РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG (11) 107214 A

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

7(51) G 01 N 33/68
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/12
C 07 K 14/715
C 07 K 16/28
A 01 K 67/027
A 61 K 48/00
A 61 K 38/17
A 61 K 38/10
A 61 K 31/70
A 61 K 39/395

(21) Регистров № 107214
(22) Заявено на 23.10.2002
(24) Начало на действие на патента от:

Приоритетни данни

(31) 00108075 (32) 25.04.2000 (33) EP

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 11 на 28.11.2003
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин № на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
PLIVA, FARMACEUTSKA INDUSTRIJA, DIONICKO DRUSTVO
ZAGREB (HR)

(72) Изобретател(и):
Tatjana Naranda
Lenard Olsson
Mountain Vieu (CA)

(74) Представител по индустриална собственост:
Фани Владимирова Божинова,
1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/EP01/04553, 23.04.2001

(87) № и дата на PCT публикация:
WO01/80873, 01.11.2001

(54) ПЕПТИД, МОДУЛИРАЩ ТРОМБОПОЕТИНОВИЯ РЕЦЕПТОР

(57) Изобретението се отнася до нови диагностични и фармацевтични състави за лечение на тромбоцитопения, по-специално до олигопептид с биологичната активност на TPO (тромбопоетин) рецепторен модулатор, състоящa се от 15 до 18 аминокиселини с обща формула

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

в която X_1 означава A R G или липсва, X_2 е R или A и X_3 е R A R или липсва.

33 претенции

BG 107214 A

Пептид, модулиращ тромбопоетиновия рецептор

Описание

Настоящето изобретение се отнася до олигопептид с биологична активност на съединение, модулиращо тромбопоетиновия (TPO) рецептор, нуклеотидни последователности които кодират олигопептида, вектори които включват нуклеотидните последователности, гостоприемникови клетки които включват векторите, антитела реактивни с олигопептидите, фармацевтични и диагностични състави, включващи олигопептидите, нуклеотидни последователности, антитела и/или гостоприемникови клетки, а така също и до методи за генетично модифициране на клетки, методи за модулиране активността на TPO рецептор (TPO- R) и методи за скрининг на други модулиращи TPO рецептора съединения.

Тромбоцитопенията е цироко разпространено заболяване, което се среща както като първично хематологично, така и като индуцирано неразположение. Пациенти, страдащи от остра тромбоцитопения са със сериозен риск за спонтанна хемолагия. Индуцираната тромпоцитопения може да бъде причинена от напр. трансфузия на костен мозък, хемотерапия на рак, облъчване или алергични реакции. Около 50 процента от всички

новодиагностицирани раково болни биват подлагани на някои форми хемотерапия и получават тромбоцитна трансфузия. Тромбоцитопенията поразява най- малко 25 процента от всички пациенти, претърпяли хемотерапия. Поради повторимите цикли на интензивна хемотерапия, се изчерпват кръвните тромбоцити, които предотвратяват кървенето и подпомагат възтановяването на кръвоносните съдове, лечението на рак много често следва да бъде преустановено, за да позволи възстановяването на необходимия брой тромбоцити. Невъзможността да бъде възстановено количеството на трамбацити причинява отлагане и/или ограничаване използването на последващи цикли на хемотерапия и понижаване шансовете за успешно лечение.

Лечението на тромбоцитопения най- напред е осъществяване чрез трансфузия на пресни тромбоцитни препарати, които са много скъпи и не са толкова достъпни като лекарство, колкото като инжекционна или орална форма за приложение и които биха повишили броя на тромбоцитите до нормалното ниво. Всяка година само в US приблизително 8 милиона единици тромбоцити се преливат на пациенти за редуциране риска от силно кървене. Поне 30 процента от трансфузиите водят до усложнения, обикновено фибрилни реакции, но понякога и бактеремия, болестта на присадка-срещу-гостоприемник, или остро белодробно увреждане. В 15 до 25 процента от пациентите, които изискват повторими трансфузии на тромбоцити, нарастването на тромбоцитите в отговор на това енеадекватно като резултат от HLA алоимунизация. В допълнение, тромбоцитните трансфузии са скъпи. По- специално, индуцираната от хемотерапия тромбоцитопения се ръководи понастоящем от тромбоцитна трансфузия и/или редуциране или отлагане на

хемотерапията до повишаване броя на тромбоцитите. Трансфузиите обаче, може да поставят пациентите в риск от кръвни инфекции като хепатит В и хепатит С, HIV инфекции и човешки Т-лимфотропен вирус, или за имунни реакции като треска. Редуциране дозите на хемотерапията или отлагане или стопиране на лечението може теоретично да позволи на раковите клетки да нарастват или да се разпространят. По този начин, налице е спешна нужда за създаване на ефективни лекарства за лечение на тромбоцитопения, което обаче, изисква детайлно разбиране на нейните молекулни и биохимични причини.

Мегакариоцитите са получени от костия мозък клетки, които са отговорни за продуциране циркулиращите кръвни тромбоцити. Макар и включващи само малка част от костно мозъчните клетки в повечето видове, те са с повече от 10 пъти по- голям обем от обикновените мозъчни клетки. Мегакариоцитите претърпяват ендомитоза, при което тяхното ядро се реплицира, но клетките не успяват да се разделят, и поради това се превръщат в полиплоидни клетки. В отговор на понижения брой тромбоцити, скоростта на ендомитозата се повишава, формират се мегакариоцити с по-голяма плоидност и броя на мегакариоцитите може да се повиши до трикратно. В противоположност, в отговор на повишения брой тромбоцити, скоростта на ендомитозата се понижава, формират се по- нископлоидни мегакариоцити и броя на мегакариоцитите може значително да се понижи. Точния механизъм на физиологична обратна връзка, чрез който масата циркулиращи тромбоцити регулира скоростта на едномитозата и броя на костно моозъчните мегакариоцити не е известен. Циркулиращия тромбопоетичен фактор, включен в медиацията на тази обратна връзка понастоящем

се счита че е ТРО, гликопротеин който се среща в най- малко две форми притежаващи молекулни маси от 25 и 31 Kda, с общ N- край и регулиращи продуцирането на червените кръвни клетки. Показано е, че ТРО е основен регулатор на мегакариоцитопоезата, както *in vivo,* така и *in vitro*. ТРО инициира нейните биологични ефекти чрез свързване към *c-mpl* (наречен по- нататък ТРО-R), който е член на хематопоетиновото рецепторно суперсемейство. По- специално показано е, че ТРО е основния хуморален регулатор в ситуации, включително тромбоцитопения. Показано е в различни изследвания, че ТРО повишава броя на тромбоцитите, повишава размера на тромбоцитите и повишава включването на изотопи в тромбоцитите на реципиенти животни. По- специално, ТРО се счита, че повлиява мегакариоцитопоезата по различни начини: (1) води до повишаване размера и броя на мегакариоцитите; (2) предизвиква повишение в съдържанието на ДНК, под формата на полиплоиди, в мегакариоцитите; (3) повишава мегакариоцитната ендомитоза; (4) предизвиква повишено съзряване на мегакариоцити; и (5) предизвиква повишение в процента на прекурсорните клетки, под формата на малки ацетилхолинестеразно- позитивни клетки и в костния мозък.

Тъй като тромбоцитите са необходими за съсирването на кръвта и когато техния брой е много малък, пациента е пред сериозен риск от смърт от катастрофална хеморагия, ТРО има потенциално полезно приложение както за диагностика, така и за лечение на различни хематологични нарушения, например, заболяване дължащо се първично на тромбоцитни дефекти. В допълнение, последните изследвания предлагат база за проектирането на ефективността на ТРО терапията при лечение на

тромбоцитопения, и по- специално тромбоцитопения, резултат от хемотерапия, радиационна терапия и костно мозъчна трансплантация като лечение на рак или лимфома (*McDonald (1992) Am. J. Ped. Hematology/ Oncology 14:8-21*).

Генът, клониращ TPO е клониран и охарактеризиран (*Kuter et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11104- 11108; Barley et al. (1994) Cell 77: 1117- 1124; Kaushansky et al. (1994) Nature 369:568-571; Wendling et al. (1994) Nature 369:571-574; and Savage et al. (1994) Nature 369: 533-538*).

Рекомбинантния тромбопоетин (означен по- нататък *rTPO*) е единственото специфично конструирано съединение, получено понастоящем, което вероятно е ефективно за лечение на тромбоцитопения. То действа като тромбоцит- индукторно лекарство по време на тромбоцитопенията. Показано е, че екзогенното прилагане на единична доза от *rTPO* най- общо се асоциира с повишение броя на тромбоцитите. В някои случаи, то може да повиши мегакариоцитният отговор и поради това да причини тромбоцитни усложениня. Предполага се, че макар тромбоцитопенията да не води до агрегация на тромбоцитите в отсъствие на известни агонисти (тромбин, колаген), тя прави тромбоцитите чувствителни на агрегаторните ефекти на тези средства. Такова "обработване" е документирано *in vivo*. Тромбоцити, получени от лекувани от тромбоцитопения животни, притежават повишена чувствителност на вещества, стимулиращи тромбоцитната агрегация. Така, TPO може да влоши тромбогенните условия, и риска следва внимателно да бъде преценен преди да бъде прилаган на пациенти. Също така, зрелите тромбоцити

отстраняват тромбопоетина от разтвор, и в тромбоцитопенични животни, концентрацията на тромбопоетин в плазмата пада скоро след трансфузията на тромбоцити и нараства само след като броя им отново нарастне. Този факт, че тромбоцитите могат да отстранят TPO от циркулацията има най- малко две клинични следствия:

i) тромбоцитните трансфузии може да блокират възстановяването на мегакариоцитите; ii) свързването на TPO към съществуващите тромбоцити може да блокира отговора на ендогенния TPO спрямо миелосупресивна терапия. Но тъй като съществуващите тромбоцити продължават да свързват TPO, повишаването на концентрацията на TPO се отлага докато се намеси тромбоцитопенията, много дни по- късно. В допълнение, когато срязаната форма на *rTPO* се дава като единично, конюгирано с PEG количество, терапията в някои случаи се свързва с развитието на тромбоцитопения и неутрализирането на антителата.

В допълнение към rTPO, различни други рекомбинантни цитокини (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF, Steel Factor и промегапоетин- IL- 3- тромбопоетин фузионен протеин) имат директен и индиректен стимулаторни ефекти в *in vivo* и *in vitro* клетки на мегакариоцитната линия. Обаче, повечето от тези вещества не притежават блогоприятни ефекти върху възстановяването на тромбоцитите след миелосупресивна терапия или имат неприемливи токсични ефекти. В противоположност на това, IL-11 е доказано както ефективен, така и относително безопасен. IL-11 се използва за редуциране необходимата тромбоцитна трансфузия в ракови пациенти, получаващи хемотерапия. Когато се дава субкутанно в дневно разпределение, IL-11 индуцира повишение в

броя на тромбоцитите в раково болни. Обаче, наблюдавани са противоположни ефекти на лекарството, дължащи най- напред на увеличаване обема на плазмата (атриална (на предсърдието) аритмия, палпитация, периферна едема, главоболие, диспнея, анемия, миалгии, нарастване на теглото, анорексия, нозея) и при някои раково болни формирането на антитела (по- долу онези, считани за неутрализиращи). IL-11 само се явява подходящ за пациенти, с изразена остра и лимитираща терапията тромбоцитопения, или който е необходим преди тромбоцитна трансфузия. Не се препоръчва за рутинна употреба при атенюирана тромбоцитопения.

ДНК последователностите е кодираните пептидни последовталености за човешки TPO- R също са описани (*Vigon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5640-5644).* TPO- R е член на семейството рецептори на тромбопоетиновия растежен фактор, семейство което се характеризира с обща структурна организация на екстрацелуларната област, включително четири консервативни цистеинови остатъка в N- крайната част.

Достъпността на клонирани гени за TPO- R улеснява търсенето за агонисти на този важен рецептор. Достъпността на рекомбинантния рецепторен протеин позволява изследването на взаимодействие рецептор- лиганд в различни случайни и полу-случайни пептидни системи от различни поколения.

WO 99/42127 описва TPO- рецепторен пептид (в следващия наречен TPO-Rp див тип), състоящ се от 23 амино киселини, които съответстват на амино киселини 444 до 446 от човешкия TPO- Rp.

Описан е метод за модулиране активността на TPO-R чрез прилагане на TPO- Rp към рецептора. Обаче, специфично лечение на тромбоцитопения не е описано.

Различни автори докладват делеционни мутанти на TPO-R, които позволяват анализа на структурно- функционални взаимоотношения: *Dorsch et al., J. Exp. Med. (1997) 186, 1947- 1955, Drachman and Kaushansky, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94, 2350- 2355, Porteu et al., Mol. Cell. Biol. (1996), 2473- 2482 and Takatoku et al., J. Biol. Chem. (1997) 272, 7259- 7263.*

Известни са и други пептиди, агонисти на тромбопоетиновия рецептор, например от *Kumura et al.* (*J. Biochem. (1997) 122, 1046- 1051, Biochem. Mol. Biol. Int. (1998) 44, 1203- 1209*), който описва пептид с 15 амино киселини от случайна фагова пептидна библиотека, който стимулира пролиферацията на тромбопоетин зависими клетки и диференциацията на миши костно мозъчни клетки до мегакариоцити. *Cwirla et al.* описва 14 амино киселинен пептид, агонист на тромбопоетиновия рецептор, който стимулира *in vitro* пролиферацията и съзряването на мегакариоцитите от човешки костно мозъчни клетки (Science (1997) 276, 1696- 1699).

Тук не е описано дали тези делеционни мутанти на TPO- R или агонисти пептиди са доказано полезни като имитатори на тромбопоетина с потенциал да бъдат развити в стабилно и фармацевтично ефективно лекарство.

Така техническият проблем в настоящето изобретение е да се предложи ефективно съединение, полезно за диагностициране и

лечение на хематологични нарушения като идиопатия и индуцирана тромбоцитопения, по- специално хемотерапия, индуцирана от алергия или облъчване тромбоцитопения, доколкото е нетоксична е стабилна.

Настоящето изобретение решава горния проблем чрез осигуряване на изолиран и пречистен олигопептид с биологична активност на TPO-R модулатор включващ, по- специално състоящ се по същество, за предпочитане състоящ се от 15 до 18 амино киселини и имащ общата формула

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

X_1 е A R G или отсъства,

X_2 е R или A,

X_3 е R или A и

X_4 е R A R или отсъства.

В специално предпочитан вариант на настоящето изобретение, олигопептида включва, по- специално се състои по същество, за предпочитане се състои от амино киселинна последователност, както е определена в която и да е от SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5 или 6, които са изцяло включени в настоящето описание.

Настоящето изобретение *inter alia* е основано на факта, че посочените по- горе олигопептиди модулират активността на TPO- R,

по- специално силно свързва и активира TPO- R и също подобрява използването на ендогенна TPO. Олигопептидите от настоящето изобретение поради това показват най- малко две различни активности, наречен (i) модулиращ ефект върху TPO- R активността, например агонистичен ефект или антагонистичен ефект и (ii) синергистичен ефект заедно с TPO, по- специално когато двете съединения присъстват в субмаксимални концентрации. Синергистичния ефект е от специално значение, т. к. предлага клинични преимущества над употребата на TPO самостоятелно.

Нещо повече, олигопептидите от настоящето изобретение показват много висок потенциал и ефективност, напр. са активни в интервала nM до μM. Олигопептидите от настоящето изобретение могат да бъдат приложени самостоятелно или в комбинация с TPO. В противоположност на TPO, олигопептидите от настоящето изобретение не водят до низходяща регулация на TPO рецептора и поради това до редуцирана чувствителност на TPO. В противоположност на това, екзогенното прилагане на TPO може да води до такова рецепторно низходящо регулиране и поради това редуцира чувствителността или индуцирането на толеранс. Олигопептидите от настоящето изобретение по- нататък са много селективни за TPO- R и не показват например кръстосана реактивност с близко родствен еритропоетинов рецептор.

Олигопептидите от настоящето изобретение се свързват към TPO- R при едно изцяло различно място от TPO. Настоящите олигопептиди не взаимодействат с TPO свързването, но вместо двата компонента могат да се свържат към същата рецепторна молекула. При условия на активност, тези свойства на свързване

водят до синергистично действие между TPO и настоящите олигопептиди, които са наблюдавани в клетъчни сигнални изпитвания, където настоящите олигопептиди и TPO, когато са давани самостоятелно в субмаксимални концентрации, дават около 20% от максималния сигнал, измерен чрез субстратна фосфорилация, но когато са давани заедно при еднакви концентрации, дават максимален сигнал. Настоящите олигопептиди обръщат низходящата регулация на TPO- R когато TPO се дава при много високи дози. Добавянето на настоящите олигопептиди с висока концентрация на TPO, води до сигнална трансдукция на TPO-R. Посредством тяхното специфично свързване към TPO- R, настоящите олигопептиди са способни да индуцират рецепторната конформация, така че да е благоприятна за сързване и по този начин да активират субстратите по пътя на обмяна на сигналите. Така, настоящите олигопептиди, освен тяхния собствен агонистичен ефект върху сигналния път на обмяна на TPO- R, когато са давани заедно с природния хормон TPO, разширява границата на TPO активността, действа в синергизъм с TPO при суб-максимални концентрации на веществата и обръщат ефекта на *"bell- shaped"* крива при високи концентрации на хормона.

Настоящето изобретение по- нататък показва, че TPO- Rp див тип също притежава активности, полезни за специфично третиране на хематологични неразположения и в частност тромбоцитопения. Така, олигопептидите от настоящето изобретение, а така също и дивия тип TPO- Rp очевидно са особено полезни за диагностициране и по- специално лекуване на хематологични неразположения, например заболявания дължащи се на тромбоцитни нарушения и всички розлични типове тромбоцитопения както самостоятелно, така

и заедно с TPO или тромбоцити. Поради техния малък размер и висока стабилност във фармацевтични състави, олигопептидите от настоящето изобретение са предпочитани, т. к. те позволяват *inter alia* орално приложение. По- нататък те показват висока степен на стабилност *in vivo*.

Без да е свързано с теория, очевидно олигопептидите от настоящето изобретение *inter alia* модулират TPO- R активностите. Така, свързването на TPO води до рецепторна димеризация и активация на интрацелуларния път на обмен на сигналите. По време на това събитие протича специфична фосфорилация на рецепторно свързаните кинази от JAK киназните семейства (JAK2 и Tyk2) и последващо фосфорилиране и димеризация на транскрибционния фактор STAT5. Активираният STAT5 протеин навлиза в ядрото и се свързва към промоторния участък от мишенните гени, стимулиращи клетъчна пролиферация и повишаващи броя на тромбоцитите. Обаче, макар че описаният по- горе див тип механизъм на действие може да бъде валиден също за настоящите олигопептиди, не може да бъде изключено настоящите олигопептиди да действат поотделно, напр. чрез свързване към рецепторен мономер и така имитирайки втората верига от рецептора или свързване към места от рецептора, където природния TPO не се свързва. Фактически, очевидно настоящите олигопептиди действат в различно място в сравнение с природния TPO.

Настоящето изобретение се отнася също до Y14F субституционен мутант, производен на дивия тип TPO- Rp, т.е. див тип TPO- Rp, където тирозина в позиция 14 от дивия тип TPO- Rp е заместен с фенилаланин. Такъв модифициран пептид може да

докаже специална способност за осъществяване напр. на изследване на пептидно разграждане, доколкото такъв пептид може да бъде специфично йодиран в неговия N- или C- край.

Олигопептидите от настоящето изобретение и дивият тип TPO-Rp са приложими за предотвратяването и лечението на заболявания, медиирани от TPO, и по- специално за лечение на хематологични нарушения, включително но без да се ограничава до, тромбоцитни нарушения и тромбоцитопения, резултат от алергични реакции, хемотерапия, радиационна терапия или костно мозъчни трансфузии или идиопатична тромбоцитопения. Така, настоящето изобретение предлага също метод за лечение на посоченото по-горе наршение, където пациент притежаващ нарушение, което е податливо на лечение с TPO- Rp модулиращо съединение, в частност TPO агонист получава, или му се прилага, терапевтично ефективна доза или количество олигопептид от настоящето изобретение и/или див тип TPO- Rp.

Изобретението предлага също фармацевтични състави, включващи един или повече олигопептида или/и див тип TPO- Rp, описан тук и физиологично приемлив носител. Тези фармацевтични състави може да бъдат различни по форма, включително орални, като инхалационни прахове и разтвори и инжекционни и инфузионни разтвори.

В специално прдепочитан вариант на изпълнение от настоящето изобретение, такъв състав и метод включва също използването на TPO в комбинация с дивия тип TPO- Rp и/или олигопептидите от настоящето изобретение.

Следващите определения са приведени да илюстрат и дефинират значението и обхвата на различни термини, използвани да опишат настоящето изобретение.

Терминът "трансформация" или "трансфекция" означава действието, което е причина гостоприемниковата клетка да съдържа желаната молекула нуклеинова киселина, включително както природната TPO- Rp нуклеотидна последователност, така и нуклеотидната последователност, кодираща настоящите олигопептиди, които не произхождат от дадената клетка или не са в природната локализация, брой копия или ориентация с помощта на методи известни в областта.

Под "оперативно свързан" се разбира, че ген и най- малко една регулаторна последователност са свързани в смислова или безсмислена експресия по такъв начин, че да позволи генна експресия когато подходящите молекули (напр. транскрибционни активаторни протеини) са свързани към регулаторната последователност.

Терминът "вектор" се отнася до рекомбинантна ДНК структура, която може да бъде плазмид, вирус или автономно репликираща се последователност, фаг или нуклеотидна последователност, линеарна или кръгова, с едно или двуверижна ДНК или РНК, получени от който и да е източник, в който са свързани множество от нуклеотидни последователности или рекомбинирани в уникална структура, която е способна да въведе промоторен фрагмент и ДНК последователност за избрания генен продукт в смислова или

безсмислена ориентация заедно с подходяща 3' нетранслирана последователност в клетка.

"Плазмиди" са генетични елементи, които се онаследяват стабилно без да бъдат част от хромозомата на гостоприемниковата им клетка. Те могат да включват ДНК или РНК и могат да са линеарни или кръгови. Плазмидите кодират молекули, които осигуряват тяхната репликация и стабилно онаследяване по време на клетъчната репликация и може да кодират продукти с относително значение за медицината, селското стопанство и околната среда. Те може да кодират също гени, които придават устойчивост към антибиотици. Плазмидите са широко използвани в молекулярната биология като вектори за клониране и експресия на рекомбинантни гени. Изходните плазмиди, описани тук са както търговско достъпни, публично достъпни, така и могат да бъдат конструирани от достъпни плазмиди чрез рутинно приложение на добре известни, публикувани процедури. Много плазмиди и други клониращи и експресионни вектори, които могат да бъдат използвани в съответствие с настоящето изобретение са добре известни и достъпни на специалистите в областта. Нещо повече, специалиста в областта може да конструира лесно всякакво количество от други плазмиди, подходящи за използване в изобретението. Свойствата, структурата и използването на такива плазмиди, а така също и други вектори, в настоящето изобретение ще бъдат очевидни за специалиста в областта от настоящето описание.

Терминът "гостоприемникова клетка" се отнася до клетка, която е генетично модифицирана чрез трансфер на химерна,

хетероложна или автоложна нуклеиново киселинна последователност или нейни производни, които все още съдържат тази последователност. Тези клетки са наречени също "трансгенни клетки". В случая когато е трансферирана автоложна нуклеиново киселинна последователност, последователността ще присъства в гостоприемниковата клетка в по- голям брой копия, в друга генетична среда или друга ориентация по сравнение с природно срещаната.

Под "твърда повърхност" се разбира неразтворим матрикс, както биологичен по природа, като, без ограничение, клетка или бактериални частици, така и синтетичен, като, без ограничение, акриламидно производно, целулоза, найлон, силициеви или магнетизирани частички, към които могат да бъдат присъединени или свързани разтворими молекули.

Терминът "антитяло" се отнася до полипептид, кодиран от имуноглобулинов ген или имуноглобулинови гени, или техни фрагменти, които се свързват специфично и разпознават един антиген. Разпознатите имуноглобулинови гени включват каппа, ламбда, алфа, гама, делта, епсилон и му гени от константстантни участъци, а така също и мираидните имуноглобулинови гени от вариабилни участъци. Антитела съществуват, напр., като интактни имуноглобулини или като множество добре охарактеризирани фрагменти, продуцирани чрез разграждане с различни пептидази. "Антитяло" се отнася също до модифицирани антитела (напр. олигомерни, редуцирани, оксидирани и маркирани антитела). Терминът "антитяло", както е използван тук, включва също антитяло фрагменти, продуцирани както чрез модификацията на пълни

антитела, така и такива, синтезирани *de novo* с помощта на рекомбинантни методики. Терминът "антитяло" включва интактни молекули, а така също техни фрагменти, като Fab, $F(ab')_2$ и Fv, които са способни да свържат епитопната детерминанта. Тези антитяло фрагменти обладават известна способност селективно да свързват своя антиген или рецептор и са определени както следва:

1) Fab, фрагмента който съдържа моновалентен антиген-свързващ фрагмент от антитяло молекула, може да бъде продуциран чрез разграждане на пълно антитяло с ензима папаин за достигане на интактна лека верига и част от една тежка верига;

2) Fab', фрагмента от една антитяло молекула, може да бъде получен чрез третиране на пълно антитяло с пепсин, последвано от редукция, за добиване на интактна лека верига и част от тежката верига; два Fab' фрагмента са получени за една антитяло молекула;

3) $(Fab')_2$, фрагмента от антитялото, което може да бъде получено чрез третиране на пълно антитяло с ензима пепсин без последваща редукция; $(Fab')_2$ е димер на два Fab' фрагмента, носени заедно от две дисулфидни връзки;

4) Fv, определен като генетично конструиран фрагмент, съдържащ вариабилния участък от леката верига и вариабилния участък от тежката верига, експресиран като две вериги; и

5) Едноверижно антитяло ("SCA"), определено като генетично конструирана молекула, съдържаща вариабилния участък

от леката верига, вариабилния участък от тежката верига, свързани с подходящ полипептиден линкер като генетично слята едноверижна молекула.

Методи за създаване на тези фрагменти са известни в областта. (Виж например, *Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)*).

Както е използван в настоящето изобретение, терминът "епитоп" означава която и да е антигенна детерминанта на един антиген, към който се свързва паратоп на дадено антитяло. Епитопните детерминанти обикновено се състоят от химично активни повърхностни групировки от молекули, като амино киселини или захарни странични вериги и обикновено имат специфични тридименсионални структурни характеристики, а така също специфични характеристики на натоварване.

Моноклоналните антитела срещу протеините от настоящето изобретение и срещу техните фрагменти, могат да бъдат получени от специалиста в областта. Общата методология за получаване на моноклонални антитела с помощта на хибридомната техника е добре известна. Безсмъртни продуциращи антитяло клетъчни линии могат да бъдат създадени чрез клетъчна фузия, и също чрез други техники, като директна трансформация на В лимфоцити с онкогенна ДНК, или трансфекция с вируса на *Epstein- Barr*. Виж напр., *M. Schreider et al., "Hybridoma techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T- Cell Hybridomas" (1980);* Виж също *US патенти № 4 341 761; 4 399 121; 4 427 783; 4 444 887; 4 452 570; 4 466 917; 4 472 500; 4 491 632* и *4 493 890*. Панели от моноклонални

антитела, продуцирани срещу желания протеин, по- специално TPO-Rp или настоящите олигопептиди или техни фрагменти, могат да бъдат скринирани за различни свойства; т.е., за изотип, епитоп, афинитет и др. Обратно, гени, кодиращи желаните моноклонални антитела могат да бъдат изолирани от хибридомите чрез PCR техники, известни в областта и клонирани и експресирани в подходящи вектори. Моноклоналните антитела са приложими за пречистване, с помощта на имуноафинитетни техники на индивидуални протеини срещу които те са насочени. Антителата от това изобретение, независимо дали поликлонални или моноклонални, имат допълнителна приложимост като реагенти в имунологични изследвания, RIA, ELISA и др. В допълнение, те могат да бъдат използвани за откриване и/или изолиране на настоящите олигопептиди от клетъчни екстракти или клетки. Антителата могат да бъдат използвани напр. за създаване на тъканн- културални проби за установяване или модификация на нови съединения, които модулират TPO- Rp активност, например да имитират TPO активност.

Хуманизираните или химерни антитела може да включват части, получени от два различни вида (напр. човешки константен участък и муринов свързващ участък). Частите, получени от два различни вида може да бъдат свързани заедно химично с конвенционални техники или могат да бъдат получени като единичен фузионен протеин с помощта на генно- инженерни техники. ДНК, кодираща протеините за двете части от химерното антитяло може да бъде експресирана като отделен фузионен протеин.

Едно антитяло "специфично се свързва към" или " е специфично имунореактивно с" протеин, когато антитялото функционира в реакцията на свързване, която е детерминативна за присъствието на протеина при наличие на хетерогенна популация от протеини и други биологични вещества. Така, при посочените условия за имунологични изпитвания, специфичните антитела се свързват специфично към определен протеин и не се свързват в значимо количество към други протеини, намиращи се в пробата. Специфично свързване към протеин при такива условия изисква антитяло, което е избрано по неговата специфика за определен протеин. Различни форми на имунологично изпитване могат да бъдат използвани за подбор на антитела, специфично имунореактивни с определен протеин. Например, твърдофазни ELISA имунопроби се използват рутинно за подбор на моноклонални антитела, специфично имунореактивни с протеина. Виж напр. *Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publication, New York,* за описание на формите на имунологични изследвания и условията, които могат да бъдат използвани за определяне на специфична имунореактивност.

Терминът "имунопроба" се отнася до изпитване, което използва антитяло или антиген за специфично свързване на аналитично вещество, което може да бъде също антитяло или антиген. Имунопробата се характеризира с използване на специфични свойства за свързване на конкретно антитяло, за откриване, изолиране, насочване и/или количествено определяне на анализираното вещество. Както антитялото, така и антигена могат да бъдат маркирани, което да позволи откриването.

В контекста на настоящето изобретение, терминът "лечение" се отнася до профилактичен и/или терапевтичен ефект на лекарство или медикамент, който на свой ред е дефиниран като състав, включващ фармацевтично или диагностично ефективно съединение в комбинация с най- малко една добавка, като носител.

"Агонист" се отнася до биологично активна връзка, която се свързва към неговия комплементарен биологично активен рецептор и активира последния както за да причини биологичен отговор в рецептора, така и да засили по- рано съществуваща биологична активност на рецептора. TPO агонист се свързва към TPO рецептора (TPO- R). TPO агониста може да действа като TPO имитатор. Обаче, TPO агониста може също да активира или определя активирането на TPO- R чрез използване на места за свързване или механизми, различни от тези за TPO.

"Антагонист" се отнася до биологично активен лиганд, който се свързва към неговия комплементарен биологично активен рецептор и подтиска, редуцира или облегчава активността на TPO- R, например използването на места за свързване или механизми, различни или сходни от тези за TPO.

Терминът "фармацевтично приемливи соли" се отнася до широко използвани нетоксичен алкален метал, алкалоземен метал и амониеви соли, включително амониева, бариева, калциева, литиева, магнезиева, калиева, протаминови цинкови соли и натрий, които са получени по методи известни в областта. Терминът включва също нетоксични, напр. фармацевтично активни кисели соли, които най-общо се получават чрез взаимодействие на олигопептиди от

настоящето изобретение с подходяща органична или неорганична киселина, като ацетат, бензоат, бисулфат, борат, цитрат, фумарат, хидробромид, хидрохлорид, лактат, лаурат, малеат, напсилат, олеат, оксалат, фосфат, сукцинат, сулфат, тартарат, тозилат, валерат и др.

Терминът "фармацевтично приемливи кисели добавъчни соли" се отнася до соли, които притежават биологичната ефективност и свойствата на свободните бази и които не са биологично или в други случаи нежелано, формирани с неорганични киселини като хидробромна, хидрохлорна, азотна, фосфорна, сярна и органични киселини като оцетна киселина, бензоена киселина, цинаминова киселина, лимонена, етансулфонова киселина, фумарова киселина, гликолова киселина, малеинова киселина, малонова киселина, ябълчна киселина, манделева киселина, метансулфонова киселина, оксалова киселина, пропионова киселина, р-толуенсулфонова киселина, пируватна, салицилова, сукцинилова, тартарова киселина и др.

Терминът "фармацевтично приемлив естер" се отнася до естери, които обладават, при хидролиза на естерната връзка, биологичната ефективност и свойствата на техните конституенти, наречени карбоксилни киселини или алкохоли и не са биологично или в друг аспект нежелани. Настоящето изобретение се отнася също до използването на такива състави, които са едновременно естери както са описани по- горе и в същото време са техни фармацевтично приемливи кисели добавъчни соли.

Солите от настоящето изобретение могат да бъдат получени чрез разтваряне на свободния олигопептид във воден или

водно/алкохолен разтворител или в други подходящи разтворители с подходяща основа и след това изолиране на получената сол от изобретението чрез изпаряване на разтвора, чрез замразяване и лиофилизиране или чрез добавяне на друг разтворител, напр. диетилетер, към водния и/или алкохолен разтвор на олигопептидната сол, включително разделянето на неразтворимата сурова сол. За формиране на солта, обикновено се използват един или максимално два мола от основата, напр. катион, и един мол от свободния олигопептид. За получаването на алкални олигопептидни сали за предпочитане се използват алкални метални карбонати или хидрогенкарбонати. Получените пептидни соли са свободно разтворими във вода. Така, настоящето изобретение се отнася също и до метод за получаването на олигопептидните соли. В контекста на настоящето изобретение, основата се счита като вещество, способно да формира катийон в разтвор, по- специално във воден и водно/алкохолен разтвор.

Терминът "фармацевтично приемлив амид" се отнася до амиди, които обладават, при хидролиза на амидната връзка, биологичната ефективност и свойства на карбоксилната киселина или амин и не са биологично или по други причини нежелани. Тези амиди обикновено се образуват от съответна карбоксилна киселина и един амин. Това изобретение предвижда също използването на такива състави, които са както амиди, така и в същото време са техни фармацевтично приемливи добавъчни соли.

Техниките за получаване на фармацевтично приемливи естери и амиди са например описани в *March Advanced Organic chemistry, 3th ed., John Wiley & Sons, New York (1985) p. 1152.* Фармацевтично

приемливи естери и амиди, приложими като лекарствени предшевственици са описани в *Bundgaard, H., ed., (1985) Design of Prodrags, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.*

Терминът "фармацевтично или терапевтично приемлив носител" се отнася до носеща среда, която не повлиява ефективността на биологичната активност на активните инградиенти и която не е токсична за гостоприемника или пациента.

"Терапевтично- или фармацевтично- ефективно количество" приложен към олигопептидите и състави от настоящето изобретение, се отнася до количествата олигопептид или състав, достатъчно да индуцират желания биологичен резултат. Такъв резултат може да бъде отклонение на знаци, симптоми или причини на заболяване, или което и да е изменение на биологична система. В настоящето изобретение резултата, например в специално предпочитан вариант на изпълнение, ще включва TPO имитирана активност, като селективно предотвратяване, заобикаляне и/или редуциране симптомите на тромбоцитопения, например увеличаване броя на тромбоцитите, и/или предотвратяване броя на тромбоцитните струпвания.

Амино киселинни остатъци в настоящите олигопептиди са с абревиатура както следва: Фениламин е Phe или F; Левцин е Leu или L; Изолевцин е Ile или I; Метионин е Met или M; Валин е Val или V; Серин е Ser или S; Пролин е Pro или P; Тирозин eThr или T; Аланин е Ala или A; Тирозин е Tyr или Y; Хистидин е His или H; Глутамин е Gln или Q; Аспарагин е Asn или N; Лизин е Lys или K; Аспарагинова киселина е Asp или D; Глутаминова киселина е Glu

или E; Цистеин е Cys или C; Триптофан е Trp е W; Аргинин е Arg или R; и глицин е Gly или G.

Така напаример A R G е непрекъсната ивица, т.е. трипептид, състоящ се от Аланин, Аргинин и Глицин, докато R A R е непрекъсната ивица от Аргинин, Аланин и Аргинин.

Настоящето изобретение се отнася не само до олигопептидите, специфично показани на SEQ ID NO: 1 до 6, но и до биологични еквиваленти, т. е. Вещества, притежаващи различни структури, но показващи сходни или сравними биологични ефекти, по- специално техни производни, които имат сходни или сравними структури и/или функции и действат като TPO-R модулатор. Тези биологични еквиваленти, по- специално могат да се отличават от олигопептидите на настоящето изобретение по отношение на податливостта на хидролиза или протеолиза и/или по отношение на други биологични свойства, като повишен афинитет към TPO рецептора. Така, изобретението се отнася също например до фармацевтично приемливи соли, амиди или естери на олигопептиди от настоящето изобретение.

Така, в допълнение към олигопептидите, състоящи се само от природно- срещани амино киселини, се предлагат също и пептидомиметици или пептидни аналози. Пептидните аналози обикновено се използват като не- пептидни лекарства със свойства, аналогични на тези на матричния пептид. Тези типове от не-пептидни съединения са наречени "пептидни миметици" или "пептидомиметици". Пептидните миметици, които са структуро сходни на терапевтично приложими пептиди може да бъдат

използвани за получаване на един еквивалент или засилен терапевтичен или профилактичен ефект. Най- общо, пептидомиметиците са структурно аалогични на парадигмен полипептид (т.е., полипептид който има биологична или фармакологична активност), като природно срещан рецепторно свързващ полипептид, но имат една или повече пептидни връзки, незадължително заместени с връзка, избрана от групата, състояща се от: $-CH_2-NH-NH-$, $-C-CH_2-S-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)-CH_2-$, и $-CH_2-SO-$, по методи известни в областта. Специално предпочитана непептидна връзка е $-CH_2-NH-$. Такива пептидни миметици може да имат значителни преимущества, включващи: подобрена клетъчна стабилност, засилени фармакологични свойства (полу- живот, абсорбция, потенциал, ефективност и др.), по- икономична продукция на изменената специфичност (напр. широко спектърна активност на биологичните активности), редуцирана антигенност и др. Маркирането на пептидомиметиците обикновено включва ковалентно присъединяване на един или повече маркери, директно или чрез спейсер като напр. амидна група, до не- влияещи позиции върху пептидомиметиците, които са предсказани чрез данните на количствено- структурна активност и/или молекулярно моделиране. Такива не- влияещи позиции обикновено са позиции, които не формират директни контакти с макромолекулите напр., молекули от имуноглобулиново семейство, към които пептидомиметиците се свързват за получаване на терапевтичен ефект. Маркирането на пептидомиметиците не следва да повлияе съществено желаната фармакологична активност на пептидомиметиците. Най- общо, пептидомиметици на рецепторно- свързващи пептиди се свързват към рецептора с висок афинитет и притежават откриваема

биологична активност, т.е. са агонисти или антагонисти на една или повече рецепторно- медиирани фенотипични изменения.

В контекста на настоящето изобретение, може да се използва заместване на една или повече L- амино киселини с D- амино киселина от същия тип (напр., D- лизин на мястото на L- лизин) за генериране на по- стабилни пептиди. В допълнение, настоящето изобретение се отнася до олигопептиди, включващи консенсусната последователност, идентифицирана с посочената по- горе обща формула или по същество вариации на консенсусната последователност, които могат да бъдат генерирани с методи известни в областта например, чрез вътрешно добавяне на цистеинови остатъци, способни да формират интрамолекулни дисулфидни мостове, които циклизират пептида.

Настоящето изобретене се отнася не само до горните олигопептиди в линеаризирана форма, но се отнася също и до циклизирани олигопептиди, например циклизирани чрез амидна връзка между първата последна амино киселини.

"Синтетични или не- природно срещани амино киселини" се отнася до амино киселини, които не се срещат *in vivo*, но които, независимо от това, могат да бъдат включени в олигопептида от настоящето изобретение. Други предпочитани синтетични амино киселини включват амино киселини, където амино групата е разделена от карбоксилната група с повече от един въглероден атом като β- аланин или γ- аминобутирова киселина. Специално предпочитани синтетични амино киселини включват D- амино киселини от природно срещани L- амино киселини, L- 1- нафтил-

аланин, L- 2- нафтилаланин, L- циклохексилаланин, L –2- амино изобутиринова киселина, сулфоксид и сулфонови производни на метионин.

"Откриваем маркер" се отнася до вещества, които когато са ковалентно свързани с олигопептиди, олигопептидни миметици и/или антитела от настоящето изобретение, позволяват откриване на олигопептида и олигопептида имитира *in vivo* в системата, например пациента, на когото се прилага олигопептида или олигопептидния миметик или *in vitro*. Подходящи маркери за откриване са добре известни в областта и включват, като пример, радиоизотопи и флуоресцентни маркери (напр. флуоресцеин).

Ковалентно присъединяване на маркера към олигопептида или олигопептидния миметик се осъществява по конвенционални методи, добре известни в областта. Например, когато радиоизотопа I^{125} се използва като маркер, ковалентното присъединяване на I^{125} към олигопептида или олигопептидния миметик, може да бъде постигнато чрез включване на амино киселината тирозин в олигопептида или олигопептидния миметик и след това изолиране на олигопептида. Също така, P^{32} може да бъде включен в олигопептида или олигопептидния миметик като фосфатно количество чрез, например, хидрокси група в пептида или пептидния миметик.

Олигопептидите от изобретението могат да бъдат получени по конвенционални методи, известни в областта, например, чрез използване на стандартни твърдофазови техники. Стандартните методи включват, но не се ограничават до, ексклузивна

твърдофазова синтеза, методи на частична твърдофазова синтеза, фрагментно кондензиране, класически синтез в разтвор и чрез рекомбинантна ДНК технология. Олигопептидите от настоящето изобретение по този начин могат да бъдат получени директно по рекомбинантни методи (виж *Sambrook et al., Molecular Clonrng: A Laboratory Manual, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*) или като фузионен протеин, например протеин, който е един от специфично свързваща двойка, което позволява пречистване на фузионния протеин посредством афинитетни реагенти, последвано от протеолитично разграждане, обикновено в място така конструирано, че да доведе до получаване на желания пептид.

Олигопетидите може да бъдат така удължени, че да осигурят удобни места за свързване, напр. цистеин или лизин, да засилят стабилността, да се свържат към определени рецептори, да осигурят насочено в определено място действие, да осигурят лесно пречистване, да променят физичните характеристики (напр. разтворимост, заряд и др.), да стабилизират на конформацията и др. Олигопептидите може да бъдат бъдат присъединени към фланкиращи участъци, различни от дивия тип като фузионни протеини, да се присъединят както чрез свързващи групи, така и ковалентно свързани чрез цистеин (дисулфид) или пептидни връзки. Олигопептида може да бъде свързан чрез разнообразие от бифункционални средства, като малеимидобензоена киселина, метилдитиооцетна киселина, меркаптобензоена киселина, S-пиридил дитиопропионат, и др. Олигопептидите могат да бъдат свързани към отделна амино киселина при N- или C края на верига от амино киселини, или може да бъдат вътрешно свързани. Например, настоящите олигопептиди могат да бъдат ковалентно

свързани към имуногенен протеин, като хемацианин, овалбумин и др. за улесняване продукцията на антитяло към обекта олигопептиди.

Олигопептидите от настоящето изобретение може да бъдат експресирани като свързани с други пептиди или протеини, така че да бъдат част от веригата, както вътре в нея, така и при N- или C-края. Такъв слят олигопептид се нарича фузионен или конюгатен пептид. Могат да бъдат постигнати различни пост- експресионни модификации. Например, чрез използване на подходящите кодиращи последователности, може да бъде осигурено фарнезилиране или пренилиране, така че пептида да бъде свързан към липидна група в единия край, и да може да бъде инсертиран в липидна мембрана, като липозома. Олигопептидите от настоящето изобретение може да бъде PEGилиран, като полиетиленокси групата осигурява удължено време на живот в кръвния поток. Олигопептидите от настоящето изобретение може да бъдат асоциирани към серумен протеин, напр. албумини. Олигопептидите могат също да бъдат комбинирани както чрез протеинова фузия, така и чрез асоцииране с или към други протеини, като Fc от един IgG изотип, за да подсили комплементното свързване или с токсин, като рицин, абрин, дифтериен токсин или др. подобни, и по-специално А веригата. Олигопептидите могат да бъдат свързани към антитела за насочено в дадено място действие. Поради това настоящето изобретение предлага конюгатни пептиди, включващи i. a. олигопептидите от настоящето изобретение.

Олигопептидите от настоящето изобретение може да служат като структурни модели за не- пептидни съединения със сходна

биологична активност. Специалиста в областта знае, че са подходящи разнообразни техники за конструиране на съединения със същата или сходна желана биологична активност като настоящите пептиди, но с по- удобна активност по отношение на разтворимост, стабилност и податливост на хидролиза и протеолиза. Тези техники включват реплициране на пептидната верига с верига, съставена от фосфати, амиди, карбонати, сулфонамиди, вторични амини, и N- метиламино киселини.

Така, настоящето изобретение се отнася също до рекомбинантно продуциране на олигопептидите от настоящето изобретение.

Съответно, настоящето изобретение се отнася до нуклеотидни последователности, кодиращи олигопептидите идентифицирани в SEQ ID Nos. 1 до 7, които обхващат благодарение на дегенерацията на генетичния код повече от шест различни нуклеотидни последователности. Разбира се, настоящето изобретение се отнася също до горните нуклеотидни последователности, които са мутирали например, чрез делеции, добавяния, инсерции или инверсии, доколкото кодираният олигопептид има желаният TPO-R модулаторен ефект от настоящето изобретение.

Настоящето изобретение се отнася също до вектори, включващи горните нуклеотидни последователности, които могат да бъдат въведени и експресирани в гостоприемникова клетъчна система, използвайки конвенционални материали и техники. ДНК елементи като промотори, енхансери, места за полиаденилация, транскрибционни терминаторни сигнали и други следва да бъдат

асоциирани с нуклеотидните последователности така, че да промотират и контролират експресията. Използваният специфичен регулаторен елемент ще зависи от гостоприемниковата система, избрана за експресия независимо дали се желае секреция на олигопептида или конюгатния пептид. Вектора може да бъде в предпочитан вариант от настоящето изобретение бактериален, вирусен, бозайников или дрождев вектор, който в специално предпочитан вариант обхваща горните идентифицирани 5' и/или 3' регулаторни елементи, способни да насочат експресията на нуклеотидната последователност в подходяща гостоприемникова клетка.

Могат да бъдат използвани различни вектори като средства за въвеждането и експресията на настоящите олигопептиди в гостоприемникова клетка. Такива вектори, приложими в различните типове гостоприемникови клетки са добре известни и включват, например, бозайниковите вектори за експресия pSG5 (*Stratagene*), p-RK1 (*Genetics Institute*), p-SVK3 (*Pharmacia*), p-EUK-C1 (*Clontech*), pCDM (*Invitrogen*), и бактериалните вектори за експресия pFLAG-1 (IBI), всички плазмиди от система pET (*Novagen*), pTrcHis (*Invitrogen*), серии pGEX (*Pharmacia*) и pKK 233-2 (*Clontech*). Тези вектори могат да бъдат поддържани като епизоми в гостоприемниковата клетка или да улеснят интеграцията на настоящите нуклеотидни последователности в генома на гостоприемниковата клетка, или и двете. Веткорите могат да включват също други полезни характеристики, като гени които позволяват подбора или откриването на клетки, в които те са успешно внедрени.

Гостоприемникови клетки, подходящи за експресия в нуклеотидните последователности от настоящето изобретение включват, но не са ограничени до прокариотични и еукариотични гостоприемници, като *Bacillus subtilis, E. coli,* дрожди, ооцити на *Xenopis laevis*, инсектицидни клетки, растителни клетки и различни типове клетки на бозайници, включително в частност овариални клетки на китайски хамстер (CHO), клетки Хела, L(tk-) клетки, първични култури, Cos17 клетки, Cos1 клетки, бъбречни клетки от новороден хамстер и CV1 клетки. Гостоприемникови клетки, които осигуряват гликозилация също са включени в настоящето изобретение.

Настоящето изобретение се отнася също до методи за генетично модифициране на клетка чрез трансфектиране на клетката с горния идентифициран вектор. Трансфекцията може да бъде достигната с конвенционални методи като биологична, физична, химична или електрически индуцирана трансфекция, по-специално електропорация, клетъчна фузия, ретровирус или медииран от вирус генен трансфер, медииран от липозоми генен трансфер или бомбардиране с частички.

Настоящето изобретение се отнася също до методи за създаване на животни бозайници, различни от човек, способни да продуцират олигопептидите от настоящето изобретение и техните клетки, при което нуклеотидна последователност от настоящето изобретение се въвежда в клетка на животно бозайник, различен от човек, по- специално не по- късно от в 8- клетъчен- стадий, който в последствие се култивира при подходящи условия за получаване на възрастно диференцирано животно. Такова животно може да

включва в своите зародишни клетки или соматични клетки, по-специално в своята хромозома нуклеотидна последователност от настоящето изобретение, способно да експресира олигопептида от настоящето изобретение. В специално предпочитан вариант от настоящето изобретение, животното бозайник е гризач или примат. Такъв метод може да позмволи различни видове генна терапия, напр. соматична генна терапия или генна терапия на зародишна линия.

Настоящето изобретение включва също генетично манипулирани, по- специално трансгенни животни, по- специално животни, по- специално примати и мишки и техни клетки. Тези животни, съдържащи най- малко в някои от своите клетки трансфектирани смислови или безсмислови структури от нуклеотидните последователности от настоящето изобретение под контрола на регулаторни елементи, са приложими за изследователски и диагностични цели, тъй като активността на TPO-R е модифицирана. Модифицирането на TPO-R в трансгенни животни е възможна т. к. чрез използване на смислова или безсмислена нуклеотидни последователности от настоящето изобретение, или чрез каквато и да е модификация на тези нуклеотидни последователности като инверсии, делеции, инсерции, добавяния и др. за трансформиране и получаване на такива животни, които са генетично манипулирани. В един от варианите на изпълнение, вектори или олигонуклеотиди от настоящето изобретение се трансфектират и интегрират в генома на клетка на бозайник, различен от човек, така че да експресира олигонуклеотид, който може да модулира TPO-R активност. В друг вариант от настоящето изобретение, вектори или олигонуклеотиди от

настоящето изобретение се трансфектират и инсертират в генома, по- специално в ендогенния TPO-R ген чрез хомоложна рекомбинация, така че да се получат животни, експресиращи модифициран TPO-R. Така, настоящето изобретение се отнася също до животни, които са генетично модифицирани, по- специално до трансгенни животни, които проявяват модифицирана TPO-R функция, в противоположност на дивия тип животно. Такава модифицирана функция в бозайник, по- специално клетка на бозайник различен от човек може да се дължи на въвеждането на безсмислови или смислови структури от настоящето изобретение, вероятно съдържащи изменения в нуклеотидната последователност и/или може да се дължи на манипулации в ендогенните нуклеотидни последователности за TPO-R. Благодарение на тези модификации, като инсерции на допълнително мутирали или не- мутирали смислови или антисмислови копия на TPO-Rp кодиращи последователности, конструирани в съответствие с настоящето изобретениее или модификации в ендогенните гени, става възможно получаването на полезни животни за посочените по- горе цели. Настоящето изобретение се отнася също и до отделни клетки на бозайник, различни от човек или клетъчни култури, съдържащи горните идентифицирани модификации.

Настоящето изобретение се отнася също до метод за получаване на олигопептид от настоящето изобретение, включващ трансфектиране на клетка с вектора съгласно настоящето учение, култивиране на клетката в културална среда при условия, позволяващи експресирането на олигопептида и възстановяване на олигопептида от клетката или културалната среда с помощта на конвенционални техники.

Настоящето изобретение се отнася също до моноклонални или поликлонални антитела или техни фрагменти, които специфично се свързват кам наличните олигопептиди. Тези антитела могат да бъдат използвани за установяване и изолиране на настоящите олигопептиди, техни структурни аналози или дори самите TPO-R. В случая когато TPO-R се намират в източници съдържащи TPO-R или олигопептид като клетка, част от клетка или клетъчна органела, же да бъде необходимо по- нататъшно откриване или изолиране, като конвенционални методи за разрушаване на биологичен материал, напр. ензино разграждане на клетки.

Изобретението се отнася също и до моноклонални или поликлонални антитела, специфично разпознаващи и свързващи горните антитела.

Настоящето изобретение се отнася също до имунопроба за откриване и/или изолиране на олигопептидите от настоящето изобретение от смес, съдържаща олигопептидите, където антителата от настоящето изобретение се прилагат към сместа и олигопептидите се откриват и/или изолират. *Vice versa*, имунопробата може да бъде използвана за откриване на антителата от настоящето изобретение с помощта на олигопептидите от настоящето изобретение като сонда.

Олигопептидите от настоящето изобретение са приложими също *in vitro* като уникални средства за анализ на биологичната роля на TPO, включително оценката на много фактори, включени в продуцирането на TPO и процеса на рецепторно свързване.

Олигопептидите от настоящето изобретение са приложими също за развитието на други съединения, които се свързват към и активират TPO-R, тъй като настоящите олигопептиди предоставят важна информация за взаимовръзката между структура и активност.

Олигопептидите от настоящето изобретение са приложими също като конкурентни свързващи средства в проби за скриниране на следващи TPO рецепторни агонисти. Олигопептидите от настоящето изобретение могат да бъдат използвани без модификация или могат да бъдат използвани като ковалентни или не- ковалентно свързващи маркиращи количества, които директно или индиректно осигуряват сигнал за откриване. Директното маркиране включва маркиращи групи като: радиомаркери, ензими като пероксидаза и алкална фосфатаза и флуоресцентни маркери за наблюдаване измененията в интензитета на флуоресценцията, дължината на вълната или флуоресцентната поляризация. Индиректното маркиране включва биотинилиране на конституентите, последвано от свързване към авидин, куплиран към една от горните маркиращи групи. Съединенията могат да включват също спейсери в случаите, когато съединенията са прикрепени към твърда повърхност.

На базата на тяхната способност да се свързват към ГРО рецептора, олигопептидите от настоящето изобретение могат да бъдат използвани като реагенти за откриване на TPO рецептори върху мембрани, клетъчни органели, раздели, живи клетки, фиксирани клетки, в биологични флуиди, в тъканни хомогенати, в пречистени, природни биологични материали, в сурови екстракти и др. Например, чрез маркиране на наличните олигопептиди, могат да

бъдат идентифицирани клетки, притежаващи TPO-R на тяхната повърхност. Нещо повече, на базата на тяхната способност да свързват TPO-R, олигопептидите от настоящето изобретение могат да бъдат използвани в *in situ* оцветяване, FACS (флуоресцентно-активирано сортиране на клетки), оцветяване по Western, ELISA, и др. В допълнение, на основата на тяхната способност да се свържат към TPO-R, олигопептидите от настоящето изобретение може да бъде използвано в методи за TPO-R изолиране и пречистване, или в изолиране и пречистване на клетки, експресиращи TPO-R на клетъчната повърхност или вътре в пермеабилни клетки.

Настоящето изобретение се отнася също до използването на олигопептидите от настоящето изобретение, които са имобилизирани например върху твърда повърхност, съгласно конвенционални методи, за посочените по- горе процедури на скрининг и изолиране. В един от вариантите на настоящето изобретение, по- специално в проба за скриниране, олигопептида е недифузно свързан към неразтворима повърхност, притежаваща изолирана проба с получаващи области, напр. микротитърна пластинка. Неразтворимите повърхности могат да бъдат с различен състав, към които олигопептида или рецептора може да бъде свързан, са отделени от разтворимия материал, и са конкурентни с всички методи за скриниране. Горния слой на такива повърхности може да бъде твърд или порьозен и с каквато и да е удобна форма. Примери на подходящи неразтворими повърхности включват микротитърни пластинки, мембрани и легла. Те са обикновено направени от стъкло, пластмаса напр. полистирен, полизахариди, найлон или нитроцелулоза.

Разбира се, настоящето изобретение се отнася също до описаните по- горе методи за изолиране и искриниране с помощта на олигопептидите и/или антителата срещу тези олигопептиди в много чувствителни методи за скриниране и/или изолиране, например в разтвор без използване на имобилизирани средства.

Олигопептидите от настоящето изобретение могат да бъдат използвани като търговски средства за разнообразни медицински изследвания и диагностични приложения. Такива приложения включват, но не са ограничени до: 1) използване като калибрационен стандарт за количествено определяне активностите на TPO или потенциални TPO агонисти в различни функционални проби; 2) използване за поддържане пролиферацията и растежа на TPO-зависими клетъчни линии; 3) използване в структурен анализ на TPO- рецептор чрез кокристализация; 4) използване за изследване механизма на TPO сигнална трансдукционна/ рецепторна активация; и 5) други изследователски и диагностични приложения, където TPO-рецептора е за предпочитане активиран или такова активиране е подходящо калибрирано срещу известно количество на TPO или TPO агонист.

Олигопептидите от настоящето изобретение може да бъде използвано за *in vitro* експанзия на мегакариоцити и техните свързани прогенитори, както заедно с допълнителни цитокини, като TPO, така и самостоятелно. Хемотерапията и облъчването причиняват тромбоцитопения чрез умъртвяване на бързо деляща се, по- зряла популация от мегакариоцити. Обаче, тези терапевтични обработки могат също да редуцират броя и жизнеността на незрелите, по- слабо митотично активни мегакариоцитни

прекурсорни клетки. Съответно, подобряването на тромбоцитопенията чрез олигопептидите от настоящето изобретение може в един вариант на изпълнение от настоящето изобретение да бъде повишено с използване на популация от собствени клетки на пациента след финализиране на хемотерапията и облъчването, набогатени с мегакариоцити и незрели прекурсори с *in vitro* култура.

Олигопептидите от изобретение и/или див тип TPO-Rp и/или антитела, специфично свързващи се към него, могат също да бъдат приложени на животни, включително бозайници като гризачи и примати, включително хора, за модулиране, по- специално активиране TPO-R *in vivo* и/или да повиши или да поддържа съществуващия брой тромбоцити. Така, настоящето изобретение обхваща методи за терапия на свързани с TPO нарушения, която включва прилагане на олигопептид от изобретението в количества, достатъчни да модулират ефекта на TPO *in vivo*. Например, олигопептидите и съставите от настоящето изобретение могат да бъдат приложени за лечение на множество хематологични нарушения, включително, но без да се ограничава до тромбоцитни нарушения и тромбоцитопения, по- специално когато са свързани с трансфузия на костен мозък, радиационна терапия и химотерапия. Такова прилагане може да включва също прилагане на TPO.

Така, настоящето изобретение се отнася също до методи за модулиране и в частност повишаване или понижаване активността на TPO-R, където олигопептида от настоящето изобретение или антитяло, специфично свързано кам него, се прилага към TPO-R или

тромбоцитопения чрез умъртвяване на бързо деляща се, по- зряла популация от мегакариоцити. Обаче, тези терапевтични обработки могат също да редуцират броя и жизнеността на незрелите, по-слабо митотично активни мегакариоцитни прекурсорни клетки. Съответно, подобряването на тромбоцитопенията чрез олигопептидите от настоящето изобретение може в един вариант на изпълнение от настоящето изобретение да бъде повишено с използване на популация от собствени клетки на пациента след финализиране на хемотерапията и облъчването, набогатени с мегакариоцити и незрели прекурсори с *in vitro* култура.

Олигопептидите от изобретение и/или див тип TPO-Rp и/или антитела, специфично свързващи се към него, могат също да бъдат приложени на животни, включително бозайници като гризачи и примати, включително хора, за модулиране, по- специално активиране TPO-R *in vivo* и/или да повиши или да поддържа съществуващия брой тромбоцити. Така, настоящето изобретение обхваща методи за терапия на свързани с TPO нарушения, която включва прилагане на олигопептид от изобретението в количества, достатъчни да модулират ефекта на TPO *in vivo*. Например, олигопептидите и съставите от настоящето изобретение могат да бъдат приложени за лечение на множество хематологични нарушения, включително, но без да се ограничава до тромбоцитни нарушения и тромбоцитопения, по- специално когато са свързани с трансфузия на костен мозък, радиационна терапия и химотерапия. Такова прилагане може да включва също прилагане на TPO.

Така, настоящето изобретение се отнася също до методи за модулиране и в частност повишаване или понижаване активността на TPO-R, където олигопептида от настоящето изобретение или антитяло, специфично свързано кам него, се прилага към TPO-R или при отсъствие или в присъствие на TPO. Такъв метод може да бъде *in vivo* или *in vitro* метод.

Олигопептидите и съставите от настоящето изобретение в предпочитан вариант на изпълнение ще се прилагат профилактично преди, едновременно с хемотерапия, радиационна терапия, или костна трансплантация или след такива терапии.

Съответно, настоящето изобретение предлага също фармацевтични състави включващи, като активен инградиент, най-малко един от олигопептидите от изобретението и/или TPO-Rp див тип олигопептид в асоциация с фармацевтичен носител или разредител. Съставите от това изобретение може да бъдат прилагани системно или локално, по- специално чрез интраваскуларна орална, белодробна, парентална, напр. интрамускулна, интраперитонеална, интравенозна (IV) или субкутанна инжекция или инхалация, чрез напр. фина прахова форма, трансдермално, назално, вагинално, ректално или по сублингвални пътища на прилагане и могат да бъдат оформени в дози, подходящи за всеки от начините на приложение. Олигопептидите от настоящето изобретение и/ или TPO-R див тип олигопептид могат да бъдат използвани в такива комбинации под формата на фармацевтично приемлива сол, допълнителна сол, естер, амид, и/ или свободна база, за предпочитане във фармацевтично ефективно количество.

Твърдите доза форми за орално приложение включват капсули, таблетки за смукане, таблетки, прахове, липозоми, пластири, покрития със забавено действие и гранули. В такива твърди доза форми, активното съединение се смесва с най- малко един фармацевтично приемлив носител като лактоза, захароза или нишесте. Такива форми може да включват също допълнителни вещества, различни от инертни разтворители, напр. лубриканти като магнезиев сулфат. В случая на капсули, таблетки и прахове, формите може да съдържат още баластни и/или буферни, а така също и оцветяващи вещества. Таблетки и прахове могат да бъдат изготвени допълнително с ентерични покрития.

Течните доза форми за орално приложение включват фармацевтично приемливи емулсии, разтвори, суспенсии, сиропи, с еликсири съдържащи инертни разтворители, широко използвани в областта, като вода. Освен такива инертни разтворители, съставите могат да включват също аджуванти, като соли за коригиране на осмотичното налягане, pH коригиращи вещества, средства за предпазване на кожата, омокрящи средства, емулгиращи и суспендиращи средства, и подсладители, овкусители и ароматизиращи средства.

Фармацевтичните средства съгласно настоящето изобретение за парентерално приложение включват стерилни водни или не- водни разтвори, суспенсии или емулсии. Примери за не- водни разтворители или вехикулуми са пропилен гликол, полиетилен гликол, растителни масла като маслинено и царевично, желатин и органични

естери за инжекционни форми като етил олеат. Такива доза форми може да съдържат също аджуванти като консерванти, омокрящи и диспергиращи средства. Те може да бъдат стерилизирани чрез, например, филтруване през филтър, забавящ бактериите, чрез включване на стерилизиращи средства в съставите, чрез облъчване на съставите или чрез нагряване на съставите. Те могат също да бъдат произвеждани с помощта на стерилна вода или някоя друга стерилна инжекционна среда, непосредствено преди употреба.

Формите за инжекционно приложение ще включват физиологично приемлива среда, като вода, солен разтвор, PBS, воден етанол, водни етилен гликоли и др. подобни. Водните разтворими консерванти, които могат да бъдат използвани, включват натриев бисулфит, натриев тиосулфат, аскорбат, бензалкониев хлорид, хлорбутанол, тимерозал, фенилмеркуриев борат, парабени, бензилов алкохол и фенилетанол. Тези средства може да присъстват в отделни количества от около 0.001 до около 5% тегловни и за предпочитане около 0.01 до около 2%. Подходящи водно разтворими буферни средства, които могат да бъдат използвани са алкални или алкалоземни карбонати, фосфати, бикарбонати, цитрати, борати, ацетати, сукцинати и др. подобни, като натриев фосфат, цитрат, борат, ацетат, бикарбонат и карбонат. Добавки като карбометилцелулоза могат да бъдат използвани като носител в количества от около 0.01 до около 5% тегловни. Формата ще варира в зависимост от целта на формата, конкретния начин, използван за модулиране на рецепторната активност, предполагаемото лечение и др.

Съставите за ректално или вагинално приложение са за предпочитане супозиториуми, които може да съдържат, в допълнение към активното вещество, ексципиенти като какаово масло или супозиториален восък. Състави за назално или сублингвално приложение се получават също със стандартни ексципиенти, добре известни в областта.

Съставите, съдържащи олигопептидите от настоящето изобретение и/или див тип TPO-Rp могат да бъдат прилагани за профилактични и/или терапевтични лечения. При терапевтичните приложения, съставите се прилагат на пациента, вече страдащ от дадено заболяване, както е описано по- горе в количество, достатъчно да лекува или най- малкото частично да отстрани симптомите на заболяването и усложненията от него, т. е. терапевтично ефективно количество.

При профилактичните приложения, състави съдържащи олигопептидите от настоящето изобретение и/или див тип TPO-Rp се прилагат на пациент, податлив на или с риск от от конкретното заболяване. Такова количество се определя като "профилактично ефективна доза". При такова приложение, точните количества отново зависят от здравния статус и тегло на пациента.

Фармацевтичните състави от настоящето изобретение може да бъдат прилагани също под формата на депо, като състав със забавено действие. Такъв състав със забавено действие може да включва частици, съдържащи олигопептид в матрикс, направен напр. от колаген.

Количествата от настоящия TPO агонист, необходим за ефективно лечение, ще зависи от много различни фактори, включително средства за приложение, място за приложение, физиологично състояние на пациента и други прилагани лекарства.

Олигопептидите от настоящето изобретение и/или див тип TPO-Rp, са ефективни за лечение на медиирани от TPO състояния, когато се прилагат в интервал на дозата от около 0.03 до около 10 mg/kg телесно тегло на бозайника дневно, по- специално от около 0.3 до около 1 mg/kg. Използваната специфична доза се регулира от конкретното състояние, което се третира, пътя на прилагане, а така също и от преценката на очакваните клинични зависимости като тежестта на състоянието и възрастта, както и общото състояние на пациента.

Олигопептидите от настоящето изобретение и/или див тип TPO-Rp може да бъдат прилагани самостоятелно или заедно с TPO, като дозата на последния бъде редуцирана до 50% или 25% (в противоположност на обичайната доза на TPO приложение) благодарение на TPO подсилващия ефект на олигопептидите.

Състава, за предпочитане водно- разтворимия състав, от изобретението може да съдържа още водно разтворим протеин, подходящ за инжектиране в телесните флуиди без да проявяват съществена фармакологична активност при използваната в една доза концентрация от настоящето изобретение (по- нататък, водно разтворим протеин). Като водно- разтворим протеин се предпочитат

серумен албумин, глобулин, колаген и/или желатин. Този протеин може да бъде добавен в количество, обикновено използвано във фармацевтични състави за инжекционно приложение. Така например, тегловното съотношение между водно разтворимия протеин и олигопептида от настоящето изобретение е около 0.0001: 1 до 100: 1, за предпочитане около 0.001: 1 до около 10: 1 или особено предпочитано около 0.01: 1 до около 1: 1.

По- нататък, изобретението се отнася също до посочените по-горе олигопептиди сами по себе си и състави които ги съдържат, по-специално, в изсушена и/или чиста форма или във воден или водно/ алкохолен разтвор. pH на разтвора, получен от водно- разтворимия състав или пептидна сол от настоящето изобретение следва да бъде такова, че посоченото pH не оказва каквото и да е неблагоприятно влияние върху активността на фармакологично активния пептид, но е в рамките на приемливия интервал за инжекционни форми и освен това, посоченото pH нито ще предизвика голяма промяна във вискозитета на разтвора, нито ще позволи формиране на преципитат или подобни. Така разтвора следва да има за предпочитане pH от около 4 до 7, за предпочитане 5 до 6, по- специално 5. 3 до 5. 5.

Когато водно- разтворимият състав от изобретението е превърнат в един воден разтвор за приложение, концентрацията на фармакологично активния олигопептид или негова сол в посочения разтвор следва за предпочитане да бъде около 0. 0000001 до 10 % (w/v), повече се предпочита около 0.000001 до 5% (w/v) или най-предпочитано около 0.00001 до 1% (w/v).

Състава от настоящето изобретение следва за предпочитане да бъде с такава форма за дозиране, че да съдържа фармакологично активния олигопептид от изобретението, ако е необходимо, заедно с други добавки като посоченият по- горе водно разтворим протеин. Така например, двата или трите компонента, посочени по- горе са така приготвени, че да могат да се поставят в ампула или епруветка чрез разтварянето или суспендирането им в стерилна вода или стерилен физиологичен разтвор. В този случай, метода за получаване може да включва смесване на разтвор от фармакологично активната олигопептидна сол и освен това, ако е необходимо, разтвор на добавката или добавяне на добавката в разпрашена форма към разтвора от фармакологично активната олигопептидна сол или която и да е друга комбинация от адекватни процедури. Формата за дозиране може да бъде приготвена също чрез добавяне на стерилна вода или стерилен физиологичен разтвор към лиофилизат или вакуумно изсушен прах, в който фармакологично активната олигопептидна сол, и ако е необходимо добавката, съществуват едновременно. Тази форма за дозиране може да съдържа един или повече конвенционални добавки като коригиращи pH средства (напр. глицин, хидрохлорна киселина, натриев хидроксид), локални анестетици (напр. ксилокаин хидрохлорид, хлорбутанол), изотонизиращи средства (напр. натриев хлорид, манитол, сорбитол), емулгатори, адсорбционни инхибитори (напр. Tween® 60 или 80), талк, нишесте, лактоза и трагакант, магнезиев стеарат, глицерол, пропилен гликол, консервиращи средства, бензил алкохол, метилхидрокси бензоат и/ или олеум арахид хидроген. Тази единица форма за дозиране може да съдържа

още фармацевтично приемливи ексципиенти като полиетилен гликол 400 или декстран.

Състава от настоящето изобретение е получен чрез смесване на тези ингредиенти по обичаен метод. Целта на смесването на ингредиентите от настоящия състав следва да бъде такава, че да се поддържа активността на фармакологично активния олигопептид и образуването на мехурчетата да бъде минимизирано по време на процеса. Ингредиентите се поставят в съд (например бутила или барабан) както едновременно, така и в друг порядък. Атмосферата в съда може да бъде, например, стерилен чист въздух или стерилен чест азотен газ. Полученият в резултат разтвор може да бъде прехвърлен в малки стерилни флакони или ампули и може след това да бъде подложен на лиофилизация.

Течната форма или лиофилизираната прахообразна форма на състава от настоящето изобретение може да бъде разтворена или диспергирана в разтвор на биологично разградим полимер като кополимер на поли(лакто- гликолова) киселина, поли(хидроксибутирова киселина), кополимер на поли(хидроксибутир-гликолова) киселина, или смес от тях, и след това може да се оформи като например филми, микрокапсули (микросфери), или нанокапсули (наносфери), по- специално под формата на меки или твърди капсули.

В допълнение, състава от настоящето изобретение, капсулиран в липозоми, включващи фосфолипиди, холестерол или производни на тях, могат по- нататък да бъдат диспергирани във физиологичен

разтвор или разтвор на хиалуронова киселина, разтворен във физиологичен разтвор.

Меката капсула може да бъде запълнена с течната форма на състава от настоящето изобретение. Твърдата капсула може да бъде запълнена с лиофилизираният прах от състава от настоящето изобретение, или лиофилизираният прах от настоящия състав може да бъде компресиран до таблетки за ректално приложение или орално приложение, съответно.

Разбира се, състава от настоящето изобретение може да бъде доставен в предварително запълнен шприц за самоприлагане.

Настоящето изобретение се отнася също до приложението на олигопептидите от настоящето изобретение и дивият тип TPO- Rp, нуклеотидната последователност кодираща тези олигопептиди, вектора от настоящето изобретение, гостоприемниковата клетка от настоящето изобретение и/или антитялото от настоящето изобретение за получаване на медикамент за диагностициране или лечение на хематологични нарушения, по- специално тромбоцитопения.

Накрая, настоящето изобретение се отнася до диагностични състави за диагностициране на хематологични нарушения, по-специално тромбоцитопения, включващи олигопептида от настоящето изобретение или див тип TPO- Rp, нуклеотидната последователност кодираща тези олигопептиди, векторите от настоящето изобретение, гостоприемниковата клетка от настоящето

изобретение и/или антителата от настоящето изобретение, незадължително свързани с подходящ носител. В специално предпочитан вариант на изпълнение от настоящето изобретение, посочените по- горе средства, използвани в диагностичния състав от настоящето изобретение може да бъдат маркирани. Така, маркирани олигопептиди, маркирани нуклеотидни последователности, маркирани клетки и/или маркирани антитела от настоящето изобретение могат да бъдат използвани за специфично откриване на свързани с TPO- Rp състояния, по- специално нарушения. Аналогично, и както е обяснено по- горе, маркираните средства могат да бъдат използвани за идентифициране и изолиране на потенциални следващи лекарства.

Макар само предпочитани варианти на изпълнение на настоящето изобретение да са специфично описани по- горе, следва да се разбере че модификации и вариации на изобретението са възможни без отдалечаване от духа и предполагаемия обхват на изобретението. Други предпочитани варианти на изпълнение на настоящето изобретение са изброени в претенциите.

SEQ ID Nos. 1 до 7 представят амино киселинните последователности от олигопептидите от настоящето изобретение.

Пептидната дължина е идентифицирана по първия и последния амино киселинен номер съгласно позицията в пълна дължина (наречена също див тип) TPO- Rp, както е описано в WO 99/ 42127, което по отношение на TPO- Rp див тип амино киселинна последователност и нейното получаване, включено напълно в текста.

Отделните амино киселинни заместванията са наименовани по конвенционалната номенклатура, т.е. "R9A"- описва факта, че оригиналния Аргининов остатък в позиция 9 от TPO- Rp див тип е заместен с Аланин.

Фигурите показват:

Фиг. 1 ефекта на настоящите олигопептиди в третирана с карбоплатин (180 mg/kg) мишка,

Фиг. 2 ефекта на настоящите олигопептиди в третирана с карбоплатин (200 mg/kg) мишка

Фиг. 3 до 6 резултатите от изследване на стабилността под формата на HPLC профили,

(Фиг. 3: ден 0, 30 nmole от mM разтвор, възстановен от сух прах,

Фиг. 4A: ден 2, проби съхранявани като 1 mM разтвор,

Фиг. 4B: ден 2, проби съхранявани като сух прах,

Фиг. 5A: ден 9, проби съхранявани като 1 mM разтвор,

Фиг. 5B: ден 9, проби съхранявани като сух прах,

Фиг. 6A: ден 14, проби съхранявани като 1 mM разтвор,

Фиг. 6В: ден 14, проби съхранявани като сух прах.

Пример 1:

Ефекта на TPO- Rp (див тип и настоящите олигопептиди) за лечението на индуцирана от карбоплатин тромбоцитопения: I

Методи:

Моделът, използван за *in vivo* експерименти е докладван по-рано (*Akahori et al. (1996) Stem Cells 14: 678- 689, Akahori et al. (1996) Br. J. Haematol. 94: 722- 728, Shibuya et al. (1998) Blood 91: 37- 45, Andrews et al. (1996) Stem cells 14: 661- 677*). Въведените подобрения и модификации са посочени по- долу.

Схема за дозиране

На всяка тест група (PBS, TPO или TPO-Rp) се дава като самостоятелна ежедневна доза, прилагана чрез интраперитонеална инжекция. Дневните дози започват на ден 0 и продължава през целия експериментален период (ден 10). Две интраперитонеални инжекции всяка от карбоплатин 90 mg/ kg (PBS за група 11) се поставят в ден 0 и 4.

Кръвен тест

Кръвта се събира в дните 0 (основен), 8, 11, 14 и 18. Кръвта се получава от опашката на мишка (мишка 8 седмична възраст, мъжки екземпляр C57BL/6Y), последвано от катетризация. Обем от 80 μl кръв от всяка мишка се събира в хепаринизирана епруветка за събиране на кръв. 80 μl от кръвта след това се смесва с 160 μl разтвор на соли, включващ достатъчно EDTA (0.225%) за осигуряване на антикоагулация.

Ефекта на TPO-Rp със SEQ ID No. 2 (TPO-Rp, 1-18, R9A, R11A) и № 4 (TPO-Rp, 4- 18, R9A, R11A) в сравнение с дивият тип пептид (TPO-Rp див тип, амино киселинна последователност: A R G G T L E L R P R S R Y R L Q L R A R L N) *in vivo* е тестван в индуцирана с карбоплатин тромпоцитопения у мишка. С оглед работа с модел, който е толкова сходен колкото е възможно с клинична ситуация, по-рано докладвания модел с карбоплатин е много внимателно изучен (*Akahori et al. (1996) Stem Cells 14: 678- 689, Akahori et al. (1996) Br. J. Haematol. 94: 722- 728, Shibuya et al. (1998) Blood 91: 37- 45, Andrews et al. (1996) Stem cells 14: 661- 677*) и съответно модифициран. Съответно, внимателно е изучен метода за взимане на кръв от животни, за да се работи с животни, които показват по- висок отговор на даваното лекарство и които същевременно са под минимален стрес (виж Методите по- горе). Така, карбоплатиновата доза е повишавана до 180 mg/kg и се поставят по две интраперитонеални (i.p.) инжекции в ден 0 (половин доза) и ден 4 (втора половин доза). Карбоплатина индуцира остра тромбоцитопения на единадесетия ден.

Използваните групи животни са преддставени на Таблица I.

Таблица I.

Експериментални групи животни в "in vivo" изследвания

Група	Обща доза	Животни
1	Карбоплатин[a] +TPO-Rp див тип 0.03 mg/kg/дневно	8
2	Карбоплатин[a] +TPO-Rp див тип 0.30 mg/kg/дневно	8
3	Карбоплатин[a] +TPO-Rp див тип 0.90 mg/kg/дневно	8
4	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.03 mg/kg/дневно	8
5	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.30 mg/kg/дневно	8
6	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2 0.90 mg/kg/дневно	8
7	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.03 mg/kg/дневно	8
8	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.30 mg/kg/дневно	8
9	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 4 0.90 mg/kg/дневно	8
10	Карбоплатин[a] +TPO-Rp 2. 4 μg/kg/дневно	8
11	Без карбоплатин	8
12	Карбоплатин[a] самостоятелно	12

[a] 90 mg/ kg карбоплатин се дава в дните 0 и 4.

Фигура 1 показва остър спад на тромбоцитния брой в третираните с карбоплатин мишки и обобщава експерименталните резултати за отбелязаните по- горе различни експериментални групи. Резултатите са изразени в изменение на процента от основните стойности на отделните животни. Фигура 1 показва, че дивият тип пептид в доза от 300 μg/kg/ дневно и 30 μg/kg/ дневно значително повишава броя на тромбоцитите. Следва да се отбележи, че в тази много висока карбоплатинова доза, TPO в използваната

концентрация (2.4 μg/kg/ дневно), която по-рано показва ефект, е невъзможно да предотврати понижаването на тромбоцитите. Следва да се отбележи, че при тази много висока карбоплатинова доза, при използваната концентрация TPO (2.4 μg/kg/ дневно), която по- рано е показала ефект, е невъзможно да предотврати понижаване на тромбоцитите. Фигура 1 показва също, че скъсения TPO-Rp пептид със SEQ ID No. 2, т. е. остатъци от 1-18 и с R9A, R11A има силно протектиран спад на тромбоцитите, индуциран с карбоплатин, при две дози: 300 μg/kg/ дневно и 30 μg/kg/ дневно. Протективния ефект, причинен от две дози е еднакво значим; макар основан на степента на оцеляване (виж по- долу), по- ниската доза от 30 μg/kg/ дневно има специфична значимост, докато дозата от 300 μg/kg/ дневно има сравними ефекти спрямо TPO-Rp дивия тип. Най- високата пептидна доза от 0.9 μg/kg/ дневно показва много нисък ефект върху защитата на тромбоцитите, което вероятно се дължи на пептидната агрегация. Фигура 1 показва също, че съкратената версия на TPO-Rp пептид с SEQ ID No. 4, т. е. остатъци с 4 до 18, с R9A, R11A, показва известен ефект върху тромбоцитните нива в третирани с карбоплатин животни. Никой от използваните пептиди, див тип TPO-Rp, TPO-Rp 1- 18 (R9A, R11A) и TPO-Rp 4- 18 (R9A, R11A), имат значими ефекти върху други кръвни компоненти. Освен това, нито едно от третиранията не повлиява теглото на животните.

Важно е да се изследва степента на оцеляване на третираните животни. Статистически определен чрез CHI- квадратен анализ, най-значителният ефект и по този начин най- висока степен на оцеляване е наблюдаван с TPO-Rp, 1- 18 (R9A, R11A) пептид. Третиране с

дивия тип пептид, също, имат статистически значима степен на оцеляване.

Всичко изложено по- горе ясно показва, че пептида TPO-Rp 1-18 (R9A, R11A) значително възстановява индуцираната с карбоплатин тромбоцитопения и представлява едно 10- кратно подобрение на "in vivo" активността на съединението.

Пример 2:

Ефект на TPO-Rp (див тип и налични олигопептиди) за лечение на индуцирана с карбоплатин тромбоцитопения: II

Методи: Схема за дозиране

На всяка тест група се дава единична дневна доза, прилагана чрез интраперитонеално инжектиране. Дневните дози започват в ден 0 и продължават по продължение на експерименталния период (ден 13). Мене мални дози се дават в посочените дни: 0 и 4; 0, 4 и 8; 0, 4, 8 и 12; дни 8 до 14. Правят се и две интраперитоеални инжекции с карбоплатин 100 mg/ kg в ден 0 и 4.

Кръвен тест

Кръвта се събира в дните 0 (основен), 8, 11, 14 и 18. Кръвта се получава от опашката на мишка (мишка 8 седмична възраст, мъжки екземпляр C57BL/6J), последвано от катетризация. Обем от 80 μl

кръв от всяка мишка се събира в хепаринизирана епруветка за събиране на кръв. 80 μl от кръвта след това се смесва с 160 μl разтвор на соли, включващ достатъчно EDTA (0.225%) за осигуряване на антикоагулация.

Дозата карбоплатин се повишава до 200 mg/ kg и се дава като кумулативна доза чрез интраперитонеално инжектиране в ден 0 (половин доза) и ден 4 (втора половин доза). Карбоплатина индуцира остра тромбоцитопения на единадесетия ден.

Използваните групи животни са представени на Таблица II.

Таблица II.

Експериментални групи животни в "in vivo" изследвания

Група	Обща доза	Схема на дозиране (дни)
1	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 kg/kg/дневно	0 до 13
2	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/дневно	0
3	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/дневно	0 и 4
4	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/дневно	0, 4 и 8
5	Карбоплатин[a] +TPO-Rp SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/дневно	0, 4, 8 и 12
6	Карбоплатин[a] +TPO SEQ ID No. 2, 0.3 mg/kg/дневно	8 и 14
7	Карбоплатин[a] +TPO SEQ ID No. 2, 2.4 μg/kg/дневно	0 до 13
8	Карбоплатин[a] +TPO, 10 μg/kg/дневно	0 до 13
9	Карбоплатин[a] +TPO, 10 μg/kg/дневно	8 до 14
10	Без карбоплатин	-
11	Карбоплатин[a] самостоятелно	0 и 4

[a] 100 mg/ kg карбоплатин се дава в дните 0 и 4.

Резултати:

Фигура 2 обобщава резултатите от третиране на мишка с карбоплатин за всички експериментални групи (RCN-01303 представя олигопептида със SEQ ID No. 2). Резултатите са изразени в процентно изменение от основните тромбоцитни стойности на отделни животни.

Фигура 2 показва, че пептида в доза от 300 μg/kg дневно повишава броя на тромбоцитите. Следва да се отбележи, че дозата карбоплатин е повишена в сравнение с Пример 1 с оглед тестване потенциала на съединението в случа на остра тромбоцитопения, което е обичайна клинична ситуация. Използваният TPO хормон в концентрации от 2.4 μg/kg дневно- както в Пример 1 с карбоплатинова доза 180 mg/kg дневно- отново не е в състояние да предотврати понижаването на тромбоцитите. При доза по- висока от 10 μg/kg дневно, TPO показва известен ефект, който няма статистическа значимост. Обаче, защитният ефект причинен от олигопептида със SEQ ID No. 2 е по- висок от причинения от TPO в този конкретен карбоплатинов модел.

Фигура 2 показва също обобщение на резултатите, където се тества възможността на редуцирано дозиране на олигопептида. Олигопептида в концентрация от 0.3 mg/kg дневно се дава само в ден 0; дни 0 и 4; 0, 4 и 8; и 0, 4, 8 и 12. Следва да се отбележи, че дозирането на пептида в дни 0 и 4 само е достатъчна да покаже

защита в третираните с арбоплатин мишки. Статистически значими нива на защита са наблюдавани в дните 11 и 14. Интересно е да се отбележи, че онези групи, които са минимално третирани показват голяма вариаблиност в отговора. Такава ситуация е общоизвестна, доколкото се знае, че индивидите отговарят различно на едно и също третиране. Независимо от това, налице е статистически значим ефект, причинен от олигопептида със SEQ ID No. 2, когато се дава само в дните 0 и 4. Също така, дозиране в дните 0, 4 и 8 или 0, 4, 8 и 12 показват значителен ефект върху тромбоцитопенията. Ефекта наблюдаван с това минимално дозиране е сравнимо с ефекта с непрекъснато прилагане (дни 0 до 13) на олигопептида. Такава възможност за редуцирано дозиране, но със същия терапевтичен ефект, е явно клинично преимущество.

Изследванията с див тип TPO-Rp и настоящите олигопептиди показват, че пептидния механизъм на действие е различно от това на природния хормон. Налице е липса на TPO ефект върху пациенти, които за първи път са получили хемотерапия и, няколко дни по-късно, са третирани с TPO. Съответно, провежда се следния експеримент.

Група от третирани с карбоплатин животни, на които е давано хемотерапевтично средство от ден 0, получават TPO в доза от 10 μg/kg дневно от 8-я до 14-ти ден. Аналогично, в друга група, на третираните с карбоплатин от ден 0 животни, се дава олигопептида със SEQ ID No. 2 при 0. 3 mg/kg дневно от ден 8 до ден 14. Резултатите също са показани на Фигура 2. TPO не показва значителен ефект върху тромбоцитопенията. В противоположност на

това, TPO-Rp (SEQ ID No. 2) показва спасяване на нивото на тромбоцитите, благодарение на факта, че се дава след началото на терапията. Статистически значимо повишение в тромбоцитното ниво при третирани с олигопептид животни предполага, че неговият протективен ефект се дължи не само на това, че се дава в началото на терапията. Това показва способността на олигопептида от настоящето изобретение да предотврати увреждащият ефект на карбоплатина когато се дава след началото на терапията, но също показва, че олигопептида има различен механизъм на действие в сравнение с TPO. Така, двата ефекта- 1) схемата на минимално дозиране и 2) различни механизми на действие- осигуряват относителни преимущества.

Пример 3:

Фармакокинетика на олигопептидите *ex vivo*

Методи:

Профилите на разграждане на див тип TPO-Rp, TPO-Rp 1- 18 (R9A, R11A, SEQ ID No.4) са изследвани в човешки серум (сборен серум от 200 пациента) и плазма на плъх (сборна плазма от 50 животни). За да стане възможно откриването на разграждане, са използвани маркирани с I^{125} пептиди (маркирани при Y14). При HPLC анализа са открити само интактният пептид и маркираните продукти от разграждането. Поради това, такъв анализ, проведен при различни точки, ясно показва кога даден пептид е разграден.

Инкубацията се осъществява при 37°C. Концентрацията на маркирания пептид е ~ 1 μM в тези изследвания.

Резултати:

Резултатите от пептидното разграждане в сборната плъша плазма са представени на Таблица III. Полу- живота на TPO-Rp се наблюдава, че е ~ 12 минути. TPO-Rp 1-18 със SEQ ID No. 2 показва слабо съкратен полу- живот от ~ 1.1 минути, докато олигопептида със SEQ ID No. 4 показва много къс полу- живот, ~ 0. 5 минути, в плъша плазма.

Таблица III

Ex vivo стабилност на пептиди при 37°C

Пептид	Сборна плъша плазма	Сборен човешки серум
TPO-Rp, див тип	12.1	1.9
TPO-Rp (1-18; R9A, R11A)	1.1	9.6
TPO-Rp (4-18; R9A, R11A)	0.5	4.9

Резултатите от пептидното разграждане в сборен човешки серум също са показани на Таблица III. В противоположност на плъшата плазма, в човешкия серум TPO-Rp дивият тип пептид има полу- живот от ~ 1.9 минути. TPO-Rp 4- 18 (R9A, R11A) има подобрена стабилност и полу- живот от ~ 4. 9 минути. Относително по- дълъг полу- живот е получен с олигопептида 1-18 (R9A, R11A) – полу- живот от ~ 9. 6 минути, което петкратно подобрена стабилност

над тази на дивия тип олигопептид. Това представлява значително подобрение, тъй като повечето пептиди имат относително къс полу-живот от 2-3 минути. Следва да се отбележи, че TPO-Rp 1- 18 R9A, R11A показва *in vivo* подобрения на активността над дивия тип TPO-Rp въпреки неговия по- къс полу- живот в плъша плазма.

In *vivo* изследване на разграждането на TPO-Rp 1- 18 R9A, R11A (3 mg/kg) в плъхове след интравенозно прилагане показва изчислен полу- живот в кръвта от 7. 3 минути.

Пример 4:

Пептидна стабилност

Методи:

Използваният HPLC метод се основава на ултравиолетово откриване на пробата по време на елуация от фазова колонна система, C8 MICROSORB MV колона (*Rainin Instrument Company*). Двете буферни системи започват с 9.5 % 5 mM TFA (буфер A) и 5% ACN (буфер B). След инжектиране на пробата, процента на B рязко се повишава до 10% и след това постепенно е повишава до 35% в продължение на 10 минути. Периода на елуация на пробата е последван от кратко промиване на колоната с повишено съдържание на буфер B до 90%.

Резултати:

Стабилността на дивият тип TPO-Rp, TPO-Rp 1- 18 (R9A, R11A, SEQ ID No. 2) и TPO 4- 18 (R9A, R11A, SEQ ID No. 4) се се насочват чрез HPLC след съхраняване на трите пептида при следните три температури: стайна температура (~ 20°C), 4°C и -20°C. Пептидите се съхраняват или като 1 mg сух прах, или като 1 mM разтвор във вода, без ексципиенти. След установяване на HPLC елуационните профили на тези три пептида в ден 0, HPLC елуационните профили се тестват отново в ден 2, 9 и 14.

Фигура 3 показва HPLC профилите за 30 nmole див тип TPO-Rp и по- късите олигопептиди в началото на изследването, когато 1 mM пептидни разтвори се получават от сух прах. Фигура 4 показва HPLC профили на пептиди, съхранявани като 1 mM разтвор (Фиг. 4A, или сух прах Фигура 4B) в ден 2 от изследването. Ден 9 от изследването на пептидната стабилност, както е показано на Фигура 5A и 5B, показва че нява изменения в пептидните HPLC профили, като по този начин показват голяма пептидна стабилност при съхраняване на стайна температура, 4°C или ~ 20°C. Следва да се отбележи, че в ден 14 от изследването на пептидната стабилност, Фигура 6A и 6B, див тип TPO-Rp и двата олигопептида от настоящето изобретение, показват непроменени HPLC профили. Не са установени сигнали за пептидно разграждане при съхраняване както като 1 mM разтвор, така и като прах, при стайна температура, 4°C или ~20°C. Следва да се заключи, че TPO-Rp и олигопептида от настоящето изобретение би могъл да бъде съхраняван като 1 mM разтвор във вода или сух прах, на стайна температура, 4°C или ~20°C, за период от две седмици без какъвто и да е знак на пептидно разграждане.

По- нататъшни изследвания показват, че див тип олигопептид TPO-Rp и пептида със SEQ ID No. 2, получен като 1 mM разтвори във вода, разтвор на сол или разтвор на соли с 0.1% човешки албумин, пазен при ~ 20°C, 4°C и стайна температура за 1, 3 и 4 седмици, не показва знак на разграждане в HPLC изследванията.

Пример 5

Процедура на получаване на форми на TPO-Rp 1- 18 R9A, R11A и на производство

5A) Разтвор на вехикулума

Ингредиенти	% w/v	mg/ml	4L batch
Натриев ацетат, трихидрат, USP 10 mM (F. W. 136.08)	0.136	1.361	5.444 gm
Инжекционна вода, USP q. s.	100	1 mL	4 Liters
PH*	5.3 ± 0.2		

* (необходими са 10N HCl и след това 1N HCl или 1N NaOH разтвор за коригиране на pH)

Манитол, USP	5.0	50	200 gm

Процедура на получаване:

1. 90% (3.6 литра) вода за инжекционен разтвор (WFI) се добавят в подходящ стъклен контейнер.

2. 5. 444 gm Натриев ацетат, трихидрат се добавят в #1.

3. pH от #2 се регулира с 10N HCl (прибл. 600 ul) и ако е необходимо, допълнително количество 1N HCl или 1N NaOH до pH 5.3 ± 0.2.

4. 200 gm Манитол се добавят и се разтварят в #3. Той се смесва при внимателно разбъркване докато се разтвори напълно.

5. Достатъчно количество от WFI се добавя в #4 до краен обем от 4 литра. Той се смесва при разбъркване до хомогенност.

6. Разтвора се филтрува при асептични условия, разтвор #5 се филтрува през 0.2 микронна мембрана в стерилен контейнер.

7. Разтвора (100 mL/епруветка) се напълва асептично в седем стъклени епруветки тип 1, изготвени съгласно стерилизационната процедура. В допълнение, две аналогично стерилизирани епруветки (10 mL за епруветка) се запълват като начало и представляват

проби. Те се запечатват с тефлонови запушалки и се запечатват с алуминиево покритие.

5B) Инжекционен разтвор (1 mg/ml)

Ингредиенти	% w/v	mg/ml	600 mL batch
TPO-Rp 1- 18, R9A, R11A (безводна свободна база) прах*	0.1	1	0.66 gm*
Вехикулум виж 5A	100	1 mL	600 mL

Забележка: (за 5B, 5C, 5D)

TPO-Rp 1- 18, R9A, R11A се доставят като водно ацетатна сол. Количеството се изчислява както следва:

Количество пептиден прах (водно ацетатна сол) =

$$\frac{\text{Количество на необходимата свободна база}}{\text{\% пептидно съдържание}}$$

*основано на пептидно съдържание 90.7%

Процедура на производството

1. Точно количество от разтвора на вехикулума (600 mL) се добавя към подходящ стъклен контейнер.

2. Точно количество олигопептиден прах (0.66 gm прах) се добавя и разтваря към #1 и се смесва добре.

3. pH на разтвор #2 се измерва и регулира до pH 5.3 ± 0.2, ако е необходимо.

4. Разтвор #3 се филтрува стерилно през 0.2 микро мембрана (Milipore Durapore мембрана или еквивалент), при асептични условия.

5. Разтвора се напълва асептично (75 mL/ епруветка) в седем стъклени епруветки тип 1, получени съгласно стерилизационната процедура. Допълнителни две, стерилизирани по аналогичен начин епруветки (10 mL за епруветка) се запълват както първите и остават проби. Запушването става с Тефлонова запушалка и алуминиево покритие.

5C) Инжекционен разтвор (5 mg/mL)

Ингредиенти	% w/v	mg/ml	600 mL batch

TPO-Rp 1- 18, R9A, R11A (безводна свободна база) прах*	0.5	5	3. 3 gm*
Вехикулум виж 5A	100	1 mL	600 mL

Процедура за производство: виж 5B с модификация на количеството съгласно горната Таблица.

5 D) Инжекционен разтвор (9 mg/ mL)

Ингредиенти	% w/v	mg/ml	650 mL batch
TPO-Rp 1- 18, R9A, R11A (безводна свободна база) прах*	0.9	9	6. 45 gm*
Вехикулум виж 5A	100	1 mL	650 mL

Процедура за производство: виж 5B с модификация на количеството съгласно горната Таблица.

Пример 6:

Методи: "*In vitro*" сигнално изследване

Обработка на клетките:

Обработка на клетките: Клетки TF-1 се отглеждат до приблизителна плътност от 1 x 10^6 клетки в среда RPMI 1640 с 1 x Penicilin/Streptomicin, 2 mM глутамин, 10% фетален телешки серум (Hyclone) и 1 nm/ ml GM-CSF, центрофугират се и се ресуспендират в среда с 3% серум и без GM- CSF. Клетките се оставят 14- 18 часа при 37°C (5% CO_2), центрофугират се и ресуспендират при плътност 1 x 10^6 клетки/ml в среда без серум е GS-CSF. 2 ml от клетъчната суспенсия се третира с олигопептида или TPO (както е посочено за експеримента) при 37°C за 30 мин (5% CO_2). 10 ml ледено студен буфер от клетъчно промиване се добавят за една Фалконова епруветка и се центрофугират бързо при 4°C и 3000 rpm. Средата внимателно се аспирира и след това промиването се повтаря двукратно с PBS.

Провеждат се следните етапи върху лед. Средата се аспирира и се добавят 0.6 ml от 2 x лизисен буфер за епруветка. Той се отпипетира и се прехвърля в епруветки на Епендорф, поставят се върху лед за 30 минути и се центрофугират при 14 000 x g за 10 мин. Супернатантата (лизата) се използва в имунопреципитации.

Имунопреципитации: За имунопреципитация се използва 20- 40 μL GammaBind G сефароза. Леглата от протеин G се промива няколкократно с 0. 5 x лизисен буфер в епруветки на Епендорф и за имунопреципитация се добавят 1- 4 μg антитяло PY-99 (*Santa Cruz-Biotechnology*). Епруветките се инкубират при ротация "край- към-края" за 2 часа при стайна температура. Лизата се добавя и епруветките по- нататък се инкубират при ротация "край- към края" за една нощ при 4°C. Леглата се промиват 3 пъти с 1 x лизисен буфер и

веднъж с 0.5 M Tris pH 6.5. Добавят се 50 μl буфер от SDS- пробата и последните се варят за 3 минути преди прилагането им върху геловете.

Анализ по *Western*: около 10 μl/ проба се пропускат върху 8% полиакриламиден мини гел, прехвърлят се върху PVDF мембрана (*Millipore*), блокират се за 1 час в буфер за блокиране и се инкубират с αSTATS антитяло (Santa Cruz- Biotechnology) в продължение на една нощ при 4°C при разреждане 1:1000. Мембраната се промива, инкубира се с подходяща конюгирана с вторично антитяло алкална фосфатаза, разреждане 1: 2000 при стайна температура за 2 часа. PVDF- мембраната се промива с Blotto и се развива с NBT/BCIP (Cappel).

Резултати:

Оценява се дали олигопептидите, които не показват никакво очевидно разграждане при HPLC анализ (виж Пример 4) все още поддържат своята биологична активност.

Активността на олигопептидите от настоящето изобретение и див тип TPO-Rp се изпитва чрез изследване на *in vitro* сигнализиране. Използвайки горните идентифицирани стандартни процедури, TF-1 клетките се стимулират с пептидни проби, които претърпяват HPLC анализ. Измерва се фосфорилирането и по този начин активирането на STATS, субстрат на JAK2 киназа, която се активира с TPO-R сигнална трансдукция. Пептидите се тестват при 3 μM концентрация в "ден 18" от изследването за стабилност и 50 nM и 5 μM в "ден 30" от

изследването на стабилността. Всички пептиди са оценявани три до четири пъти в независими експерименти. Всички данни се събират, сканират се оцветяванията по Western и интензивността на STATS фосфорилацията се определя количествено.

Данните от всички експерименти (средно +/- SEM) са представени на Таблица IV до IX (виж по- долу) (W: вода, S: разтвор на соли, H: 0.1% HAS). Резултатите показват известни различия в пептидната активност при съхраняване при различни условия. В "ден 18" от изследването за стабилност, TPO-Rp (1-18, R9A, R11A) пептида показва значително понижена активност при съхраняване на стайна температура. Активността се поддържа когато температурата е постоянно 4°C или -20°C. Макар активността да се съхранява когато пептидният разтвор е приготвен във вода или разтвор на соли, активността на съединенията е значително по- добре съхранена с добавяне на 0.1% HSA. Това наблюдение се потвърждава с резултатите от "ден 30" от изследването за стабилност. Пептида със SEQ ID No. 2 остава активен след 30 дни, когато е разтворен във вода и съхраняван при -20°C. Когато е разтворен в разтвор на соли или разтвор на соли плюс 0.1% HSA, разтвора остава активен и при двете температури, 4°C и -20°C. При сравняване, в "ден 30" от изследването за стабилност, дивият тип TPO-Rp показва значително понижение на активността при съхраняване като разтвор във вода при -20°C.

Изследваните по- горе стабилности показват, че TPO-Rp (1-18, R9A, R11A, SEQ ID No. 2) е твърде стабилна молекула, когато се съхранява при -20°C в който и да е разтворител, запазва активността

си в продължение на един месец. Интересно е това, че макар да не са наблюдаван образец на разграждане в каквито и да са температурни или тези на разтворителя условия, активността проявява известни различия.

Пример 7:

Биологична активност на скъсени TPO-Rp олигопептиди

Методи:

Олигопептидите със SEQ ID Nos. 1 до 7 се синтезират чрез твърдо фазова синтеза и последващо препаративно HPLC пречистване до 90- 95% чистота. Идентичността на олигопептида се тества чрез масова спектроскопия и амино киселинен анализ. Означеният MW е от масова спектроскопия ($M + H^+$) (SEQ ID No. 1: 2141, No. 2 1971, No. 3: 1857, No. 4: 1687, No. 5: 2240, No. 6: 2069, No. 7: 2736, див тип: 2766).

Представени са кривите, съответстващи на дозите от настоящите олигопептиди и тяхната активност е сравнена с дивия тип TPO-Rp.

Активността в отговор на пептидната доза се преценява най-напред чрез in vitro сигнално изпитване. Измерва се фосфорилацията и дължащата се на това активация на STAT5, субстрат на JAK2 киназа, която се активира чрез TPO-Rp сигнална трансдукция. Всяка олигопептидна активност се адресира през широк интервал от концентрации. Пептидите се тестват при концентрации от 0.3, 3, 10,

30 nM и 0.1, 0.3, 3 и 30 μM TPO-Rp. Олигопептидната активност като измерване на STAT5 фосфорилация във всеки експеримент е сравнена с активността, получена с 10 ng/ml TPO, концентрация на хормона, която дава максимално активиране и сигнализиране чрез TPO-Rp. Всички пептиди се оценяват четири до пет пъти в независими експерименти. Всички данни се събират, оцветяванията по *Western* се сканират и интензитета на STAT5 фосфорилацията се определя количествено.

Резултати:

Активността на всеки олигопептид се определя като процент от неговата максимална активност; така 100% активност се определя спрямо стойността на STAT5 протеинова фосфорилация, получена с 30 μM олигопептидна концентрация.

Резултатите ясно показват, че всички олигопептиди притежават активност, сравнима с дивия тип TPO-Rp. Таблица X (виж по- долу) обобщава приблизителни EC_{50} стойности за всички тествани олигопептиди.

Първия комплекс олигопептиди (A1- L18, SEQ ID Nos. 1 и 2) показват не само активността, сравнима с дивия тип TPO-Rp, но и също подобрение във възможностите на техните R9A, R11A форми (приблизително EC_{50} 10 nM). Следва да се отбележи, че тази част от олигопептида е критична за TPO-Rp активността, когато е адресирана през Аланинов път и структурен анализ. Повишаването

на ктивността може да се дължи на подобрението на олигопептидната структура, стабилност или и двете.

Най- късият олигопептид, с дължина от 15 амино киселини (G4-L18, SEQ ID No. 3 и 4) притежава активност, сравнима с дивия тип TPO- Rp в двете форми. Третият комплекс от олигопептиди (G4- R21, SEQ ID No. 5 и 6) показва активност, идентична на дивия тип TPO- Rp в двете форми.

Пример 8

28- дневно интравенозно изследване на токсичността на пептида със SEQ ID No. 2 в плъхове

Локалната и системна токсичност на пептида със SEQ ID No. 2 е охарактеризирано в това 28- дневно интравенозно изследване в Crl: CD®(SD)IGS BR плъхове. Възстановяването на групата от влиянието при високата доза се определя през последващ 28-дневен възстановителен период. Пептида се прилага чрез интравенозни болус инжекции през латералната опашна вена на три токсикологични групи (Групи 2, 3 и 4) и на три токсикокинетични групи (Групи 2A, 3A и 4A) при нива на дозите от 5, 15 и 45 mg/ kg/ ден, съответно, за минимум от 28 последователни дни. Конкурентната вехикулумна група (Група 1) получава 5% разтвор на манитол, 10 mM натриев ацетат при сравним режим. Вехикулума и 45 mg/ kg/ ден групи всяка се състоят от 15 мъжки и 15 женски, като групите 5 mg/ kg/ ден и 15 mg/ kg/ ден всяка се състои от 10 мъжки и 10 женски, и

трите токсикокинетични групи, всяка се състои от 9 мъжки и 9 женски. Дозата за всички групи е с обем 5 ml/ kg.

Всички животни, определени за токсикологичните групи се наблюдават за клинични признаци на токсичност преди прилагане на дозата, непосредствено след прилагане на дозата и един час след това и веднъж дневно по време на възстановителния период. Провеждат се подробни лекарски прегледи и индивидуалните телесни тегла и консумация на храна се записват седмично. Параметрите на клинична патология (хематология, химия на серума и анализ на урината) се оценяват преди началото на прилагане на дозата, в средата на периода на лечение и в началната и след възстановяването аутопсии. Събират се намазки от костен мозък по време на предшевстващия теста период и при плановите аутопсиии. Серума се събира за определяне на антителата при началната аутопсия. Провеждат се офталмични изследвания преди началото на дозиране, по време на 3-та седмица от изследването и по време на възстановителния период, изследване седмица 7. Пълна аутопсия се провежда на всички животни. Събраните органи се претеглят при началната и възстановителна аутопсия. При началната аутопсия, избрани тъкани се събират при началната некроскопия и се изследват микроскопично.

Събират се кръвни проби за определяне нивата на плазмени тест съставки в дните 0, 6, 14, 20 и 27 от отделна група животни, определени за токсикокинетичната част на изследването.

Преживяемост, телесни тегла, консумация на храна, параметри на клинична патология, тегла на органите и цитологията на костен мозък са неповлияни от третиране с пептида. Няма налице свързани с пептида офталмологични, макроскопски или микроскопски промени.

Пептида със SEQ ID No. 2 е добре толериран при прилагане на мъжки и женски плъхове за 28 дни. На базата на понижението в теглото на простата жлеза в мъжки плъхове, нивото при което не се наблюдава ефект (NOEL) при женските плъхове е 45 mg/kg/ ден.

Пример 9

28- дневно интравенозно изследване на токсичността на пептидите със SEQ ID No. 2 при маймуни

В това 28- дневно интравенозно изследване в маймуни Cynomolgus се изследва локалната и системна токсичност на пептида със SEQ ID No. 2.Обратимостта на пептидните ефекти се изпитва след 28- дневен възстановителен период. Пептида се прилага чрез болус интравенозни инжекции през вена сафена на три групи при нива на дозата от 5, 15 и 30 mg/kg/ ден за 28 последователни дни. Женски маймуни се включват в схемата за дозиране един ден след мъжките маймуни. Контролната група с вехикулум получава 5% разтвор на манитол, 10 mM натриев ацетат при сравнителен режим. Контролната група с вехикулума и групата 30 mg/ kg/ ден всяка се състои от пет мъжки и пет женски маймуни. Групите, получаващи 5 и 15 mg/ kg/ ден, се състоят от по три мъжки и три женски маймуни. Обема на дозата за всички групи е 5 ml/ kg.

Всички маймуни се наблюдават както е описано в Пример 8.

Кръвни проби се събират от три групи маймуни в дните 0, 7, 14, 21 и 27 за определяне на плазмените концентрации на пептида със SEQ ID No. 2 и изчисляване на токсикокинетичните параметри.

В това изследване няма смъртност. Промени в клиничните показатели след ентравенозно инжектиране на пептида се появяват в повечето маймуни от повечето групи, определени по дозите. В мъжките, на които е прилагана доза 5 mg/kg/ ден от пептида няма свързани с веществото клинични прояви. В мъжките, получавали 15 mg/kg/ ден, се наблюдават фациални зачервявания (3/3) и лигавене (1/3). Мъжките, получили 30 mg/kg/ ден имат фациални зачервявания (4/5), зачервяване на телесната повърхност (3/5), лигавене (3/5), емезис (1/5) и понижен мускулен тон (1/5). При женските, получили 15 mg/kg/ ден, има зачервяване на лицето (3/3), зачервяване на телесната повърхност (2/3) и лигавене (183). Женските, получавали 30 mg/kg/ ден проявяват зачервяване на лицето (5/5), зачервяване на телесната повърхност (4/5), лигавене (4/5), емезис (2/5) и понижен мускулен тон (1/5). Всички клинични признаци са понижени и не се забелязват един час след прилагане на пептида. Нито един от тези клинични признаци не се появява по време на възстановителния период.

От третирането с пептида не се повлияват телесните тегла, параметрите на клинична патология (хематология, химия на серума и анализ на урината), физиологични параметри (телесна температура,

сърдечен ритъм, кръвно налягане и скорост на респирация), електрокардиографски показатели и тегла на органите. Няма свързани с тествания пептид офталмологични, макроскопски и микроскопски промени. Няма очевидни различия в пептидно-свързани промени между мъжки и женски.

Пептида със SEQ ID No. 2 е добре толериран, когато се прилага на мъжки и женски маймуни за 28 дни при дози достигащи 30 mg/kg/ ден. На базата на фациално зачервяване непосредствено след премане на дозата, се установява ненаблюдавано ниво (NOEL) при мъжки маймуни, получили 5 mg/kg/ ден. NOEL в женските не се наблюдава. Доколкото клиничните знаци и мускулно отслабване (наблюдавано в ден 1 от изследването в 1/5 мъжки и 1/5 женски) са преходни и не се наблюдават свързани с теста ефекти, NOEL е установен при маймуни от двата пола, получили доза от 30 mg/kg/ ден.

Пример 10

Ефект на пептида със SEQ ID No. 2 върху хистаминовото освобождаване

Ефекта на пептида със SEQ ID No. 2 върху освобождаването на хистамина се тества *in vitro* в мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMC).

Тестват се PBMC от четири различни обекта. Левкоцитни суспенсии се инкубират с различни концентрации от пептида със SEQ

ID No. 2 в гренициите от 3 μM до 10 mM. Използват се само човешко анти-IgE антитяло и буфер като позитивна и негативна контроли, съответно. Освободения хистамин се определя количествено с ELISA (IBL, каталожен номер RE 59221). Изпитването на чувствителността е 2. 4 ng/ mL.

Интервала на концентрацията от 3 μM до 10 mM се избира така, че да се оцени освобождаването на хистамина от пептида при нива, получени при интравенозно инжектиране. Така, концентрация от 30 mg/kg съответства непосредствено след инжектиране на ~ 30 μ M, предполагайки обем на разпределение от 400 ml за килограм тъкан. Известно е, че пептида се разпределя свободно в екстрацелуларните флуиди. Така, най- високата концентрация на пептида при 10 mM е по този начин от порядъка на приблизително 100 пъти по- високата концентрация в екстрацелуларните флуиди.

При най- високата концентрация от 10 mM пептида води до относително малко, но значително хистаминово освобождаване от 15 ng/ml. Тази стойност е ~10 кратно по- ниска от позитивната контрола (анти- IgE). Пептида в концентрация от 3. 3 mM или по- ниска не повлиява освобождаването на хистамина в човешки PBMC. Интервала съдържа всички терапевтични *in vivo* концентрации. Малко, но значимо хистаминово освобождаване се наблюдава с най-високата пептидна концентрация от 10 mM *in vitro*. Тази конценрация е значително по- висока от която и да е терапевтична доза.

Пример 11

Проби серум от маймуни и плъхове се анализират за откриване присъствието на IgG в маймуни Cynomolgus и плъхове, които са тествани в Примери 8 и 9. В никоя от 32- те маймунски серумни проби и 80-те плъши серумни проби не биха могли да бъдат открити антитела срещу Пептида със SEQ ID No. 2.

Претенции

1. Олигопептид с биологичната активност на TPO (тромбопоетин) рецепторен модулатор, състоящ се от 15 до 18 амино киселини с обща формула

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

X_1 е A R G или липсва,

X_2 е R или A,

X_3 е R A R или липсва.

2. Олигопептид съгласно претенция 1, който е избран от групата, състояща се от която и да е от амино киселинните последователности, определени в SEQ ID Nos. 1 до 6.

3. Олигопептид с амино киселинната последователност, определена в SEQ ID No. 7.

4. Нуклеотидна последователност, кодираща олигопептида съгласно претенции 1, 2 или 3.

5. Вектор, включващ нуклеотидната последователност от претенция 4.

6. Вектор съгласно претенция 5, който е бактериален, вирусен, бозайников или дрождев вектор.

7. Вектор съгласно която и да е от претенции 5 или 6, съдържащи още 5' и/или 3' регулаторни елементи, способни да насочат експресията на нуклеотидната последователност в подходяща гостоприемникова клетка.

8. Гостоприемникова клетка, включваща вектора от която и да е от претенции 5 до 7, способна да експресира олигопептида от претенция 1 или 2 при подходящи условия.

9. Гостоприемникова клетка от претенция 8, която е бозайникова, дрождена или бактериална клетка.

10. Метод за генетично модифициране на клетка чрез трансфектиране на клетката с вектор съгласно която и да е от претенции 5 до 7.

11. Метод съгласно претенция 10, характеризиращ се с това, че клетката се трансфектира чрез химично или електрично индуцирана трансфекция, по- специално електропорация или клетъчна фузия, ретровирус или вирусно медииран генен трансфер, липозомно медииран генен трансфер или бомбардиране с частички.

12. Метод за продуциране на бозайник, различен от човек, способен да формира олигопептид съгласно претенция 1, 2

или 3, където нуклеотидната последователност съгласно претенция 4 се въвежда в клетка на бозайник, различен от човек.

13. Бозайник, различен от човек, съдържащ в своите зародишеви клетки нуклеотидна последователност съгласно претенция 4, по- специално съдържащ гостоприемниковата клетка съгласно претенции 8 или 9.

14. Животно, различно от бозайник съгласно претенция 13, характеризиращо се с това е гризач или примат.

15. Метод за получаване на олигопептид съгласно претенции 1, 2 или 3, характеризиращ се с това, че включва трансфектиране на клетка с вектор съгласно която и да е от претенции 5 до 7, култивиране на клетката в културална среда при условия, позволяващи експресията на олигопептида и възстановяване на олигопептида от клетката или културалната среда.

16. Антитяло, което специфично се свързва с олигопептида от претенция 1, 2 или 3.

17. Антитяло съгласно претенция 16, което е моноклонално или поликлонално антитяло или техен фрагмент.

18. Антитяло, което се свързва специфично към антитялото от претенция 16 или 17.

19. Фармацевтичен състав за лечение на хематологични нарушения, по-специално тромбоцитопения, характеризиращ се с това, че включва олигопептида от претенция 1, 2 или 3, нуклеотидната последователност от претенция 4, вектора от която и да е от претенции 5 до 7, гостоприемниковата клетка от претенция 8 или 9 или антитялото от претенция 16, 17 или 18, незадължително в съчетание с фармацевтично приемлив носител.

20. Състав за диагностика на хематологични нарушения, по-специално тромбоцитопения, характеризиращ се с това, че включва олигопептида от претенции 1, 2 или 3, нуклеотидната последователност от претенция 4, вектора от която и да е от претенции 5 до 7, гостоприемниковата клетка от претенции 8 или 9 или антитялото от претенции 16, 17 или 18, незадължително в съчетание с фармацевтично приемлив носител.

21. Фармацевтичен или диагностичен състав съгласно претенция 19 или 20, характеризиращ се с това, че включва и тромбопоетин.

22. Фармацевтичен или диагностичен състав съгласно което и да е от претенции 19 или 20, характеризиращ се с това че е под формата на таблетка, драже, прахче, капсула, гранули, супозиториуми, пластир, липозома, покритие, инжекционен разтвор, разтвор за инфузия или орално

приложение, сироп, суспенсия, емулсия, спрей, инхалационен разтвор, аерозол, паста, мазило или лосион.

23. Приложение на олигопептида от претенции 1, 2 или 3, нуклеотидната поселдователност от претенция 4, вектора от която и да е от претенции 5 до 7, гостоприемниковата клетка от претенции 8 или 9 и/или антитялото от претеции 16, 17 или 18 за получаване на медикамент за диагностициране или лечение на хематологични нарушения, по- специално тромбоцитопения.

24. Приложение съгласно претенция 23, където медикамента съдържа още и тромбопоетин.

25. Метод за модулиране активността на TPO-Rp (тромбопоетин- рецептор), характеризиращ се с това, че олигопептида от претенции 1, 2 или 3 или антитялото от претенции 16, 17 или 18 се прилага на TPO-Rp в отсъствието или при наличие на тромбопоетин.

26. Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че модулирането е повишение или понижение на активността.

27. Метод за скриниране на лекарства, ефективни за диагностициране или лечение на хематологични нарушения, по- специално тромбоцитопения, характеризиращ се с това че включва скрининг на потенциалните лекарства за тяхната

способност да се конкурират с олигопептидите от претенция 1, 2 или 3 за свързване към TPO-Rp или за активиране на интрацелуларни сигнални пътища.

28. Метод за лечение на пациент, страдащ от нарушение, което е податливо на третиране с тромбопоетинов агонист, характеризиращ се с това, че включва прилагане на пациента на терапевтично ефективна доза или количество от олигопептида от претенции 1, 2 или 3 и/или от дивия тип TPO-Rp.

29. Метод съгласно претенция 27, характеризиращ се с това, че нарушенията са хематологични нарушения или тромбоцитопения, резултат от костно мозъчна трансфузия, радационна терапия, хемотерапия, алергични реакции или са идиопатични.

30. Метод съгласно претенции 28 или 29, характеризиращ се с това, че включва още прилагане на тромбопоетин.

31. Приложение на див тип TPO-Rp, нуклеотидната последователност кодираща див тип TPO-Rp, вектор съдържащ нуклеотидната последователност, гостоприемникова клетка, съдържаща вектора и/или антитяло, което се свързва специфично с дивия тип TPO-Rp за получаване на медикамент за лечение на хематологични нарушения, по- специално тромбоцитопения.

32. Метод за откриване или изолиране на TPO-Rp от източник, съдържащ TPO-Rp, характеризиращ се с това, че включва прилагане на олигопептида от претенция 1, 2 или 3 на източника, съдържащ TPO-Rp в условия, позволяваща свързването на TPO-Rp към олигопептида и изолирането му на TPO-Rp от последния.

33. Имунологично изпитване за откриване и/или изолиране на олигопептидите от претенции 1 до 3 от смес, характеризиращо се с това, че антителата от претенции 16 или 17 се прилагат към сместа и олигопептидите, свързани към антителата се откриват и/или изолират.

СЕКВЕНЦИОНЕН ЛИСТИНГ

<110> PLIVA, farmaceutska industrija, dionicko drustvo

<120> Пептид за тромбопоетиновия рецептор

<130> 14267

<140>
<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

Gln Leu

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Arg Gly Gly Thr Leu Glu Leu Ala Pro Ala Ser Arg Tyr Arg Leu
1 5 10 15

Gln Leu

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Gly Thr Leu Glu Leu Ala Pro Ala Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

Ala Arg

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

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

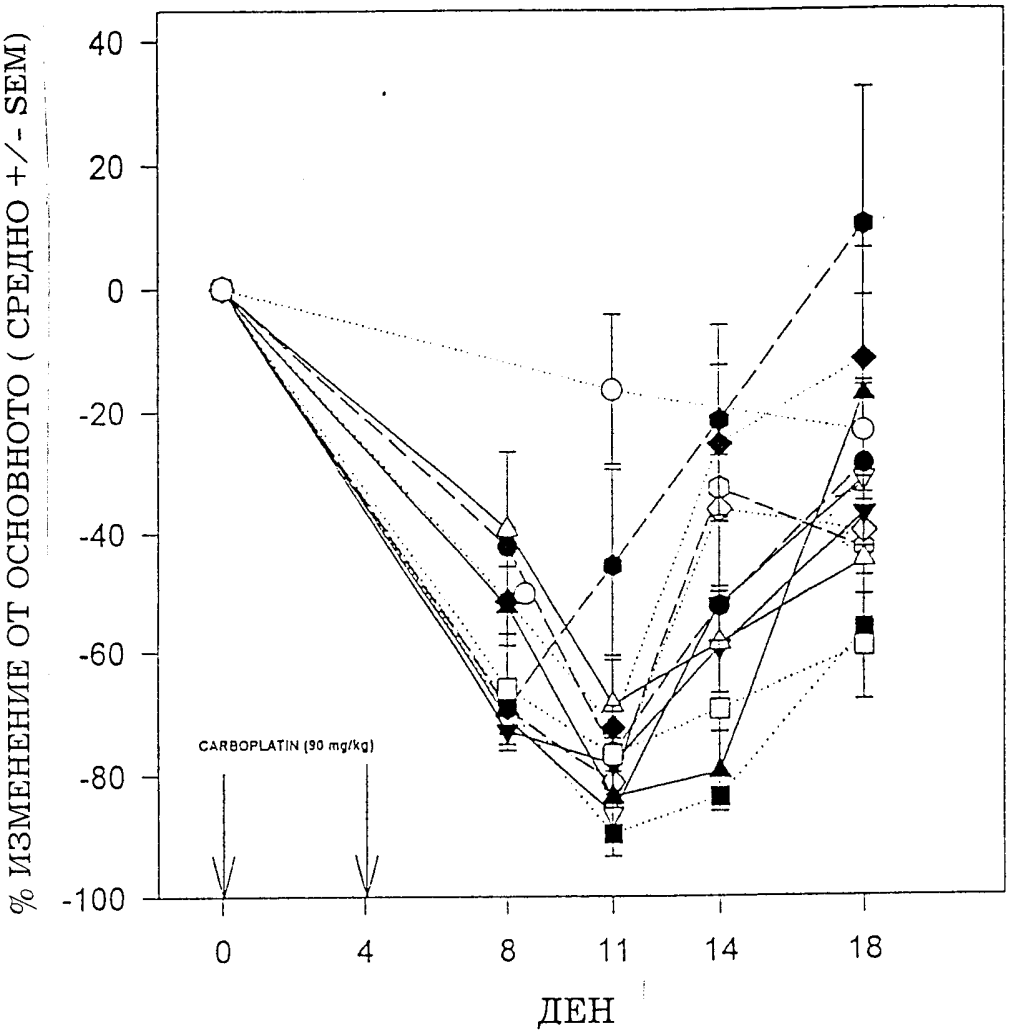
Ala Arg

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

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

Gln Leu Arg Ala Arg Leu Asn
20

ЕФЕКТ НА TRO/Rp(1-18;9,11-Ala) ВЪРХУ ТРОМБОЦИТИТЕ В ТРЕТИРАНИ С КАРБОПЛАТИН 8-СЕДМИЧНИ МЪЖКИ МИШКИ С 57 BL/6J



○ БЕЗ КАРБОПЛАТИН + PBS (N=7)

△ КАРБОПЛАТИН + TPO (2.4 ug/kg/ден) (N=5)

□ КАРБОПЛАТИН САМОСТОЯТЕЛНО + PBS (N=4)

▽ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (див тип) (0.9 mg/kg/ден) (N=5)

⬡ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (див тип) (0.3 mg/kg/ден) (N=5)

◇ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (див тип) (0.03 mg/kg/ден) (N=4)

▼ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (1-18; 9,11-Ala) (0.9 mg/kg/ден) (N=8)

⬢ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (1-18; 9,11-Ala) (0.3 mg/kg/ден) (N=7)

◆ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (1-18; 9,11-Ala) (0.03 mg/kg/ден) (N=8)

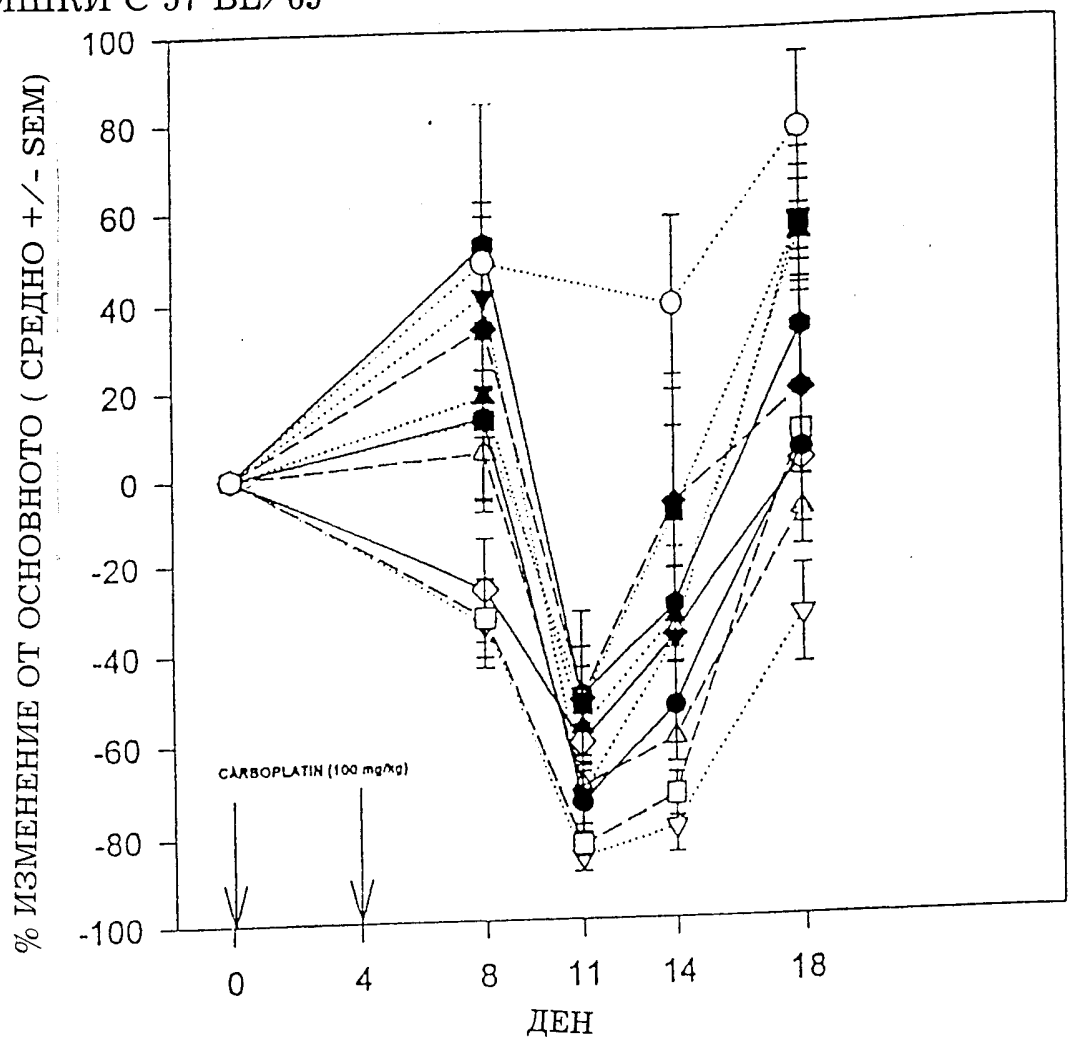
▲ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (4-18; 9,11-Ala) (0.9 mg/kg/ден) (N=5)

● КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (4-18; 9,11-Ala) (0.3 mg/kg/ден) (N=2)

■ КАРБОПЛАТИН + TPO - Rp (4-18; 9,11-Ala) (0.03 mg/kg/ден) (N=2)

ФИГ. 1

ЕФЕКТ НА TRO/RCN01303 ВЪРХУ ТРОМБОЦИТИТЕ В ТРЕТИРАНИ С КАРБОПЛАТИН 8-СЕДМИЧНИ МЪЖКИ МИШКИ С 57 BL/6J



○ БЪЗ КАРБОПЛАТИН (N=11)

△ КАРБОПЛАТИН + TPO (10 ug/kg/ден) (N=10)

▽ КАРБОПЛАТИН + TPO (2.5 ug/kg/ден) (N=10)

◇ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg/ден) (N=8)

□ КАРБОПЛАТИН САМОСТОЯТЕЛНО (N=13)

▼ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg; ден 0) (N=7)

⬢ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg; ден 0 & 4) (N=5)

◆ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg; дни 0, 4 & 8) (N=4)

▲ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg; дни 0, 4, 8 & 12) (N=7)

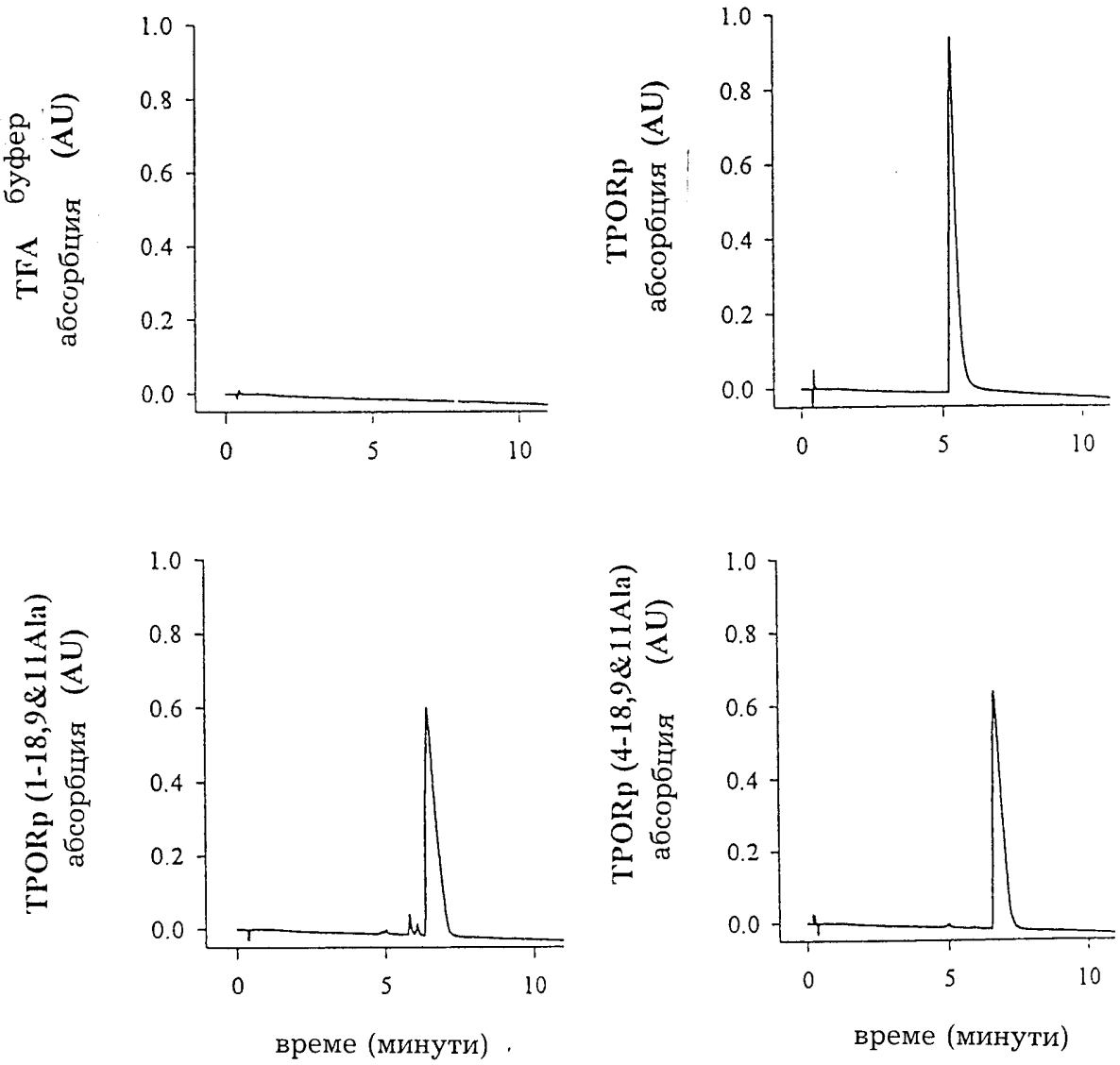
● КАРБОПЛАТИН + TPO (10 ug/kg; дни 8 до 14) (N=6)

■ КАРБОПЛАТИН + RCN01303 (0.3 mg/kg; дни 8 до 14)

ФИГ. 2

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 0

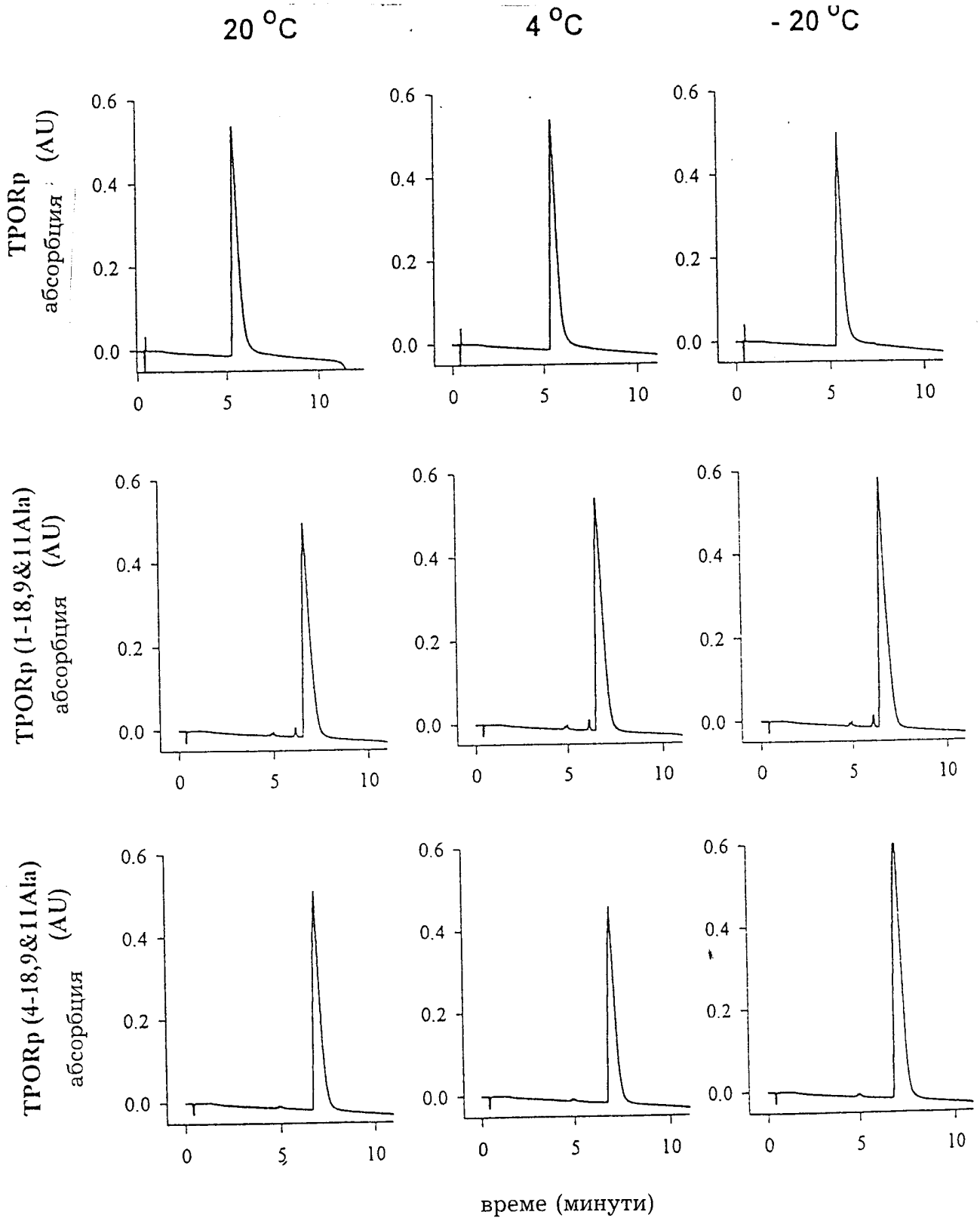
30 nmole от 1mM разтвор
възстановен от сух прах



ФИГ. 3

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 2

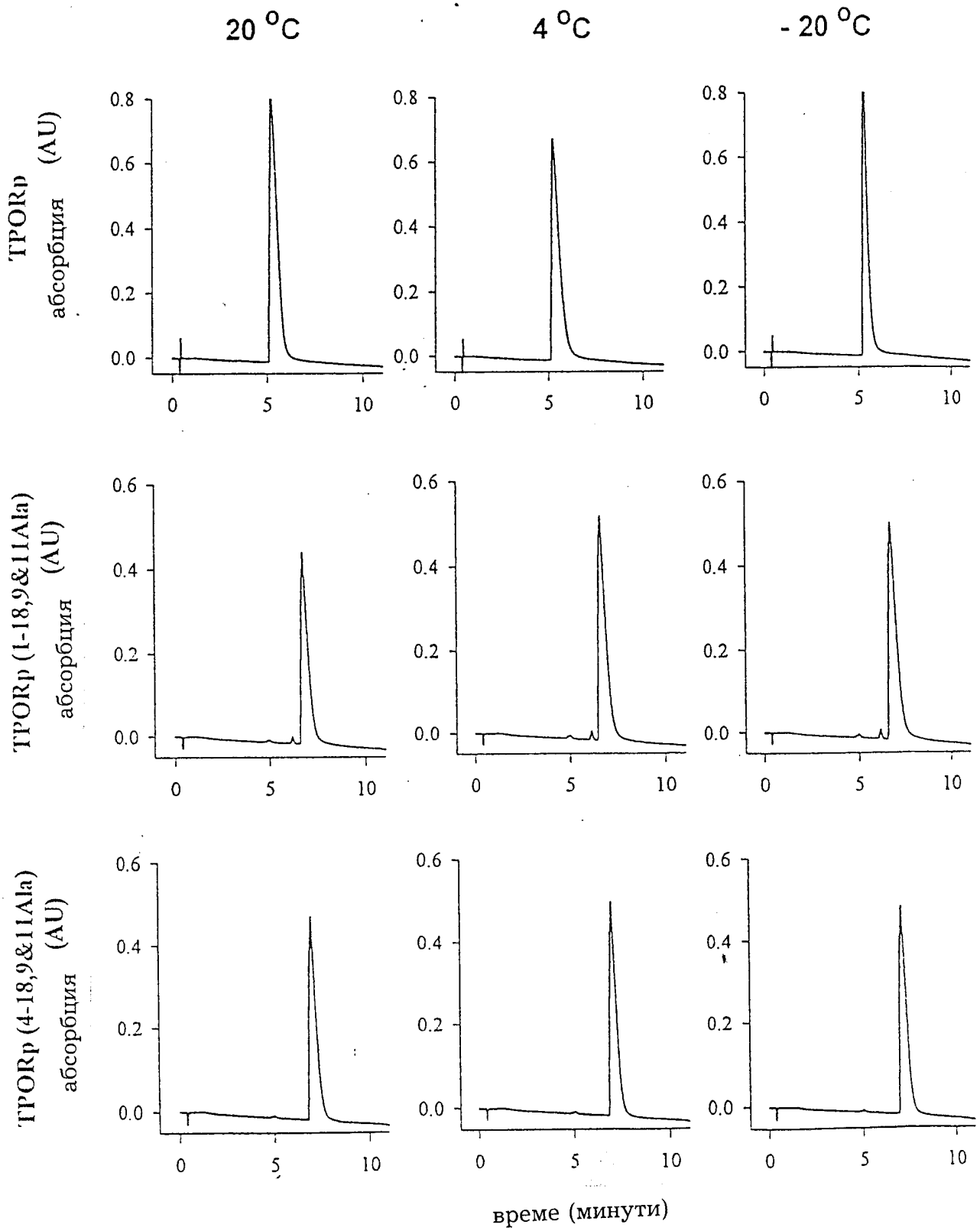
Проби, съхранявани като 1mM разтвор



ФИГ. 4А

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 2

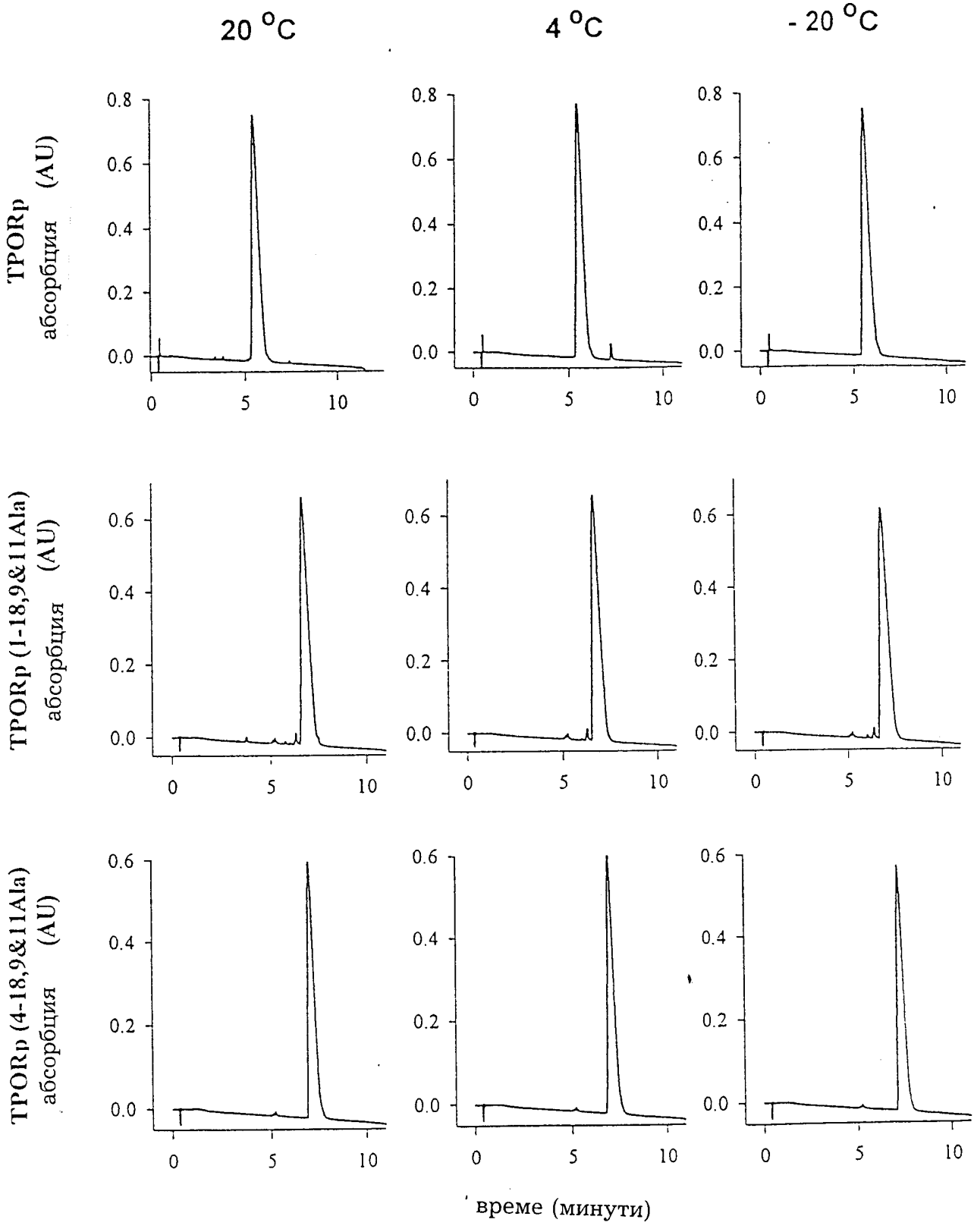
Проби, съхранявани като сух прах



ФИГ. 4В

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 9

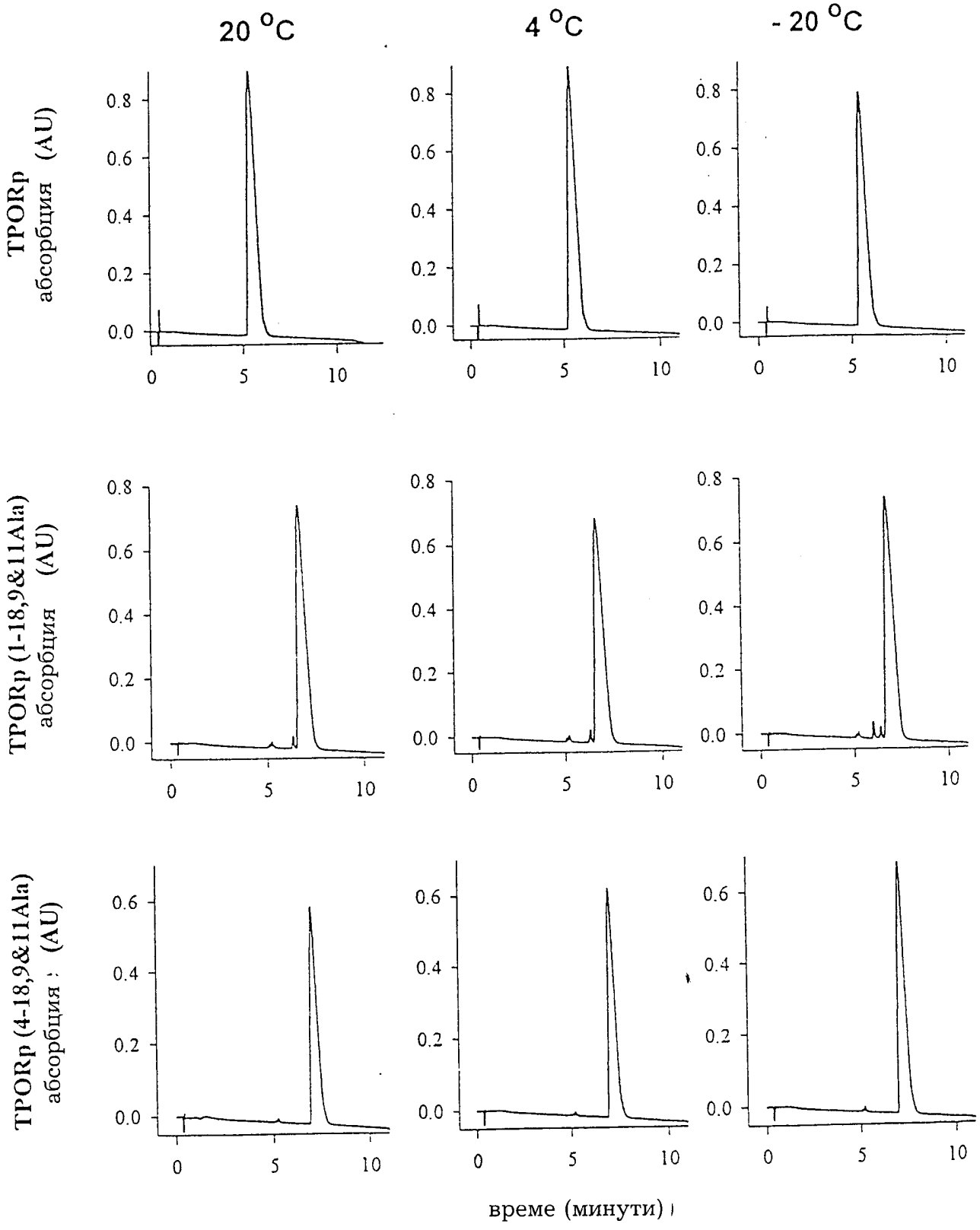
Проби, съхранявани като 1mM разтвор



ФИГ. 5А

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 9

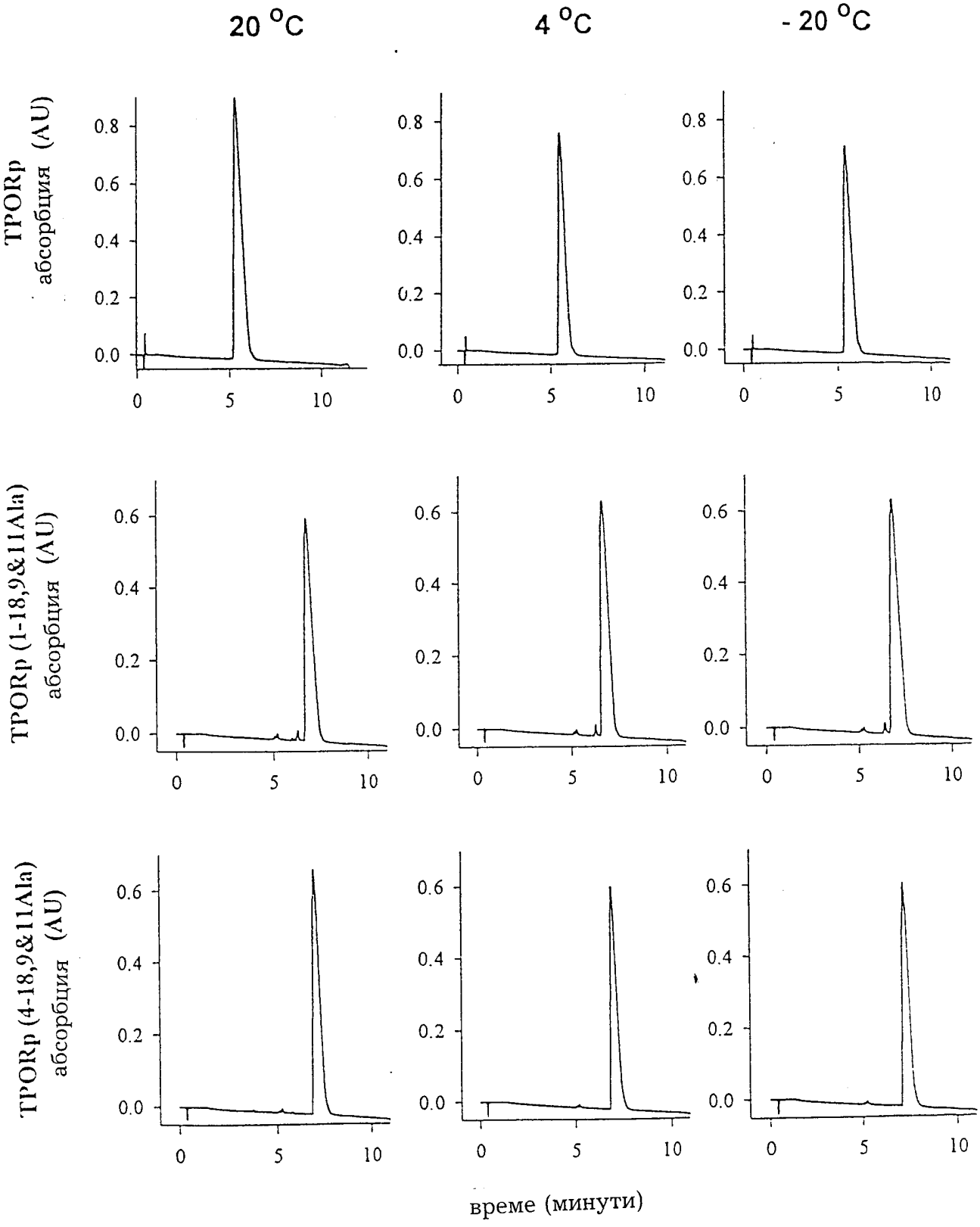
Проби, съхранявани като сух прах



ФИГ.5В

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 14

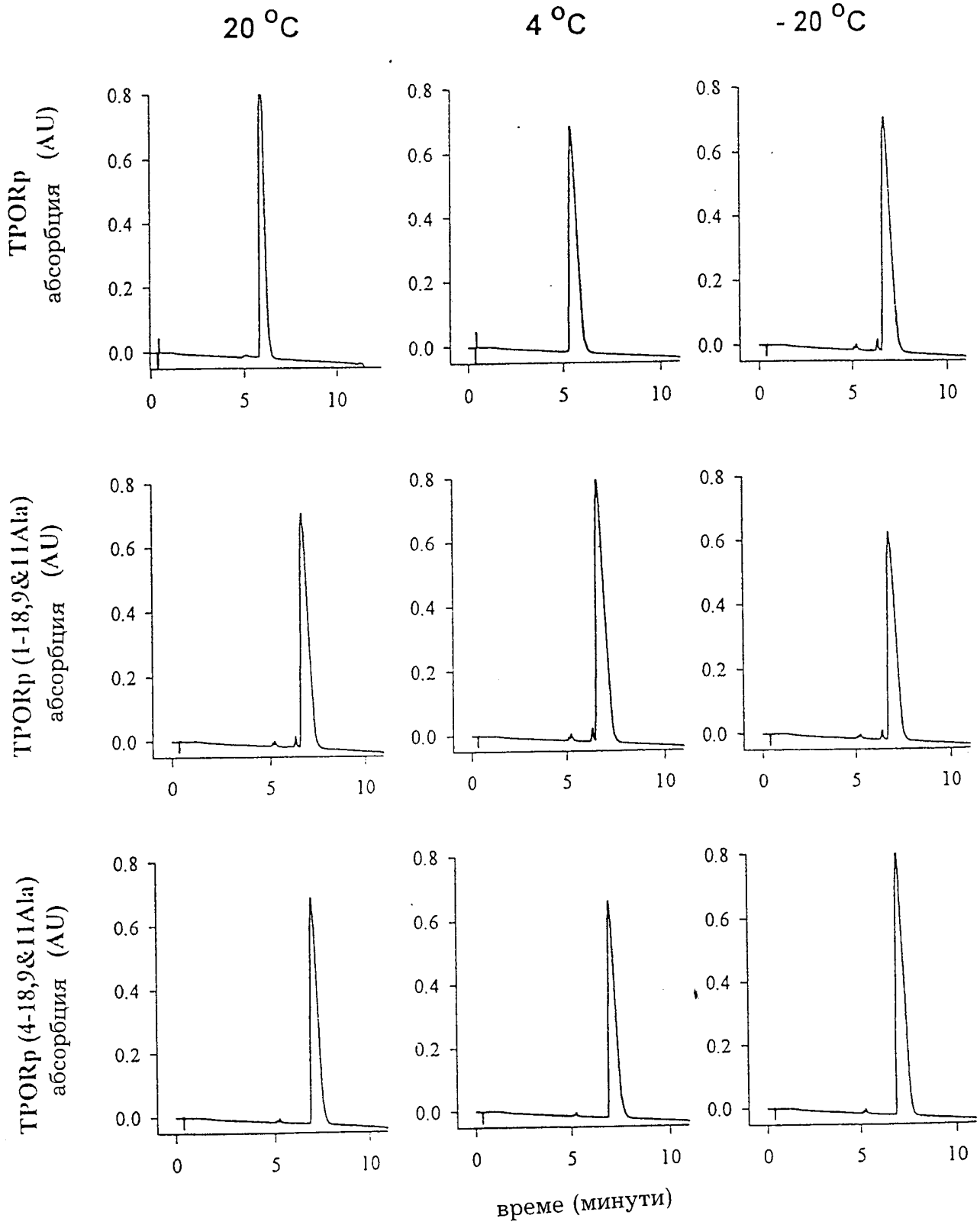
Проби, съхранявани като 1mM разтвор



ФИГ. 6А

TPORp и аналогично изследване за стабилност - Ден 14

Проби, съхранявани като сух прах



ФИГ. 6В

АКТИВНОСТ НА ПЕПТИДИТЕ, ИЗПОЛЗВАНИ В ИЗСЛЕДВАНИЯТА ЗА СТАБИЛНОСТ

TPO-Rp (1-18, R9A, R11A)$_{при}$ 3 μM; ДЕН 18 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	W	5.6	7.8	6.2	**6.5**	1.1
4	W	5.9	6.5	7.8	**6.7**	1.0
25	W	3.4	2.8	2.5	**2.9**	0.5
-20	S	6.5	8.9	7.6	**7.7**	1.2
4	S	5.4	6.2	4.9	**5.5**	0.7
25	S	2.4	1.9	2.2	**2.2**	0.3
-20	H	10.7	11.0	12.4	**11.4**	0.9
4	H	10.3	11.5	12.1	**11.3**	0.9
25	H	2.2	1.8	1.5	**1.8**	0.4

Таблица IV

TPO-Rp при (див тип): **3 μM;** ДЕН 18 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	**W**	10.4	11.8	12.0	**11.4**	0.9
4	**W**	5.9	8.3	6.1	**6.8**	1.3
25	**W**	6.4	3.9	4.2	**4.8**	1.4

Таблица V

TPO-Rp (1-18, R9A, R11A) при **5 μM;** ДЕН 30 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	W	8.2	11.0	11.1	9.8	1.4
4	W	3.8	5.2	6.4	5.1	1.3
25	W	3.0	4.2	5.6	4.3	1.3
-20	S	6.1	.8.2	7.4	7.2	1.1
4	S	4.6	5.8	6.2	5.5	0.8
25	S	1.8	4.2	3.2	3.1	1.2
-20	H	7.4	12.1	11.2	10.2	2.5
4	H	7.4	9.8	10.2	9.1	1.5
25	H	2.4	3.2	4.2	3.3	0.9

Таблица VI

TPO-Rp (1-18, R9A, R11A) при **0.05 μM;** ДЕН 30 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	W	3.4	4.8	2.5	3.6	1.2
4	W	3.2	2.1	3.8	3.0	0.9
25	W	3.1	2.0	1.9	2.3	0.7
-20	S	2.2	1.9	2.5	2.2	0.3
4	S	3.2	2.1	1.8	2.4	0.7
25	S	2.2	1.8	1.9	2.0	0.2
-20	H	6.2	4.5	5.9	5.5	0.9
4	H	5.4	4.2	6.1	5.2	1.0
25	H	2.1	1.5	1.9	1.8	0.3

Таблица VII

TPO-Rp (див тип) при 1 μM; ДЕН 30 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	W	4.9	6.5	3.2	**4.9**	1.7
-20	S	6.1	5.2	7.4	**6.2**	1.1
-20	H	6.4	5.2	8.5	**6.7**	1.7

Таблица VIII

TPO-Rp (див тип) при 0.05 μM; ДЕН 30 ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА СТАБИЛНОСТ

Условия		STAT5 активиране, измерено чрез фосфорилиране на протеина (условни единици)				
Температура (°C)	Разтворител	Експ. #1	Експ. #2	Експ. #3	Средно	SD
-20	W	3.2	2.1	1.5	**2.3**	0.9
-20	S	2.9	3.1	1.2	**2.4**	1.0
-20	H	4.2	2.4	2.9	**3.2**	0.9

Таблица IX

Приблизителни EC_{50} стойности за скъсени TPO-Rp пептиди

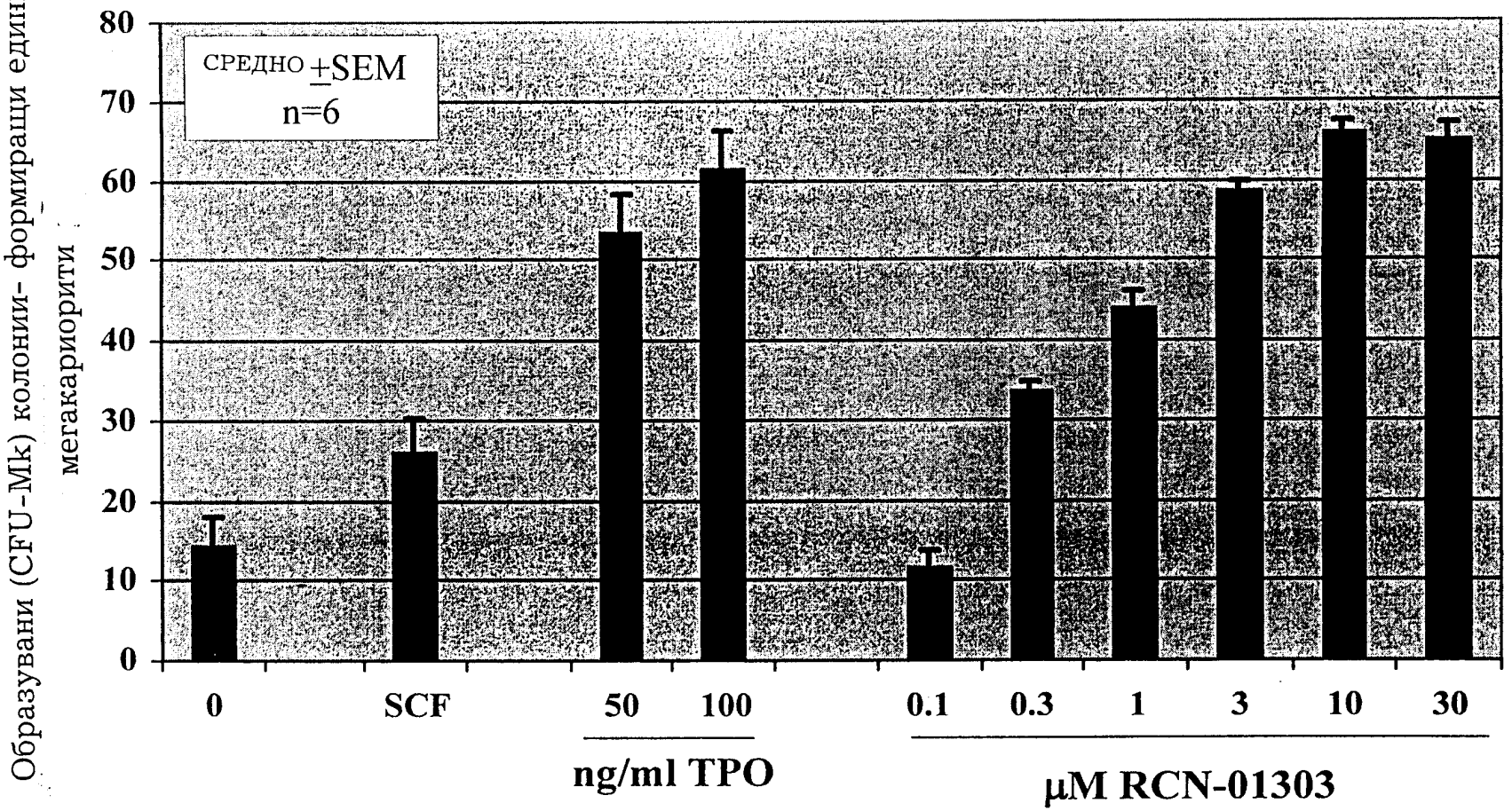
Пептид	Приблизителна EC_{50} стойност
wild type	80 nM
A1-L18	90 nM
A1-L18 (R9A, R11A)	**10 nM**
G4-L18	70 nM
G4-L18 (R9A, R11A)	90 nM
G4-R21	80 nM
G4-R21 (R9A, R11A)	80 nM
Y14F	100 nM

- Измервания на STATS фосфорилиране

Таблица X

ФИГУРА А

RCN-01303 ФОРМИРАНЕ НА ПОВЪРХНОСТНА МЕГАКАРИОЦИТНА КОЛОНИЯ В КОСТЕН МОЗЪК НА МИШКА



ФИГУРА В

RCN-01303 ПОВЪРХНОСТНА ГРАНУЛОПОЕЗА В КОСТЕН МОЗЪК НА МИШКА

