大多数生理缓冲液更低的缓冲液 (HEKL) 中进行淘选。可在具有固着于非封闭性单克隆抗体 (MAb) 上的受体的微滴度孔中进行淘选或经过在珠或柱上进行淘选。更具体地说, 在首轮淘选
15 中, 可使用分别用受体覆盖的 24 孔。在第二轮中, 典型地使用受体 (PAN 样品) 覆盖的 6 个孔和无受体 (NC 样品) 的 6 个孔。比较这两个样品中的质粒数可得到是否经淘选富集了受体特异性克隆的征兆。“富集”定义为 PAN 转化子对从 NC 样品中所回收的克隆的比率。富集 10 倍通常表示存在受体特异性克隆。

20 在随后轮的淘选中, 减小加入孔中的裂解产物对于降低质粒复合物的非特异性背景结合是有用的。在第 2 轮中, 通常使用每孔 100 μ l 的裂解产物。在第 3 轮中, 使用在 HEKL/BSA 中以 1/10 稀释的每孔 100 μ l 的裂解产物。对于随后各轮的淘选, 典型地使用超过所估计的残余多样性至少 1000 倍的质粒转化单位的加入量。

25 典型地是, 经过 3, 4 或 5 轮淘选后, 根据获得的富集倍数检查由单个克隆所编码的肽的结合特征。典型地使用检测 LacI 肽融合蛋白的受体特异性结合的 ELISA。正常情况下, LacI 是四聚体, 最小功能性 DNA 结合种类是二聚体。因此, 该肽在融合蛋白上表现为多价。假定在孔中固着了足够密度的受体, 融合到 LacI 上的肽以协同的多价方式结合到
30 表面。这一协同结合允许检测低内部亲和力的结合事件。该试验的灵敏性的优点在于易于鉴定低亲和力的起始靶。缺点在于 ELISA 中的信号与肽的内部亲和力不相关。如下所述融合到麦芽糖结合蛋白 (MBP)

上的肽允许以 ELISA 方式进行检测，其中信号强度与亲和力较好地相关。见图 5A-B。

使用任意标准小量制备程序以双链形式制备来自感兴趣的克隆的 DNA。感兴趣的单个克隆或克隆群体的编码序列可转移到载体上，该载体将这些序列与编码 MBP（在溶液中一般以单体出现的一种蛋白质）的基因融合到框架中。文库克隆进 pJS142 在靠近该文库随机编码区域的起始处产生一个 BspEI 限制性位点。用 BspEI 和 ScaI 消化允许纯化一个 ~900bp 的 DNA 片段，该片段可亚克隆进两个载体，pELM3（细胞质的）或 PELM15（固质的）中的一个中，这两个载体分别是对从新英格兰生物实验室买到的 pMALc2 和 pMALp2 载体的简单修饰。见图 5A-B。用 AgeI 和 ScaI 消化 pELM3 和 PELM15 允许从 pJS142 文库有效地克隆 BspEI-ScaI 片段。BspEI 和 AgeI 末端适合于连接。另外，ScaI 位点的正确连接对于再创造功能性 bla（Amp 抗性）基因，从而降低来自不需要的连接事件的背景克隆的水平是必需的。然后可用 IPTG 诱导 tac 启动子控制的 MBP 肽融合物的表达。

经过使用溶菌酶裂解细胞并经离心去掉不溶性细胞碎片从单个克隆制备用于 LacI 或 MBP ELISA 的裂解产物。然后将溶胶产物加入含固着的受体板孔中及加入不含受体的对照孔中。经过与针对 LacI 或 MBP 的兔多克隆抗血清培养，然后与碱性磷酸酶标记的羊抗兔第二抗体培养检测 LacI 或 MBP 肽融合物的结合。用对硝基苯磷酸酯生色底物检测结合的碱性磷酸酶。

实施例 5

“头状二聚体”系统

在质粒上的 LacI 肽技术的一个变化利用称为“头状二聚体”的 DNA 结合蛋白质。由大肠杆菌 lac 阻遏物进行的 DNA 结合受大约 60 个氨基酸的“头状”区域的介导。结合 lac 操纵子的头状区域的二聚体正常情况下经过与更大型的大约 300 个氨基酸的 C-端区域相联形成。“头状二聚体”系统利用含有短肽衔接子连接的两个头状块的头状二聚体分子。这些蛋白质以足够的稳定性结合 DNA 以允许在头状二聚体 C 端出现的肽抗原决定基与编码该肽的质粒相联。

随机肽融合到头状二聚体的 C 端，该二聚体结合编码它的质粒，以制备能经淘选筛选的肽-头状二聚体-质粒复合物。在质粒上的头状二

聚体肽系统允许对高亲和力的配体具有比 LacI 系统更大的选择性。因此，头状二聚体系统对于制备基于起始低亲和力的靶的诱变文库并选择这些起始序列的更高亲和力的变异体有用。

5 与在质粒上的肽一样使用头状二聚体载体 pCMG14 构建文库（见图 6A-C）。lac 操纵子的存在不是头状二聚体蛋白结合质粒所需要的。将该文库导入包含大肠杆菌（lon-11 sulA1 hsd R17 (ompT-fepc) Δ clpA319::Kan Δ lacI lac ZU118 Δ (Srl-recA)306::Tn10)的细菌菌株中并在基础(A)启动子诱导条件下进行扩增。除了使用 HEK 缓冲液代替 HEKL 缓冲液，用含水酚代替 IPTG 从孔中洗脱质粒外，按与 lacI 文库
10 所用相似的方法进行头状二聚体文库的淘选。头状二聚体淘选的序列常在转移进 MBP 载体中后进行鉴定以使它们能在亲和敏感性 MBP ELISA 中进行检测且也使克隆群体能用标记的受体经集落转移进行筛选。

实施例 6

15 在本实施例中，对环状化合物进行三个试验。首先，按上面所述获得 IC₅₀ 值。另外，按上面所述进行 MTT 细胞增殖试验以计算 EC₅₀ 值最后，进行显微生理测量仪（分子装置公司）试验。基本上，在这一试验中测定了与本发明的化合物刺激的 TPO 受体反应的细胞外介质酸化率。EC₅₀ 的范围以上述 IC₅₀ 所示的符号表示。结果在表 4 中概括。

表 4

结构	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
	增生	显微生理测量	
$\begin{array}{c} \text{[H]} - (\text{Pen}) \text{ADGPTLREWISF} (\text{Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \text{-----} \text{S} \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} [\text{O}=\text{C}-\text{NH}] - \text{ADGPTLREWISF} (\text{Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \text{-----} \text{S} \end{array}$	++	++	++
$\begin{array}{c} \text{[H]} - (\text{高半胱氨酸}) \text{ADGPTLREWISF} (\text{Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \text{-----} \text{S} \end{array}$	++	++	ND
$\begin{array}{c} [\text{O}=\text{C}-\text{N}] - \text{ADGPTLREWISF} - (\text{Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \text{CH}_2 \text{-----} \text{S} \text{-----} \\ \\ \text{O} \end{array}$	+	+	+ -
$\begin{array}{c} \text{[H]} - (\text{D-Cys}) \text{ADGPTLREWISF} (\text{D-Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \text{-----} \text{S} \end{array}$	+	+	ND
$\begin{array}{c} \text{[H]} - (\text{Cys}) \text{ADGPTLREWISF} (\text{D-Cys}) - [\text{NH}_2] \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{S} \text{-----} \text{S} \end{array}$	+ -	+	++

结构	EC50(nM) 增生	EC50(nM) 显微生理测量	IC50(nM)
$[H] - (D-Pen) ADGPTLREWISF (D-Cys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{---S} \end{array}$	+	+	++
$[H] - (\text{高半胱氨酸}) ADGPTLREWISF (Homocys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{---S} \end{array}$	+	+	++
$[O=C-NH] - ADGPTLREWISF (Homocys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_2 \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ \text{---S} \end{array}$	+	+	++
$[O=C-NH] - ADGPTLREWISF (Pen) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_2 \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ \text{---S} \end{array}$	+	+	+ -
$[O=C-NH] - ADGPTLREWISF (Cys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{Ph-CH} \end{array} \quad \begin{array}{c} \\ \text{---S} \end{array}$	++	+	++
$[H] - KADGPTLREWISFE - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{---NH-C=O} \end{array}$	+	+	ND

结构	EC50(nM) 增生	EC50(nM) 显微生理测量	IC50(nM)
$[H] - EADGPTLREWISFK - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ O=C-NH \end{array} \text{-----} $	+	+	ND
$[O=C-NH] - ADGPTLREWISF(Cys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{~~~~~} \end{array} \text{-----} \begin{array}{c} \\ S \end{array}$	++	+	ND
$[O=C-NH] - ADGPTLREWISF(Cys) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{~~~~~} \end{array} \text{-----} \begin{array}{c} \\ S \end{array}$	++	+-	ND
$[HN] - ADGPTLREWISFE - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \\ \text{~~~~~} \end{array} \text{-----} \begin{array}{c} \\ C=O \end{array}$	+-	+-	+-
$[H] - (Pen)ADGPTLREWISF(Pen) - [NH_2]$ $\begin{array}{c} \qquad \qquad \qquad \\ S \text{-----} S \end{array}$	+-	+-	ND

实施例 7

在本实施例中按上面所述测定了在环状化合物

5 C A D G P T L R E W I S F C 中 D, E, I, S 或 F 位置氨基酸取代的
|-----|

EC₅₀ 和 IC₅₀ 值。显微生理测量结果在括号中给出。结果在下面表 5 中概括。

表 5

CADGFLREWISFC

5

取代	EC50 (nM) 细胞增生	IC50 (nM)
E - Q	++ (+)	++
D - A	+ - (+)	++
I - A	+ - (+)	+
S - A	++ (++)	++
S - D-Ala	+	+ -
S - Sar	+	++
S - Aib	++ (+)	++
S - D-Ser	++	++
S - Nva	++ (++)	++
S - Abu	++	++
S - (N-Me-Ala)	+ -	+ -
S - (N-Me-Val)	+	+ -
S - (N-Me-Ala) *	+	+ -
S - (Nor-Leu)	++	++
S - (t-Bu-Gly)	+	++
S - [N-Me-Ser(Bzl)]		+

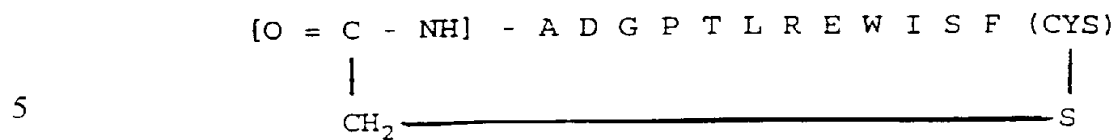
取代	EC50 (nM) 细胞增生	IC50 (nM)
S - (Homoser)	ND	ND
S - (N-Me-Leu)	+	ND
F - A	+-(+)	++
F - D-Ala	+	++
F - D-Phe	+	++
F - Homo-Phe	++(++)	++
F - CHA	++(++)	++
F - Thi	++	++
F - (Ser(Bzl))	++	++
F - (N-Me-Ala)	+-	+-
F - (Phenylgly)	++(++)	++
F - (Pyridylala)	++	++
F - (p-Nitrophe)	++(++)	++
F - (3,4-di-Cl-Phe)	++(+)	++
F - (p-Cl-Phe)	++	++
F - (2-Nal)	++(++)	++
F - (1-Nal)	++	++
F - (DiPh - Ala)	++	++

取代	EC50 (nM) 细胞增生	IC50 (nM)
F - (N-Me-Phe)	++	ND
S,F - Ava (硫醇酯)	+	++
S,F - Ava (cys-cys)	+	++
S,F - Ava	+	++
AD - deletion	+ (+)	ND
ADG - deletion	(+)	+



实施例 8

在本实施例中，评价了在化合物

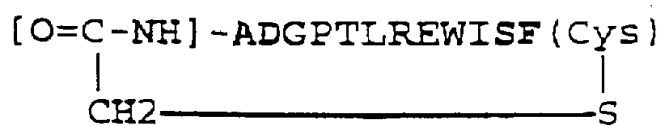


中 D, S, 或 F 位置的氨基酸取代，如下表 6 所示。EC₅₀ 和 IC₅₀ 值按上面所述计算。显微生理测量结果在括号中表示。

10

表 6

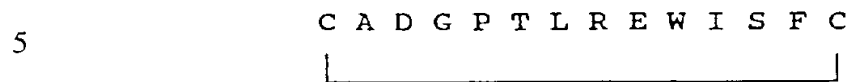
5



取代	EC50 (nM) 细胞增生	IC50 (nM)
D - E	(+)	ND
游离酸形式	++ (+)	ND
C 端添加 Gly	++	++
S - Abu	++ (++)	ND
F - DiPh-Ala	(++)	++
SF - Abu, DiPh-Ala	+ (+)	++

实施例 9

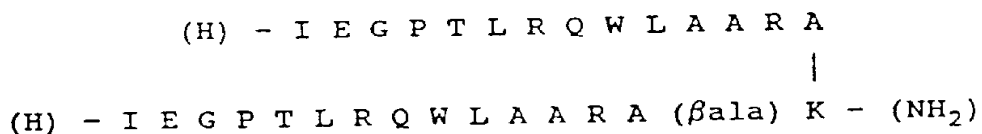
在本实施例中，对下面表 7 所裂的二聚体化合物按上面所述计算 EC_{50} 和 IC_{50} 值。包括作为比较的环状单体。



在所测试的最大浓度 $10\mu\text{M}$ 时表 8 的化合物无活性。

在表 9 中，比较了按上面所述测定的 IEGPTLRQWLAARA 的环化和二聚体化的变异体的 EC_{50} 和 IC_{50} 。

10 在表 10 中，比较了二聚体



15 的截短形式。 EC_{50} 和 IC_{50} 值按上面所述计算。显微生理测量结果在括号中给出。

表 7

5

	EC50 (nM)	IC50 (nM)	
	<u>显微生理测量</u>	<u>增生</u>	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ [\text{Br}-\text{C}-\text{NH}] \end{array} - \text{ADGPTLRWISFC} - (\text{NH}_2)$	++	++	++
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ [\text{Br}-\text{C}-\text{NH}] \end{array} - \text{ADGPTLRWISFC} - (\text{NH}_2)$			
[H]-IEGPTLRQWLAARA	++	++	++
[H]-IEGPTLRQWLAARA (β -Ala) K-(NH ₂)			
[H]-CIEGPTLRQWLAARA-(NH ₂)	++	++	++
[H]-CIEGPTLRQWLAARA-(NH ₂)			
[H]-CADGPTLRWISF-(NH ₂)	++	++	++
[H]-CADGPTLRWISF-(NH ₂)			
[H]-SVQCGPTLRQWLAARNHLS-(NH ₂)	++	++	++
[H]-SVQCGPTLRQWLAARNHLS-(NH ₂)			
[H]-MVGPTLRSGC-(NH ₂)	ND	+	+
[H]-MVGPTLRSGC-(NH ₂)			

	EC50 (nM)		IC50 (nM)
	<u>显微生理测量</u>	<u>增生</u>	
<u>CADGPTLREWISFC</u>	++	++	++
[Ac]-ADGPTLREWISFC [Ac]-ADGPTLREWISFC	ND	++	++
ADGPTLREWISFC ADGPTLREWISFC	++	++	++
[Ac]-DGPTLREWISFC [Ac]-DGPTLREWISFC	++	++	++
[Ac]-GPTLREWISFC [Ac]-GPTLREWISFC	ND	++	++
GPTLREWISFC GPTLREWISFC	++	++	+
[Ac]-PTLREWISFC [Ac]-PTLREWISFC	ND	++	++
PTLREWISFC PTLREWISFC	++	++	+-
[Ac]-TLREWISFC [Ac]-TLREWISFC	+-	+-	+-
TLREWISFC TLREWISFC	++	+-	+-

表 8

5

[H]-CTRAQFLKGC-[NH₂]

[H]-CNINQLRSIC-[NH₂]

[H]-CNRSQLLAAC-[NH₂]

[H]-CTSTQWLLAC-[NH₂]

[H]-CQRADLINFQ-[NH₂]

[H]-CLLSEFLAGQOC-[NH₂]

[H]-CTFQVWKLARNQ-[NH₂]

[H]-CTLGQWLQMGIC-[NH₂]

[H]-CLIGPFVTQWLYEC-[NH₂]

[H]-CELREFLDPTTAVC-[NH₂]

[H]-CGTEGPTLSTWLDC-[NH₂]

[H]-CELVGPSLMSWLTC-[NH₂]

[H]-CSLKEFLHSGLMQC-[NH₂]

[H]-CTLAEFLASGVEQC-[NH₂]

[H]-CTLKEWLVSHEVWC-[NH₂]

[H]-CIEGPTLRQWLAARAC-(NH₂)

[H]-REGPTLRQWM-(NH₂)

[H]-REGPTLRQWLMSRS-(NH₂)

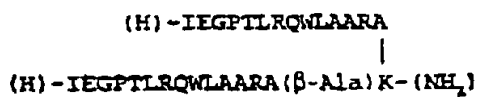
5

表 9

10

	EC50 (nM)	IC50 (nM)
	<u>显微生理测量</u>	<u>增生</u>
[H]-IEGPTLRQWLAARA-(NH ₂)	N.D.	++ ++
[H]- <u>CIEGPTLRQWLAARAC</u> -(NH ₂)	N.D.	++ ++
[H]-IEGPTLRQWLAARA	++	++ ++
[H]-IEGPTLRQWLAARA(β-Ala)K-(NH ₂)		
[H]-CIEGPTLRQWLAARA-(NH ₂)	++	++ ++
[H]-CIEGPTLRQWLAARA-(NH ₂)		

表 10



5

序列	EC50 (nM) 细胞增生	IC50 (nM)
(Ac)-IEGPTLRQWLAARA (Ac)-IEGPTLRQWLAARA-βA-K(NH ₂)	++	ND
(H)-IEGPTLRQWLAAR (H)-IEGPTLRQWLAAR-βA-K(NH ₂)	++	ND
(H)-IEGPTLRQWLAA (H)-IEGPTLRQWLAA-βA-K(NH ₂)	++(++)	ND
(Ac)-EGPTLRQWLAARA (Ac)-EGPTLRQWLAARA-βA-K(NH ₂)	ND	ND
(H)-EGPTLRQWLAARA (H)-EGPTLRQWLAARA-βA-K(NH ₂)	++	ND
(H)-EGPTLRQWLAAR (H)-EGPTLRQWLAAR-βA-K(NH ₂)	++(++)	ND
(Ac)-EGPTLRQWLAA (Ac)-EGPTLRQWLAA-βA-K(NH ₂)	++	ND
(H)-EGPTLRQWLAA (H)-EGPTLRQWLAA-βA-K(NH ₂)	++	ND

实施例 10

在本实施例中，在环状化合物



5

的 G, P 和 W 位置导入各种取代。

表 11 列出了显示 TPO 激动剂活性的取代化合物的例子。表中缩写的取代如下：

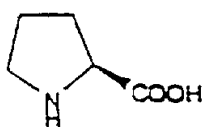
表 11

10

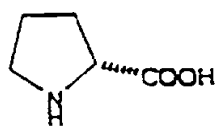
[H] - C A D G P T L R E W I S F C - [NH ₂]		
G	P	W
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gly	Pro	Trp
Gly	Pro	Trp
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gaba	Pro	Trp
Cpr-Gly	Pro	Trp
Sar	Hyp(OBn)	Nal
Gly	Pro	Trp
Gly	Pro	Nal
Sar	Pro	Trp
Cpr-Gly	L-Tic	Nal
Gly	D-Tic	D-Trp
Cpr-Gly	D-Tic	Trp
Gaba	Hyp(OBn)	Trp

脯氨酸取代

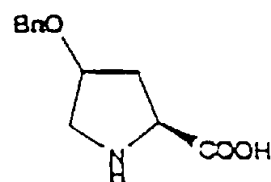
5



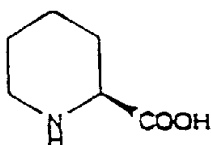
L-Pro



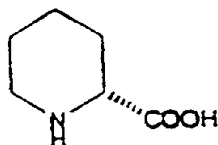
D-Pro



L-4-Hvp (OBn)



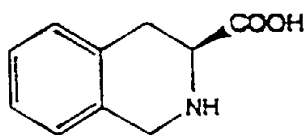
L-六氢吡啶羧酸



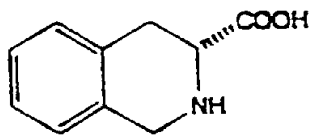
D-六氢吡啶羧酸



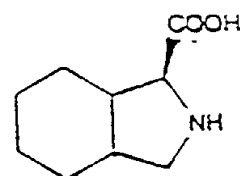
L-三甲叉亚胺甲酸



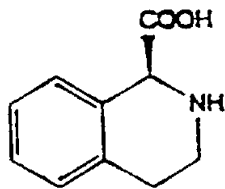
L-Tic



D-Tic

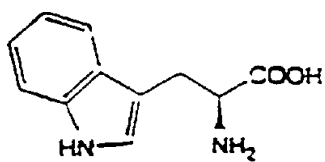


L-Oic

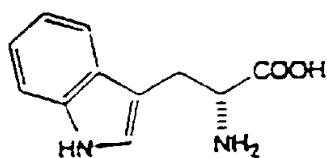


L-Tiq

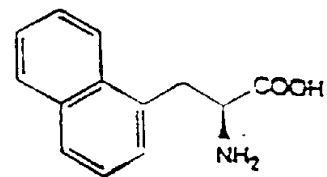
色氨酸取代



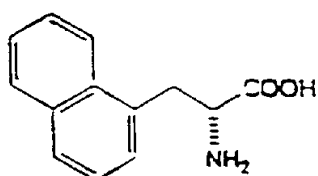
L-Trp



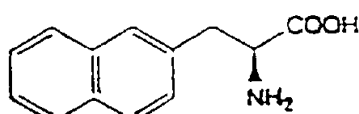
D-Trp



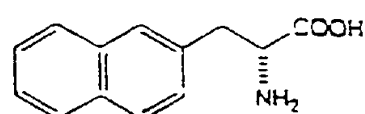
L-1-Nal



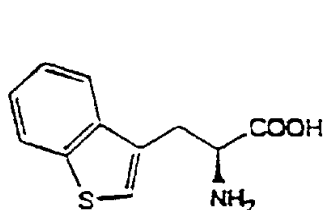
D-1-Nal



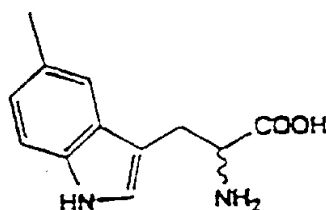
L-2-Nal



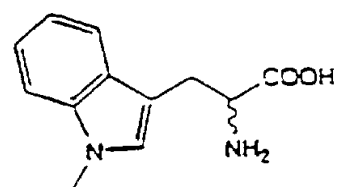
D-2-Nal



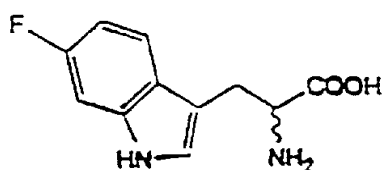
L-(苯并噻吩)丙氨酸



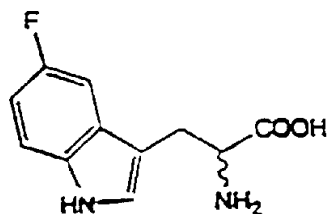
DL-5-Me-Trp



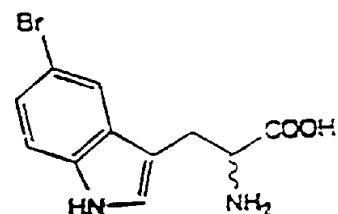
DL-1-Me-Trp



DL-6-F-Trp

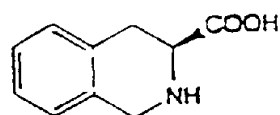


DL-5-F-Trp



DL-5-Br-Trp

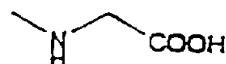
1



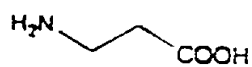
甘氨酸取代



甘氨酸



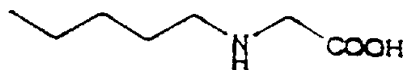
肌氨酸



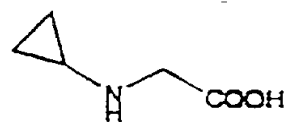
β -丙氨酸



γ -氨基丁酸



N-戊基甘氨酸



N-环丙烷基甘氨酸

实施例 11

为了评价小鼠作为方便的试验种类的可行性，进行了一些体外实验，设计测量试验化合物对小鼠受体的活性。首先从 8 至 9 周龄 Balb/C 小鼠股骨收集的骨髓细胞在液体培养基中用 rhu TPO 或各种浓度的试验肽培养。在培养期间末期，用 Cytospin 浓缩培养物，染色乙酰胆碱酯酶（AChE，小鼠巨核细胞的鉴定剂）并以显微镜分析计数。1nM 的 rhu TPO 产生过度生长的非常大（ $>40\mu\text{m}$ ）的染色了 AChE 的非贴壁细胞。这些细胞似乎是成熟的巨核细胞。从起始接种的 10^6 个总骨髓细胞/ml（在 50ml 培养物中）中，估计形成了 1 到 2×10^6 个巨核细胞。这种对 TPO 的反应指定为“最大”。含有未加入生长因子的对照培养物产生非常少的 AChE - 阳性细胞。在该实验中以高浓度测定了一些肽化合物，结果在表 12 中概括。10 μM 的肽产生最大的小鼠骨髓应答。这些发现是该肽家族对鼠受体具有活性的首要证据。在第二个实验中，收获骨髓细胞并在含有无生长因子，1nM rhu TPO 或 10 μM 肽 A 的半固态培养基（甲基纤维素）中培养。培养 7 天后，计数大型细胞（假定是巨核细胞）的集落并分组成小集落（3 - 5 个细胞）或大集落（大于 6 个细胞）。结果在表 13 中显示。TPO 和试验肽都产生比阴性对照培养物基本上更多的两种大小的集落。这表明该肽模拟 TPO 刺激 Mk 前体细胞群体伸展的能力。

为了获得试验化合物对鼠和人受体活性更定量的比较，克隆于 muTPO 受体并转染进 BaF3 细胞。分离 TPO 依赖型细胞群体。

25

30

表 12

肽	试验浓度 (nM)	应答
D	100,000	无
C	40,000	最大**
C + S.A.*	1000	最大**
S.A.单独	1000	无
B	100,000	最小
A	10,000	最大**
TPO(R & D)	1	“最大”

5

*. 与生物素标记的肽复合的链霉抗生物素蛋白 - 推断 1:4 复合物的浓度

**. 与重组人 TPO 相比。

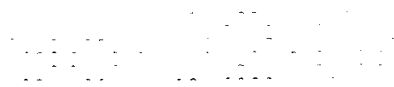
***. 在 Cytopspin 上有 25 - 30 % 染色 ACE 的细胞。

无因子培养物 - ca, 5%染色 AChE 的细胞 (较低的细胞形成之)

10

表 13

化合物		大型细胞	大型细胞
无因子	1	2	1
无因子	1	1	1
1nMTPO	#1-1	15	6
1nMTPO	#1-2	12	1
1nMTPO	#2-1	16	8
1nMTPO	#2-2	13	3
10 μ M 肽	#1-1	25	10
10 μ M 肽	#1-2	22	8
10 μ M 肽	#2-1	22	7
10 μ M 肽	#2-2	21	10



在本申请说明书中的所有论文和参考文献,包括专利文献在本文中
以参考文献引用其全文用于各种目的。

5

说明书附图

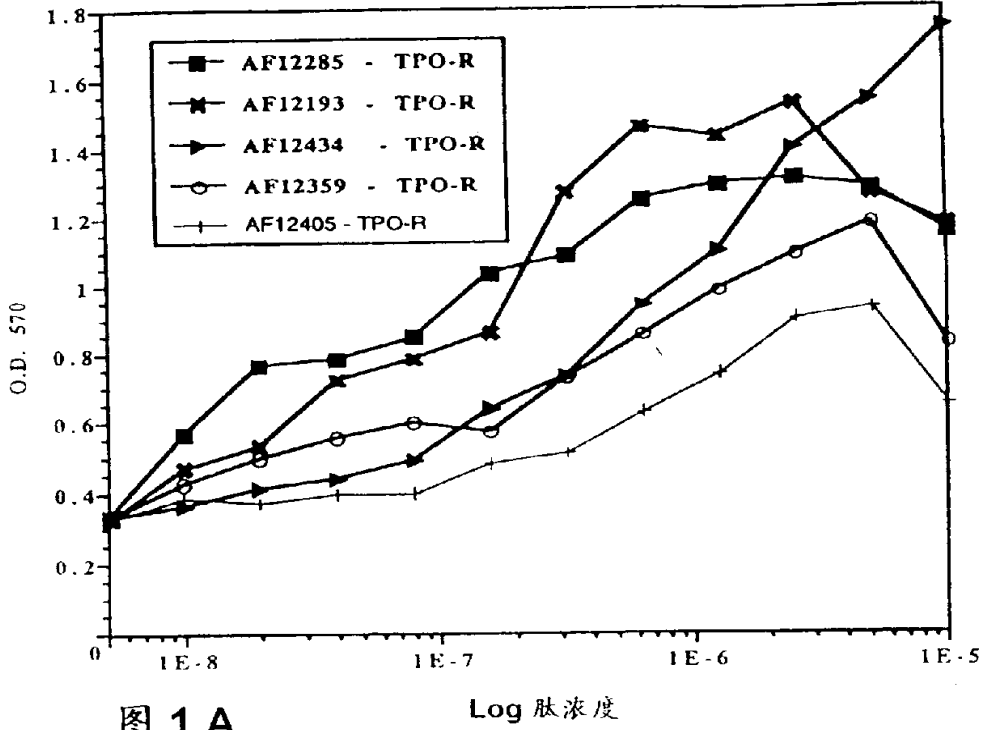


图 1 A

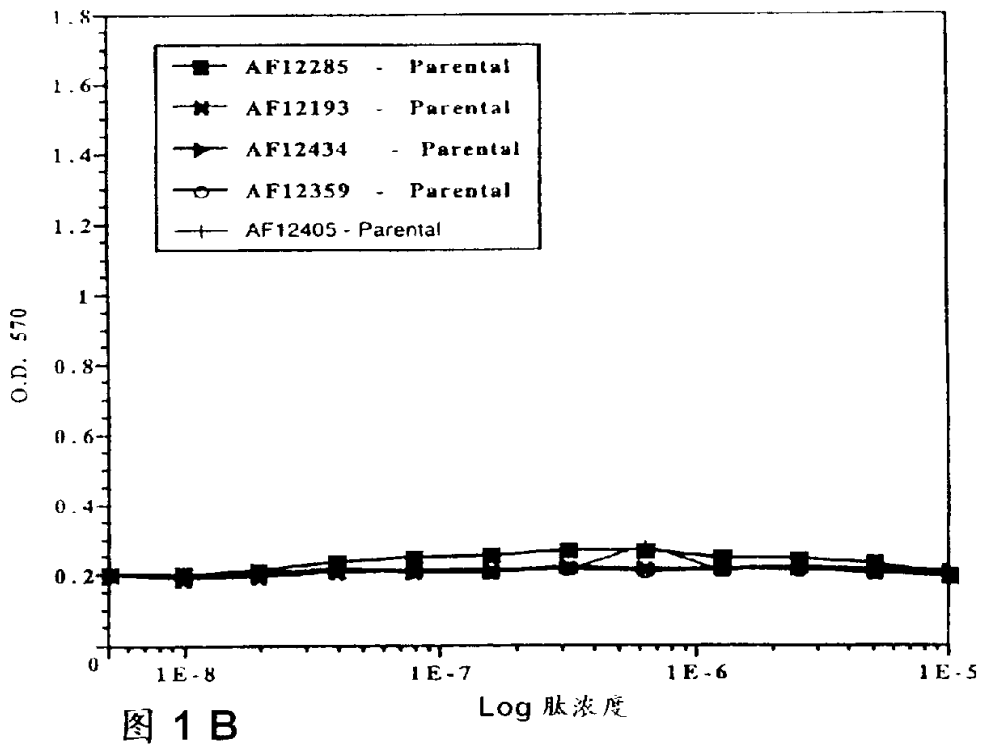


图 1 B

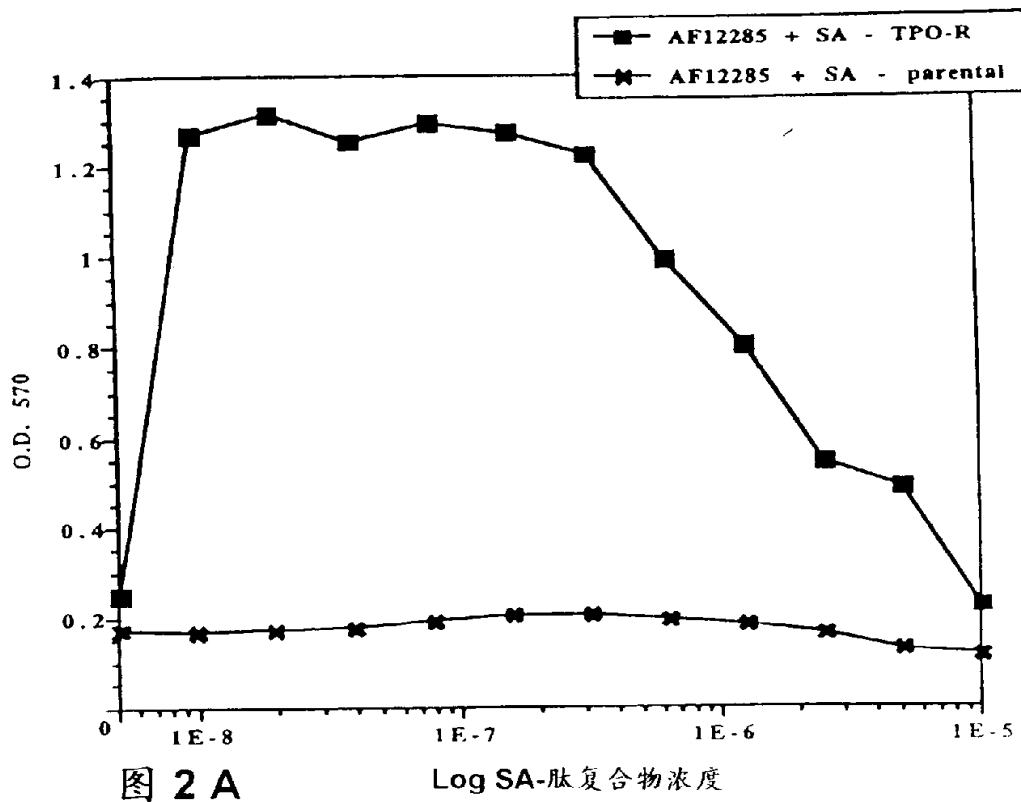


图 2 A

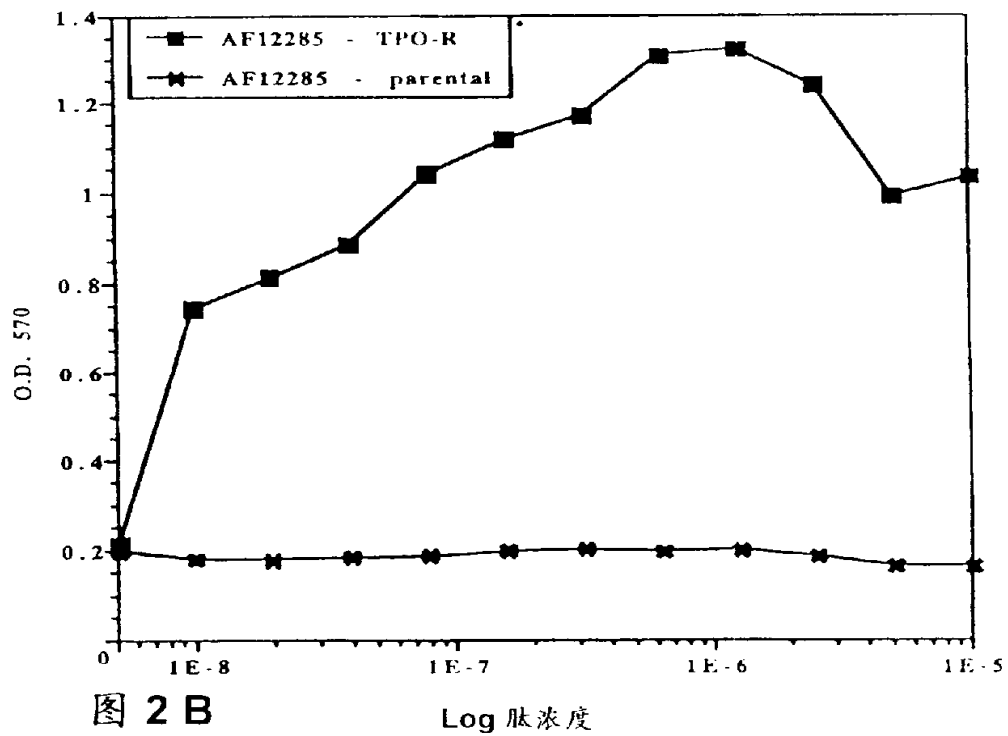


图 2 B

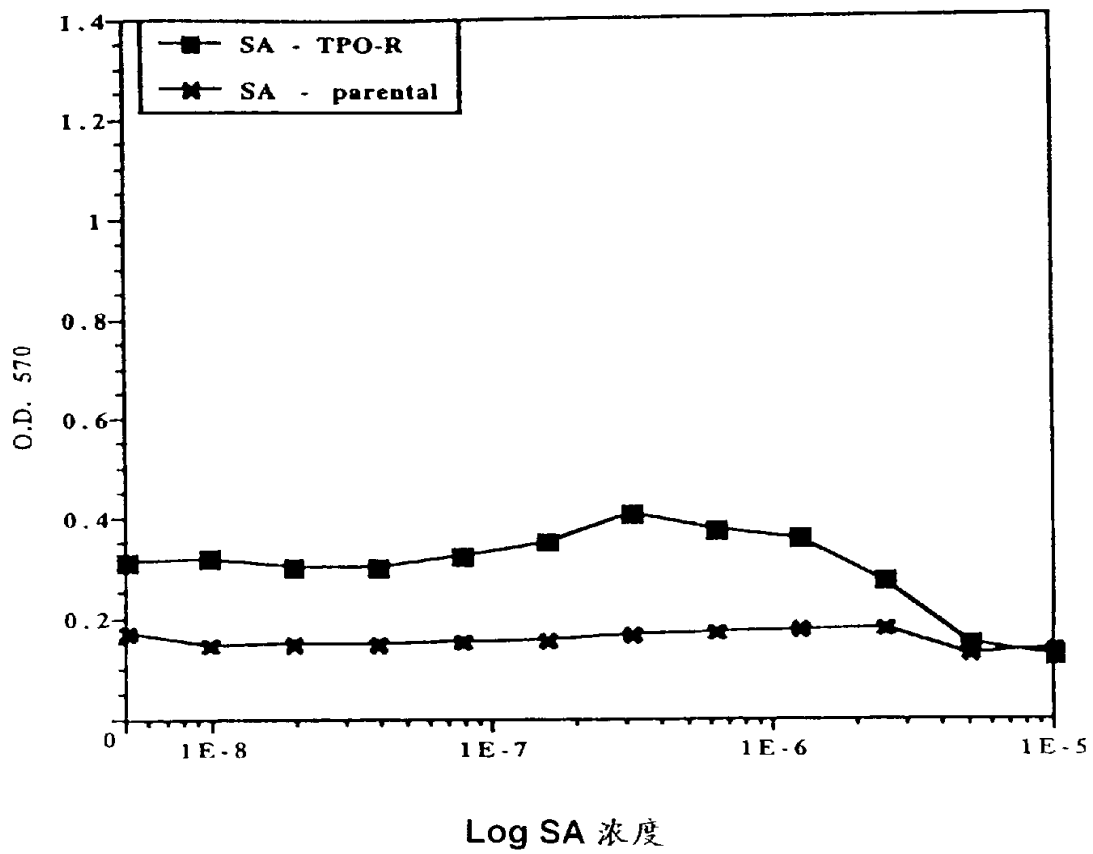


图 2 C

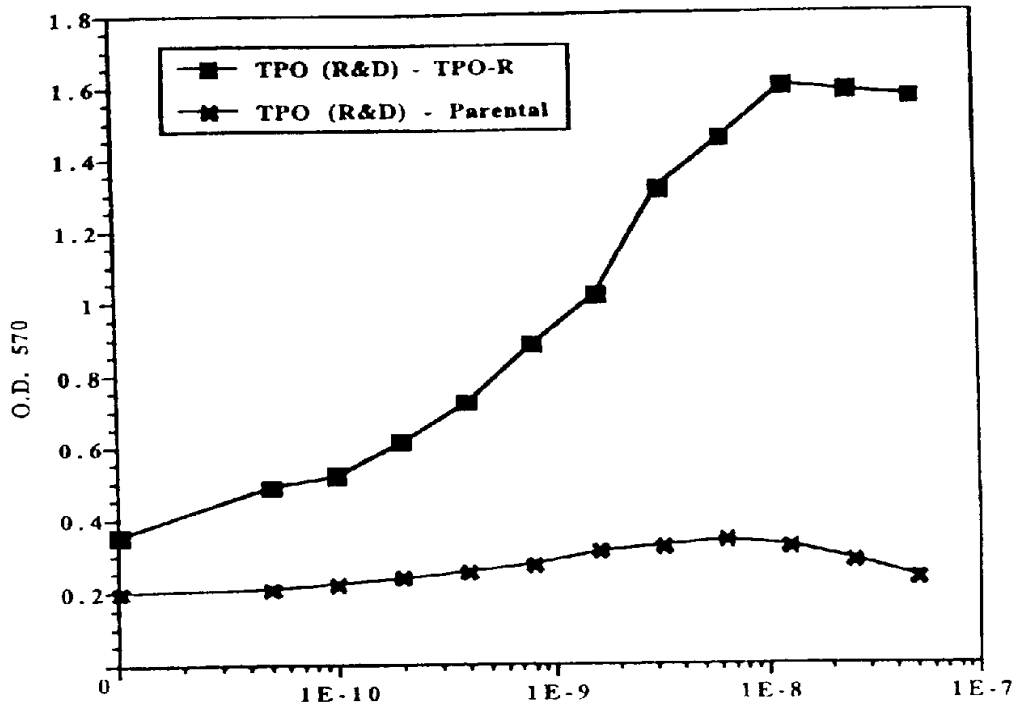


图 3 A Log TPO 浓度

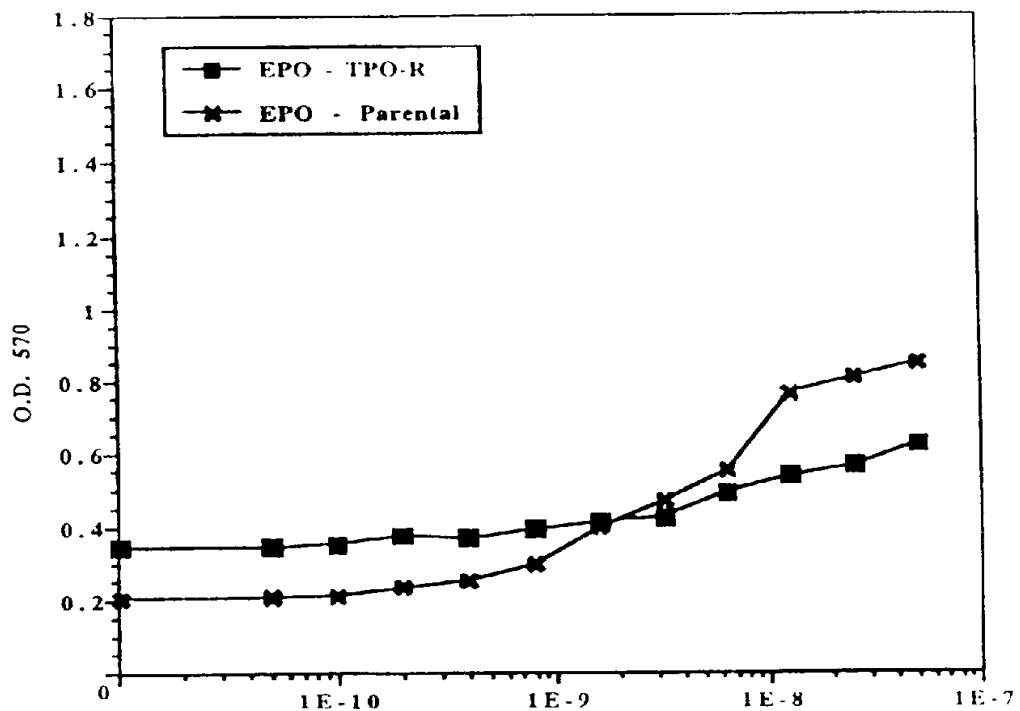


图 3 B Log EPO 浓度

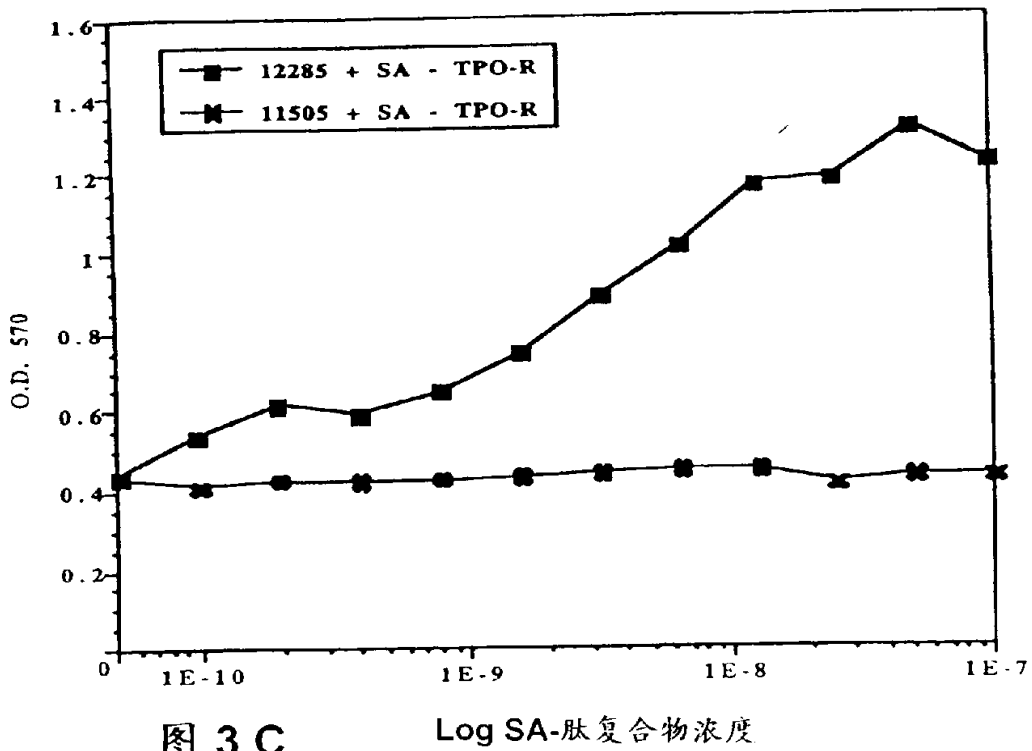


图 3 C

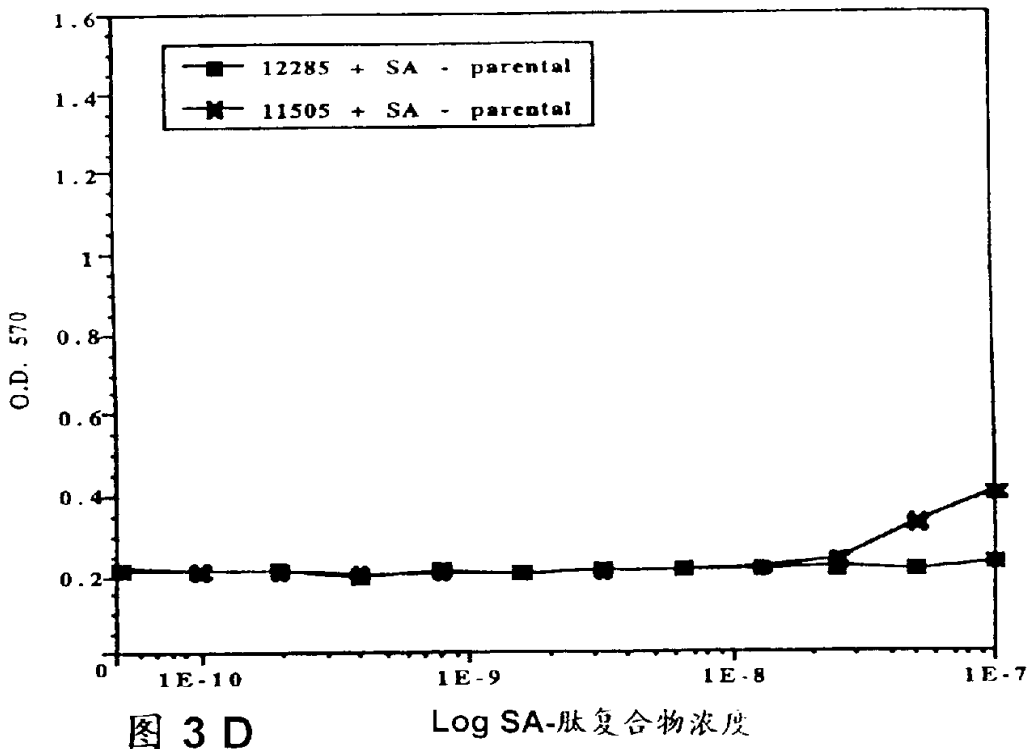


图 3 D

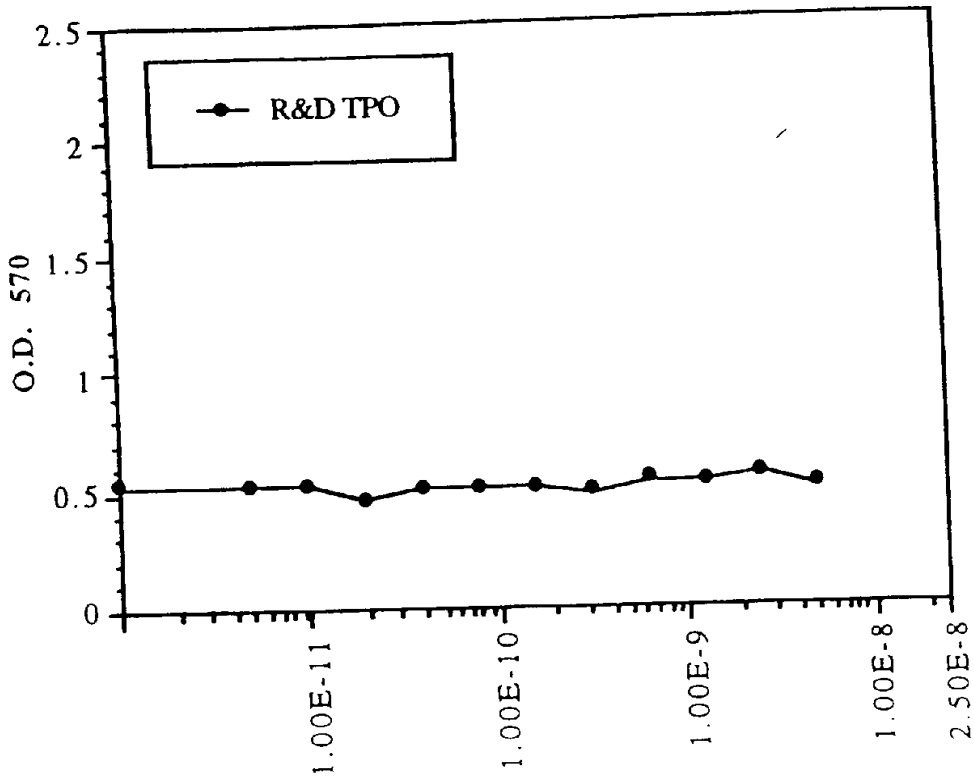


图 3 E Log TPO 浓度

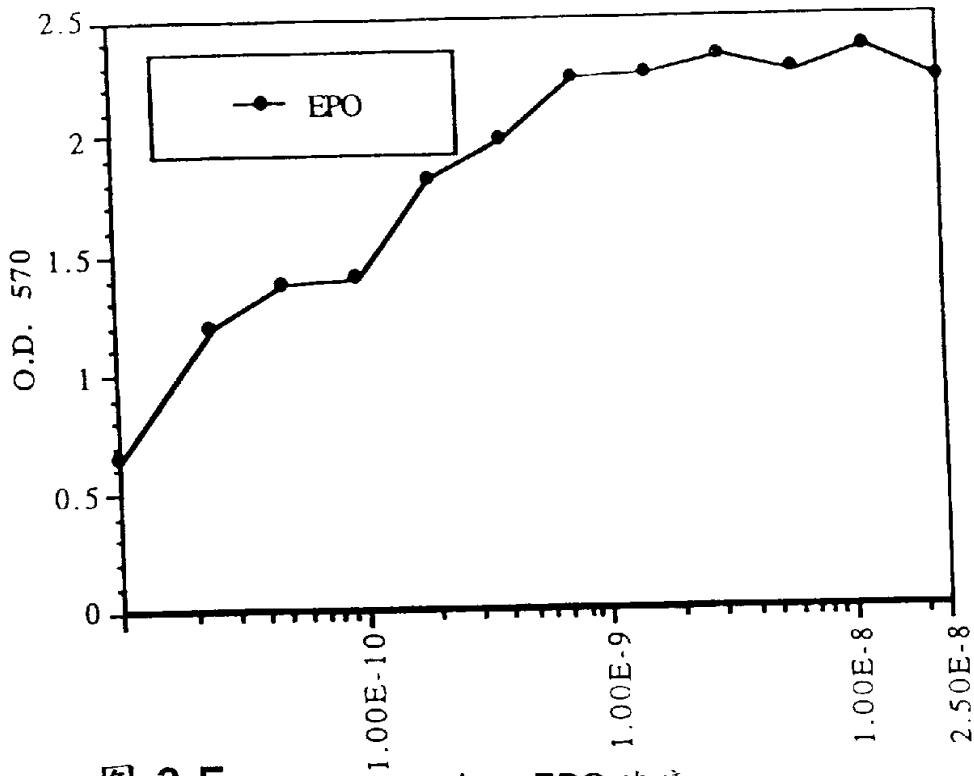


图 3 F Log EPO 浓度

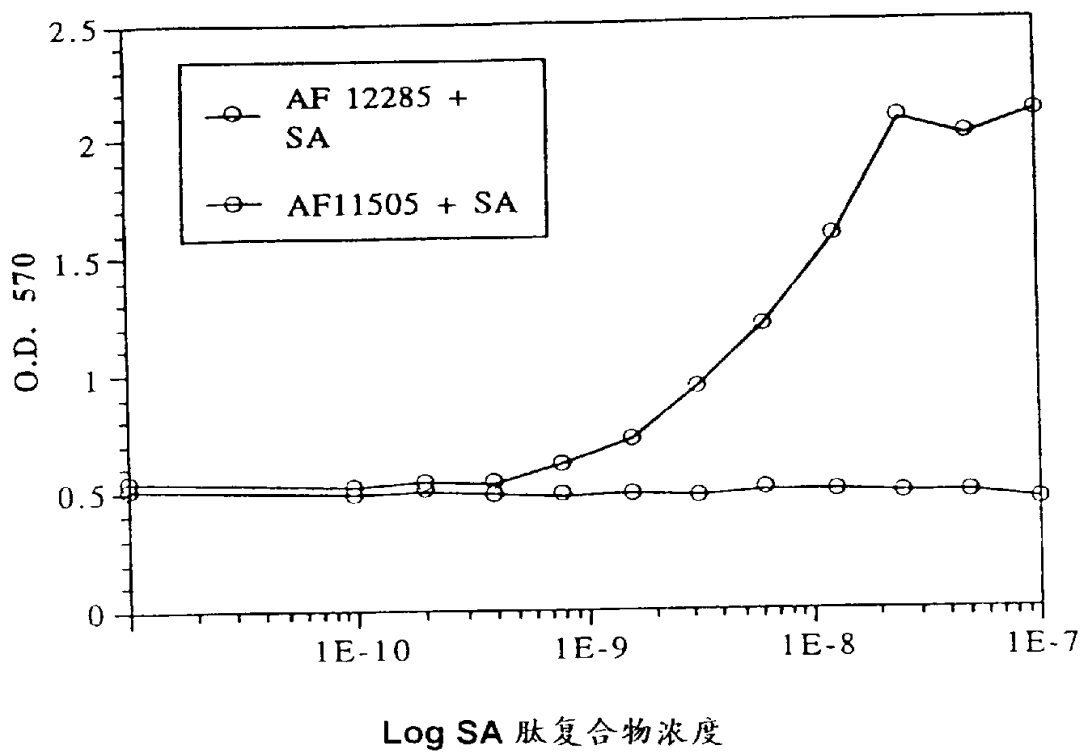


图 3 G

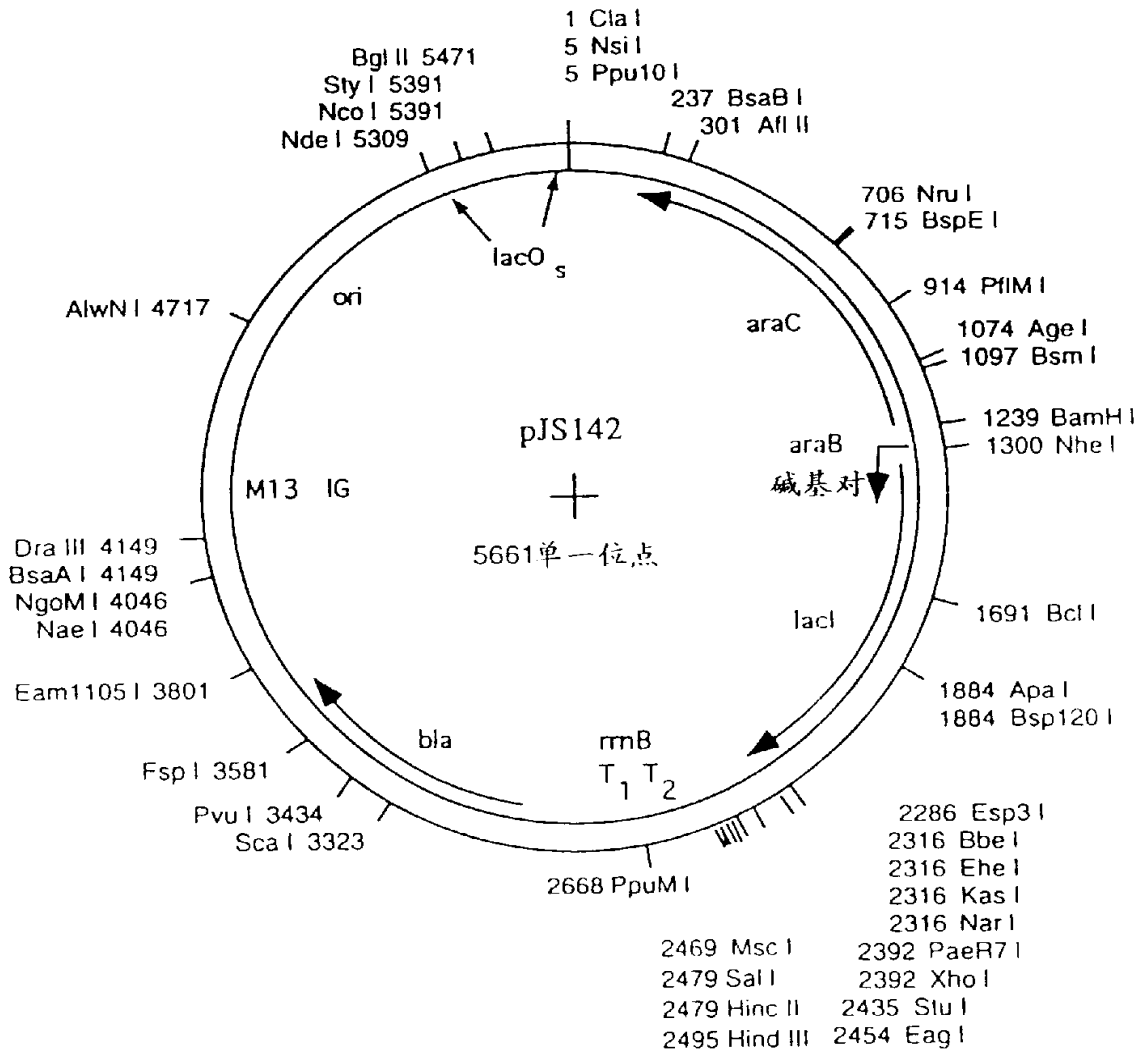
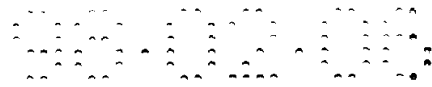


图4 A

pJS142 文库载体,克隆位点在lact基因引端

```

----lacI-----><-----接头----->
                Sfi I
                Stu I
Xho I          Eag I          Hpa I          Sfi I          Msc I          Sal I
L E S G Q V V H G E Q V G G E A S G A V N G R G L A G Q *
CTCGAGAGCGGGCAGgtggtgcatggggagcaggtgggtggtgagCCCTCCGGGGCCGTTAACGGCCGTGGCCTAGCTGGCCAAATAAgtcgcac
GAGCTCTCGCCCGTCcaccacgtaccctcgtccaccaccactcGGAGGGCCCGGCAATTGCCGGCACCCGGATCGACCCGGTTATTcagctg
    
```

图 4 B

SfiI消化后 建文库

```

----lacI-----><-----接头----->-----><-----文库----->
                BspE I
                Stu I
Xho I          Msc I          Sal I
L E S G Q V V H G E Q V G G E A S G G G Xn
CTCGAGAGCGGGCAGgtggtgcatggggagcaggtgggtggtgagCCCTCCG gagggtggt (NNK)n taactaagtaaagc TGGCCAAATAAgtcgcac
GAGCTCTCGCCCGTCcaccacgtaccctcgtccaccaccactcCGGA ggcctccacca attgattcatt TCGACCCGGTTATTcagctg
    
```

ON-829

ON-830

图 4 C

(a) pELM3/pELM15 MBP 载体克隆位点:

```

-----MBP-----> <-----接头-----> <-----Xa
                Sac I
Q   T   N   S   S   N   N   N   N   N   N   N   N   L   G   I   E
CAG ACT AAT TCG AGC TCG AAC AAC AAT AAC AAC AAT AAC AAC CTC GGG ATC GAG
GTC TGA TTA AGC TCG AGC TTG TTG TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA

```

```

Xa-----> <-----接头-----> <-----Xa
                Age I   Pml I   Sma I   EcoR I   BamH I   Xba I   Sal I   Pst I   Hind III
G   R   T   G   H   V   A   R   E   F   G   S   S   R   V   D   L   Q   A   S
GGA AGG ACC GGT CAC GTG GCC CGG GAA TTC GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TT
CCT TCC TGG CCA GTG CAC CGG GCC CTT AAG CCT AGG AGA TCT CAG CTG GAC GTC CGT TCG AA
                克隆位点

```

图 5A

(b) 亚克隆文库插入序列后的pELM3/pELM15

```

Xa-----> <-----接头-----> < 文库 >
                Msc I           Sal I
G   R   T   G   G   G   Xn *
GGA AGG ACC GGA GGT GGT (NNK)n TAA CTA AGT AAA GCT GGC CAA TAA GTC GAC
CCT TCC TGG CCT CCA CCA (NNM)n ATT GAT TCA TTT CGA CCG GTT ATT CAG CTG

```

图 5B

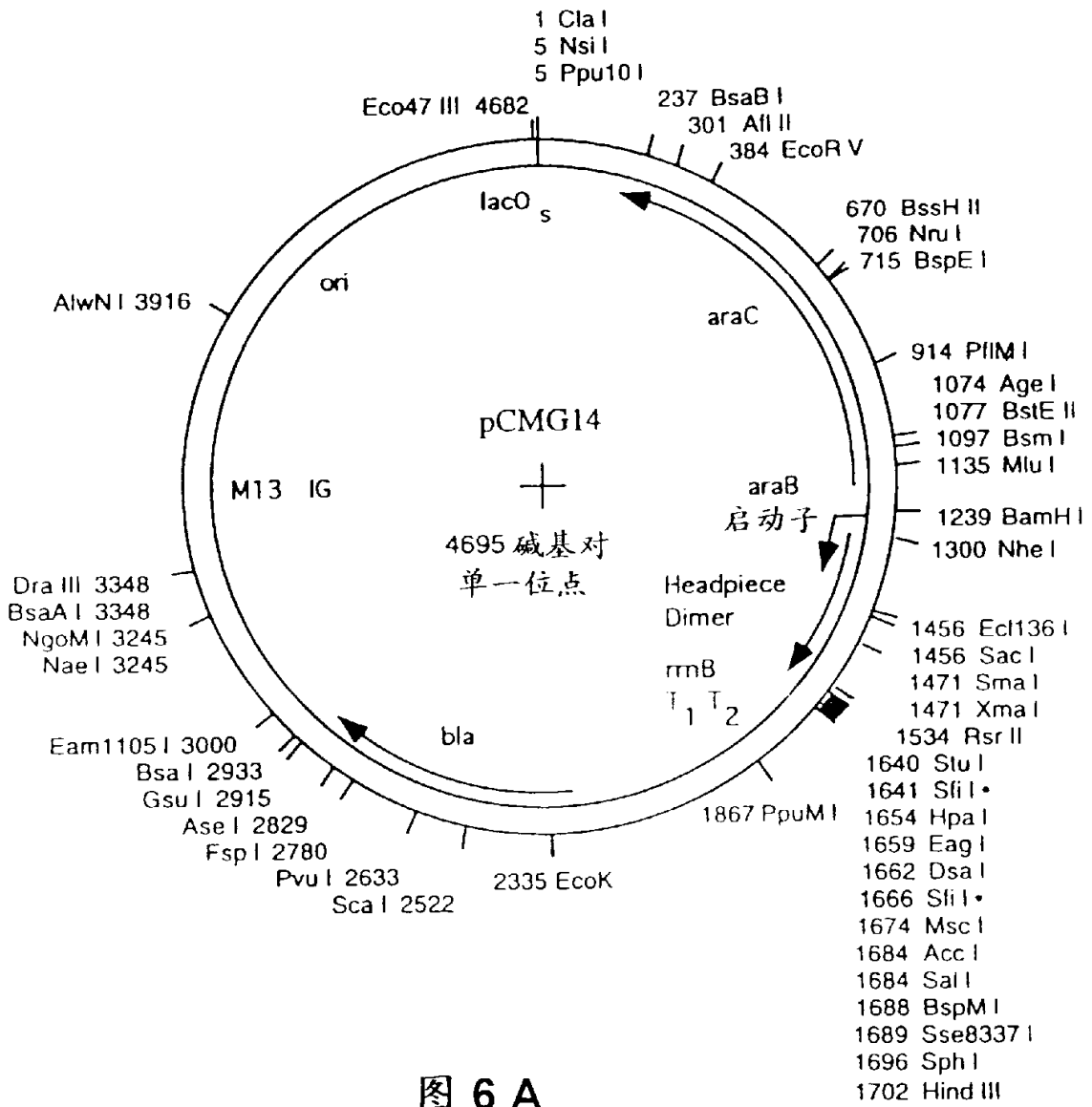


图 6 A

pcMG14 文库载体,克隆位点在头状二聚体基因3'端

```

----- 头状 -----><----- 接头 ----->
          Sfi I           Eag I
          Stu I           Hpa I           Sfi I           Msc I           Sal I
E A A M A E L N Y I P R S Q E A S G A V N G R G L A G Q *
GAAGCGCGGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCTCCGGGCGTTAACGGCCGTGGCCTAGCTGGCCAATAAgtcgac
CTTCGCCGCTACCGCCTCGACTTAATGTAAGGGGCCagctctcCGGAGGCCCGGCAATTGCCGGCACCCGGATCGACCCGGTTATTcagctg

```

图 6 B

2 SflI 消化后构建的文库

```

----- 头状 -----><----- 接头 ----->< 文库 ----->
          BspE I
          Stu I           Msc I           Sal I
Xho I
E A A M A E L N Y I P R S Q E A S G G G X12 *
GAAGCGCGGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCTCCGGTcgcaggagGCCTCCG gaggtggt (NNK)12 taactaagtaaagc TGGCCAATAAgtcgac
CTTCGCCGCTACCGCCTCGACTTAATGTAAGGGGCCagctctcCGGA ggcctccacca attgattcatt TCGACCCGGTTATTcagctg

```

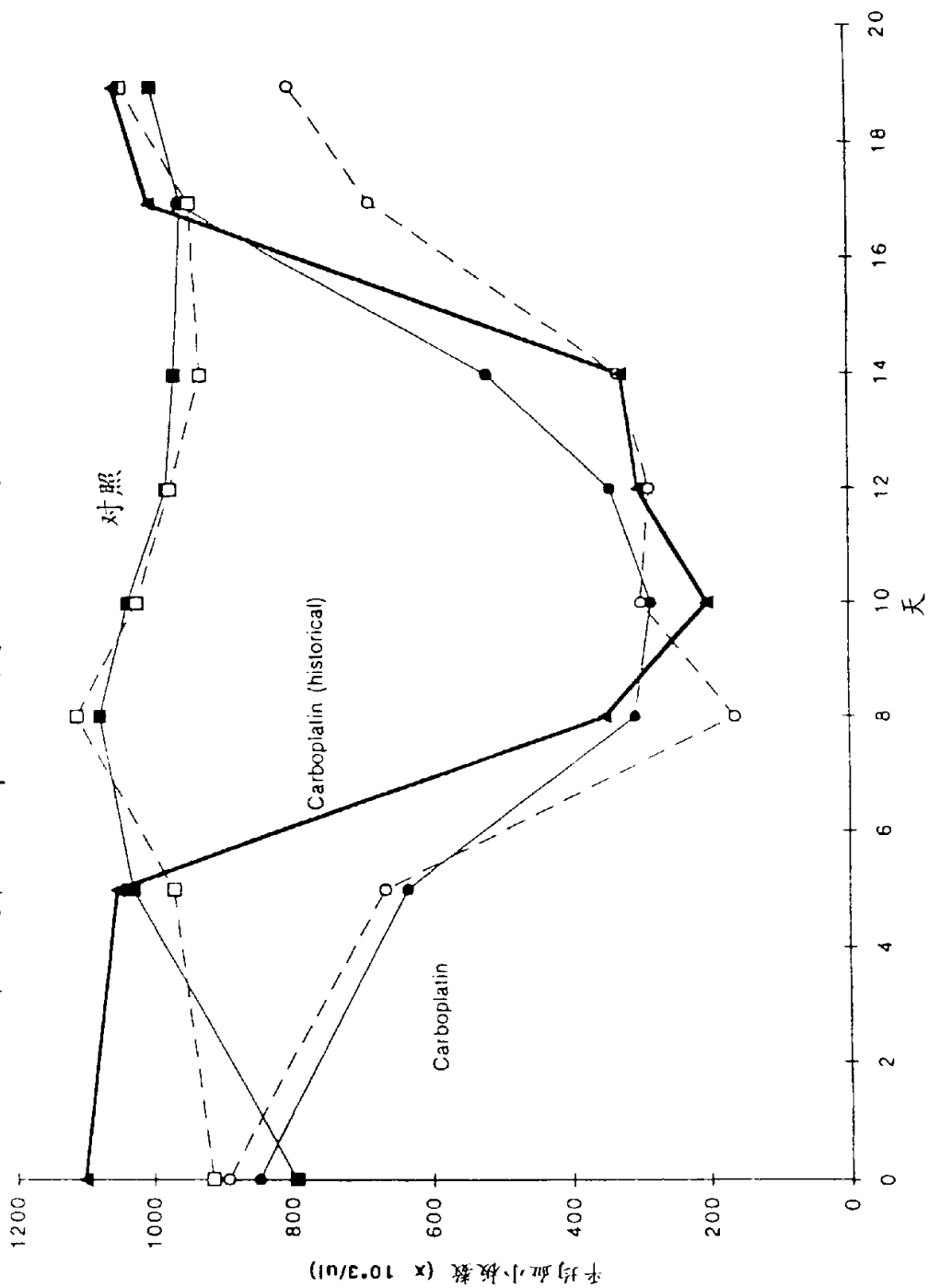
ON-1679

ON-829

ON-830

图 6 C

在小鼠中Carboplatin-诱导的血小板减小症



BALB/c 小鼠在第0天接受 carboplatin (125 mg/kg) on Day 0.

虚线代表三个实验的对照

实线代表三个实验中carboplatin处理组

和实线代表Ulich等以前的数据

图 7

Carboplatin 滴定对小鼠血小板数的影响

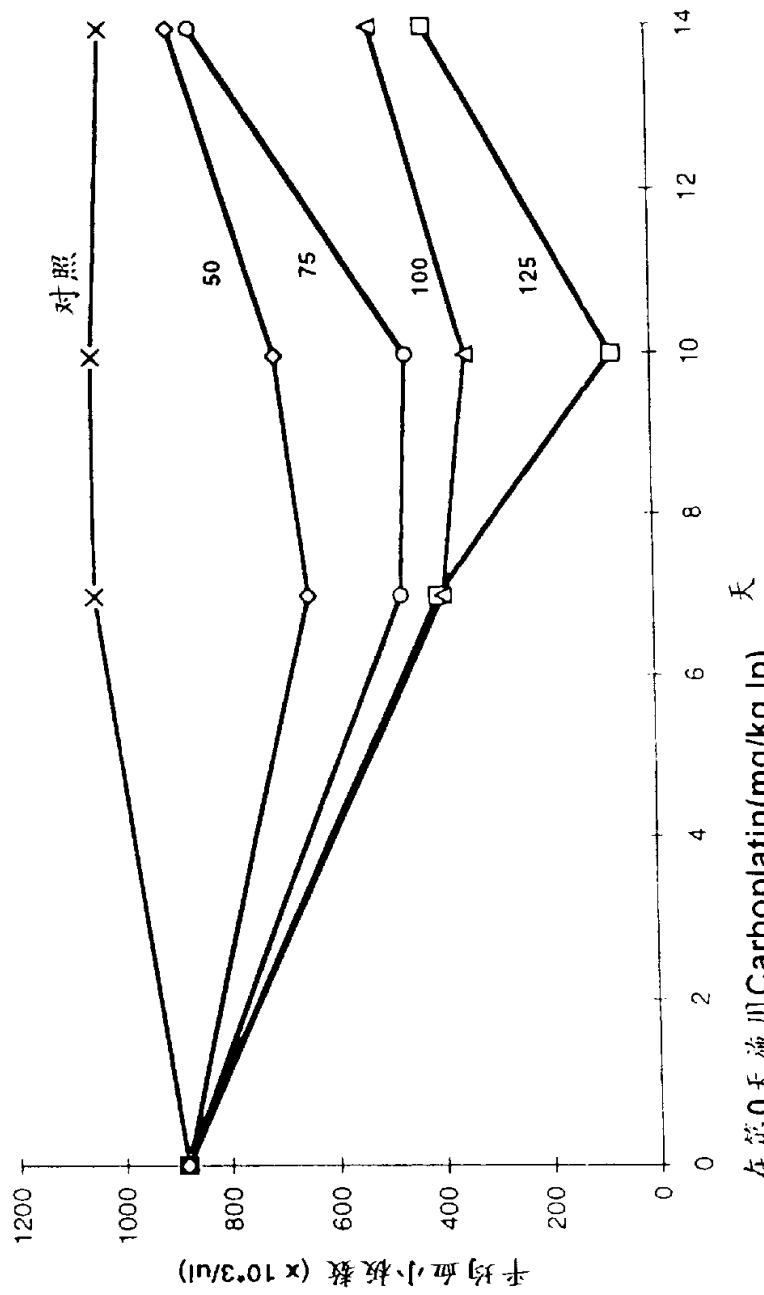
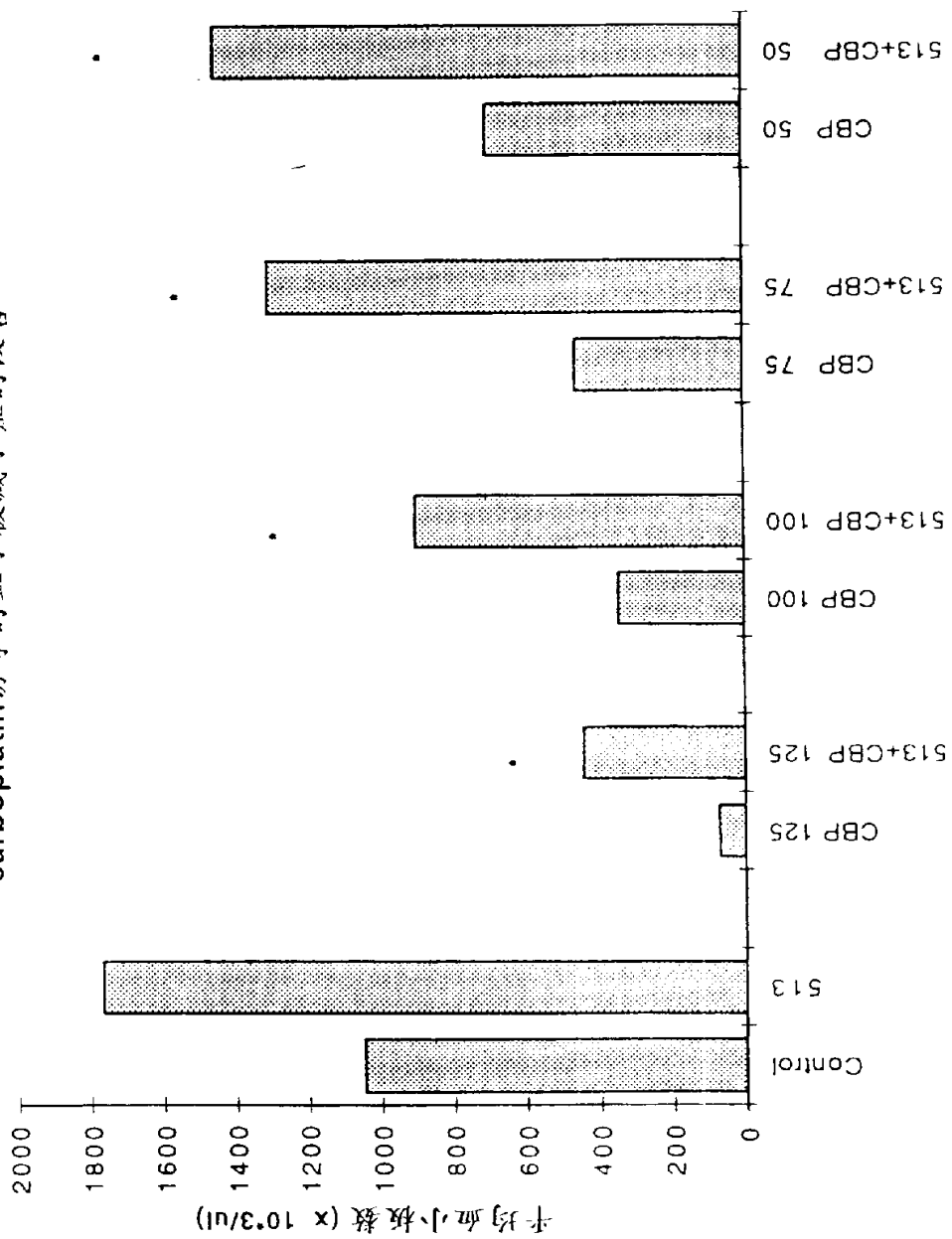


图 8

在第10天以AF12513滴定carboplatin对
carboplatin诱导的血小板减少症的改善



在第0天施用Carboplatin(cbp;125-50 mg/kg,ip)
在第1-9天施用AF12513(513;1 mg/kg,ip)

* p = < 0.05

图 9