

(11) Número de Publicação: **PT 1064951 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 47/48 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2000.06.28	(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG. 4070 BASEL CH
(30) Prioridade(s): 1999.07.02 US 142254 1999.08.23 US 150225 1999.08.31 US 151548 1999.11.17 US 166151	(72) Inventor(es): PASCAL SEBASTIAN BAILON US
(43) Data de publicação do pedido: 2001.01.03	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.08.22 076/2007	

(54) Epígrafe: **DERIVADOS DE ERITROPOIETINA**

(57) Resumo:

RESUMO

DERIVADOS DE ERITROPOIETINA

Os derivados de eritropoietina são preparados por conjugação da eritropoietina com etileno-glicol, que compreendem uma glicoproteína de eritropoietina com pelo menos um grupo amino livre e tendo a atividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de eritrocitos e de eritropoietina e que se selecionem no grupo que consiste em eritropoietina humana e os seus análogos que têm a sequência da eritropoietina modificada pela adição de 1 a 6 sítios de glicosilação ou um rearranjo de pelo menos um sítio de glicosilação; estando a referida glicoproteína ligada por uma ligação covalente a "n" grupos de poli(etileno-glicol) de fórmula geral $-CO-(CH_2)_m-(OCH_2CH_2)_n-OH$ com o grupo carbonilo de cada grupo poli(etileno-glicol) formando uma ligação de a com um dos referidos grupos amino; em que o símbolo R representa um grupo alquilo inferior; o símbolo x representa 1 ou 3; o símbolo m representa entre cerca de 450 e cerca de 900; o símbolo n representa de 1 a 3; e n e m escolhem-se de tal modo que o peso molecular do conjugado menos o da glicoproteína de eritropoietina esteja entre 20 kilodaltons e 100 kilodaltons.

DESCRIÇÃO

DERIVADOS DE ERITROPOIETINA

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A eritropoiese é a produção de eritrócitos que ocorre para compensar a destruição das células. A eritropoiese é um mecanismo fisiológico controlado que permite que estejam disponíveis eritrócitos suficientes para uma oxigenação apropriada dos tecidos. A eritropoietina humana (EPOh) de ocorrência natural é produzida no rim e é o factor do plasma humoral que estimula a produção de eritrócitos (Carnot, P. e Deflandre, C. (1906) C. R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, A. J. (1953) Blood 8: 349; Reissmann, K. R. (1958) Blood 5: 372; Jacobson, L. O., Goldwasser, E. Freid, W. e Plzak, L. F. (1957) Nature 179: 6331-4). A EPO de ocorrência natural estimula a divisão e a diferenciação de geradores de eritrócitos comprometidos na medula óssea e exerce a sua actividade biológica por meio da ligação a receptores nos precursores de eritrócitos (Krantz, B. S. (1991) Blood 77:419).

A eritropoietina tem sido fabricada por biossíntese utilizando a tecnologia do ADN recombinante (Egrie, J. C., Strickland, J. W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) e é o produto de um gene de EPO humano clonado inserido e expresso em células de tecido de ovário de hamster chinês (células O₂). A estrutura primária de EPOh totalmente processada, predominantemente da EPOh está ilustrada na SEQ ID NO: 1. Há duas pontes de di-sulfureto entre Cys¹²-Cys¹³² e Cys²⁶-Cys³⁵. O peso molecular da cadeia de polipeptídeo de EPO sem as partes de açúcar é de 34.236 Da. Na molécula de EPO intacta, aproximadamente 40 % do

pele molecular é atribuível aos grupos de hidrato de carbono que glicosilam a proteína nos sítios de glicosilação da proteína (Sasaki, H., Bothner, S., Dell, A. & Fukuda, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12059).

Como a eritropoietina é essencial na formação dos eritrócitos do sangue, a hormona é usada no tratamento de distúrbios sanguíneos caracterizados por um baixo teor de eritrócitos ou por uma produção deficiente de eritrócitos. Clinicamente, utiliza-se a EPO no tratamento da anemia em pacientes com insuficiência renal crônica. (Eschbach, J. W., Egri, J. C., Downing, M. R. et al. (1987) *NEJM* 316: 73-78; Eschbach, J. W., Abdulhadi, H., Browne, J. K. et al. (1988) *Ann. Intern. Med.* 111: 992; Egrie, J. C., Eschbach, J. W., McGuire, T, Adamson, . . . (1988) *Kidney Intl.* 33: 262; Lim, V. S., Degowin, R. L., Zavala, D. et al. (1989) *Ann. Intern. Med.* 110: 108-114) e na SIDA e em pacientes com cancro que são tratados com quimioterapia (Danna, R. P., Rudnick, S. A., Abels, R. I. em: M. B., Garnick, ed. *Eritropoietina in Clinical Applications - An International Perspective*. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: p. 301-324). Contudo, a biodisponibilidade de produtos terapêuticos de proteínas existentes no mercado, tal como a EPO, está limitada pelo seu curto semi-período de vida no plasma e pela susceptibilidade à degradação das proteases. Estes inconvenientes obrigam a que atinjam a potência clínica máxima.

A patente de invenção WO 89/11781 descreve polipeptídeos que têm parte ou toda a conformação estrutural primária e as propriedades biológicas da eritropoietina e têm um maior semi-período de vida e uma maior actividade biológica in vivo devido a um perfil de glicosilação modificado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto um conjugado de eritropoietina, compreendendo a referida conjugação uma glicoproteína de eritropoietina com pelo menos um grupo aminoácido livre e com a actividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de eritrócitos, seleccionada no grupo que consiste em eritropoietina humana e os seus análogos que têm a sequência da eritropoietina humana modificada pela adição de 1 a 5 sítios de glicosilação ou um rearranjo de pelo menos um sítio de glicosilação; a referida glicoproteína estará ligada por uma ligação covalente a "n" grupos de poli(etileno-glicol) com a fórmula geral $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_x\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_m\text{-OR}$ com o grupo -CO (i.e. carbonilo) de cada grupo poli(etileno-glicol) formando uma ligação de amida com um dos referidos grupos amino; em que o símbolo R representa um grupo alquilo inferior; o símbolo x representa 2 ou 3; o símbolo m representa entre cerca de 450 até cerca de 900; o símbolo n representa de 1 a 3; e n e m escolhem-se de tal modo que o peso molecular do conjugado, menos a glicoproteína de eritropoietina esteja entre 20 kilodaltons e 100 kilodaltons. A presente invenção tem ainda por objecto composições que contêm conjugados aqui descritos em que a percentagem de conjugados na composição em que n representa 1 é pelo menos de noventa por cento.

Comparado com a EPO não modificada (isto é, EPO sem um $\sim\text{r}$ glicosilada) e com $\sim\text{r}$ conjugados convencionais $\sim\text{PEG-EPO}$, os conjugados $\sim\text{PEG-EPO}$ têm um tempo de vida em circulação e um tempo de permanência no plasma aumentados, uma menor toxicidade e uma actividade clínica *in vivo* aumentada. Os conjugados da presente invenção têm as mesmas

utilizações que a EPO. Em particular, os conjugados da presente invenção são úteis para tratar pacientes por meio da estimulação da divisão e diferenciação de progenitores de eritrócitos comprometidos na medula óssea da mesma maneira que a EPO é utilizada para tratar pacientes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto conjugados, compreendendo os referidos conjugados uma glicoproteína de eritropoietina com pelo menos um grupo aminoácido livre e com a actividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de eritrócitos, seleccionada no grupo que consiste em eritropoietina humana e eritropoietina humana modificada pela adição de 1 a 6 sítios de glicosilação ou um rearranjo de pelo menos um sítio de glicosilação; sendo que a referida glicoproteína estará ligada por uma ligação covalente a "n" grupos de poli(etileno-glicol) com a fórmula geral $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-CR$ com o grupo $-CO$ (i.e. carbonilo) de cada grupo poli(etileno-glicol) formando uma ligação de amida com um dos referidos grupos amino; em que o símbolo R representa um grupo alquilo C_1-C_6 ; o símbolo x representa 2 ou 3; o símbolo m representa entre cerca de 450 até cerca de 900; e o símbolo n representa de 1 a 3; e n e m escolhem-se de tal modo que o peso molecular do conjugado, menos a glicoproteína de eritropoietina esteja entre 20 kilodaltons e 100 kilodaltons.

Verificou-se que os conjugados da presente invenção podem ser utilizados da mesma maneira que a EPO não modificada. Contudo, os conjugados da presente invenção têm um semi-período de vida em circulação e um tempo de

de menor clearance, uma menor clearance e uma actividade biológica *in vivo*. Em virtude dessas propriedades farmacológicas, os conjugados da presente invenção podem ser administrados aos pacientes em doses de 2-3 vezes por semana como com a EPO não modificada. É expectável que a diminuição da frequência de administração resulte numa melhoria da adaptação ao paciente que leve a melhores resultados do tratamento, assim como a uma melhoria da qualidade de vida do paciente. Comparados com os conjugados convencionais de EPO ligados a polietilenglicol, verificou-se que os conjugados que têm a peso molecular e a estrutura de ligação dos conjugados da presente invenção têm um perfil de potência aumentada, uma estabilidade acrescida, AUC, semi-período de vida em circulação aumentados e um perfil de custo - benefício positivo.

Os conjugados de acordo com a presente invenção podem ser administrados aos pacientes numa quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico da mesma maneira que se administra a EPO. A quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico é a quantidade de conjugado necessária para que a actividade biológica *in vivo* cause um aumento de produção de reticulócitos e de eritrócitos na medula óssea. A quantidade exacta de conjugado é uma questão de preferência sujeita a alguns factores como o tipo exacto de condição a ser tratada; a condição do doente a ser tratado, assim como os outros ingredientes na composição. Por exemplo, pode administrar-se 0,1 a 1 µg por kg de peso do corpo, por exemplo, uma vez por semana.

As composições farmacêuticas que contêm o conjugado podem ser formuladas numa concentração efectiva para administração por vários meios a um paciente humano que

tenha distúrbios sanguíneos caracterizados por uma produção de eritrócitos baixa ou deficiente.

Os produtos de glicoproteína de eritropoietina preparados de acordo com a presente invenção podem ser preparados em composições farmacêuticas apropriadas para injeção com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, por processos conhecidos na técnica. Por exemplo, foram descritas composições apropriadas nas patentes de invenção WO97103996, WO97/40850, WO98/31660 e WO99/07401. Entre os veículos aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, para a formulação dos produtos da presente invenção, estão albumina de soro humano, proteínas do plasma humano, etc. Os compostos da presente invenção podem ser formulados no seio do tampão de sódio/potássio e fosfato 10 mM, a pH 7 contendo um agente de tonicidade, por exemplo cloreto de sódio 132 mM. Eventualmente a composição farmacêutica pode conter um conservante. A composição farmacêutica pode conter diferentes quantidades de eritropoietina, por exemplo 10 - 1000 µg/ml, e.g. 50 µg ou 400 µg.

O termo "eritropoietina" ou "EPO" refere-se a uma glicoproteína, comportando a sequência de aminoácidos estabelecida na (SEQ ID NO: 1) ou na (SEQ ID NO: 2) ou numa sequência de aminoácidos praticamente homóloga, cujas propriedades biológicas estão relacionadas com a estimulação da produção de eritrócitos da divisão e a diferenciação de geradores de eritrócitos comprometidos na medula óssea. Tal como se utiliza aqui, estes termos incluem essas proteínas deliberadamente modificadas, por exemplo, por mutagenese dirigida ao sítio ou acidentalmente através de mutações. Estes termos também incluem análogos com mais 1 a 6 sítios para glicosilação, análogos que têm

pele menos um aminoácido adicional na extremidade do terminal carbônico da polipeptídica, em que o aminoácido adicional inclui pelo menos um sítio de glicosilação e análogos com uma sequência de aminoácidos que inclui um resíduo de pelo menos um sítio para glicosilação. Estes termos incluem tanto eritropoietina humana natural como produzida de forma recombinante.

Os conjugados de eritropoietina da presente invenção podem ser representados pela fórmula geral I:



em que os símbolos x, m, n e R têm os significados anteriores. Na fórmula geral I, o símbolo F representa um resíduo de uma glicoproteína de eritropoietina aqui descrita (isto é, sem o grupo amino ou os grupos amino que formam uma ligação amida com o carbonilo mostrado na fórmula geral I), com a atividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de eritrócitos.

Num enquadramento preferido da presente invenção o símbolo F representa um grupo metilo. Preferencialmente, o símbolo m representa desde cerca de 630 até cerca de 750 e o símbolo n representa preferencialmente 1.

No enquadramento mais preferido da presente invenção o símbolo F representa um grupo metilo, o símbolo m representa desde cerca de 630 até cerca de 750 e o símbolo n representa 1, isto é, o conjugado, tal como se definiu antes, com a fórmula geral



em que o símbolo m representa desde cerca de 600 até cerca de 700 e o símbolo o representa l e F tem o significado definido antes. Preferencialmente, o símbolo m tem um valor exato de cerca de 600.

Preferencialmente, a glicoproteína dos conjugados, tal como se definiu antes, é uma eritropoietina humana. A eritropoietina humana e as proteínas análogas, como se definiu antes, podem ser expressas por activação endógena dos genes. As glicoproteínas da eritropoietina humana preferidas são as das SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, sendo a mais preferencial a da SEQ ID NO: 1.

Além disso, o símbolo F pode ser seleccionado no grupo que consiste em resíduos de eritropoietina humana e os seus análogos com mais 1 a 6 sítios para a glicosilação. Tal como se estabelece em detalhe a seguir, a preparação e a purificação de EPO são bem conhecidas na técnica. Por EPO entende-se a proteína natural ou recombinante, preferencialmente humana, tal como se pode obter de uma fonte convencional tal como tecido, síntese de proteínas, culturas de células com células naturais ou recombinantes. Qualquer proteína com a actividade da EPO, tal como as mutações ou de alguma forma as proteínas modificadas, estão englobadas. A EPO recombinante pode ser preparada por via da expressão em linhas de células de CHO-, BHK- ou MELA, pela tecnologia do ADN recombinante ou por activação endógena de genes. A expressão das proteínas, incluindo a EPO, por activação endógena de genes é conhecida na técnica e esta descreve, por exemplo, nas patentes de invenção norte-americanas U.S. Nos. 5.733.741, 5.641.670, e 5.733.746, e na publicação das patentes de invenção internacionais N.º 81/00000 WO 84/00000 WO 88/00000, WO 90/00000, WO 91/00000 e WO 91/00000. As espécies

preferidas de EPO para a preparação de produtos de glicoproteína de eritropoietina são as espécies humanas de EPO. Mais preferencialmente, as espécies de EPO são as espécies de EPO humana com a sequência de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, sendo a mais preferível a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

Num enquadramento, o símbolo P pode ser o resíduo de um resíduo de glicoproteína comportando de 1 a 6 sítios para glicosilação adicionais. A glicosilação de uma proteína, com um ou mais grupos de oligossacáridos, ocorre em localizações específicas ao longo da estrutura de um polipéptido e afecta enormemente as propriedades físicas da proteína, tal como a estabilidade da proteína, a secreção, a localização sub-celular e a actividade biológica. A glicosilação é normalmente de dois tipos. Os oligossacáridos ligados a O- estão ligados a resíduos de serina ou de treonina e os oligossacáridos ligados a N- estão ligados a resíduos de asparagina. Um tipo de oligossacárido encontrado tanto nos oligossacáridos ligados a O- como nos oligossacáridos ligados a N- é o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que é uma família de amino-açúcares contendo 9 ou mais átomos de carbono. O ácido siálico é normalmente o resíduo terminal tanto nos oligossacáridos ligados a O- como nos oligossacáridos ligados a N- e, porque comporta uma carga negativa, confere propriedades ácidas à glicoproteína. A eritropoietina humana comportando 185 aminoácidos, contém três cadeias de oligossacáridos ligados a O- e ligados a N- que compreende cerca de 40 % do peso molecular total da glicoproteína. A glicosilação ligada a N- ocorre nos resíduos de asparagina localizados nas posições 24, 38, e 63 e a glicosilação ligada a O- ocorre no resíduo de serina localizado na posição 126. As cadeias de oligossacárido são modificadas com os resíduos

... de ácido siálico. A eliminação estrutural de todos os resíduos de ácido siálico da eritropoietina glicosilada resulta na perda de atividade *in vivo* mas não na atividade *in vitro* cerca de 10 vezes da eritropoietina glicosilada. A ligação C-5 glicosilação produzida, por meio da proteína de ligação N-glycosylase .

As glicoproteínas da presente invenção incluem análogos de eritropoietina humana com uma ou mais alterações na sequência de aminoácidos da eritropoietina humana e que resulta em aumento do número de sítios para a ligação do ácido siálico. Estes análogos de glicoproteína podem ser gerados por mutagênese dirigida ao sítio com adições, eliminações ou substituições de resíduos de aminoácidos que aumentam ou alteram os sítios que estão disponíveis para a glicosilação. Os análogos de glicoproteína com níveis de ácido siálico maiores do que os encontrados na eritropoietina humana são gerados por adição de sítios de glicosilação que não perturbam a conformação secundária ou terciária requerida para a atividade biológica. As glicoproteínas da presente invenção também incluem análogos com níveis aumentados de ligação de hidratos de carbono num sítio de glicosilação que normalmente envolve a substituição de um ou mais aminoácidos em grande proximidade com um sítio ligado a N- ou ligado a O-. As glicoproteínas da presente invenção também incluem análogos com um ou mais aminoácidos que se estendem desde a extremidade da terminação de carboxi da eritropoietina e que providenciam pelo menos um sítio adicional de hidrato de carbono. As glicoproteínas da presente invenção também incluem análogos com uma sequência de aminoácidos que tem um rearranjo de pelo menos um sítio para a glicosilação. Esse rearranjo de sítio de glicosilação envolve a eliminação de um ou mais sítios de glicosilação

na eritropoietina humana e a adição de um ou mais sítios de glicosilação de ocorrência não natural. Aumentando o número de cadeias de hidratos de carbono da eritropoietina e assim o número de ácidos sílicos por moléculas de eritropoietina podem conferir propriedades vantajosas tais como maior solubilidade, maior resistência à proteólise, imunogenecidade reduzida, semi-vida de vida no plasma aumentada e actividade biológica aumentada. Os análogos de eritropoietina com sítios de glicosilação adicionais estão descritos com mais detalhes no pedido de patente de invenção europeia 640 819, para Elliot publicado em 1 de Março de 1990.

Num enquadramento preferido, as glicoproteínas da presente invenção compreendem uma sequência de aminoácidos que inclui pelo menos um sítio adicional para a glicosilação tal como, mas não se limitando a eritropoietinas que compreendem a sequência da eritropoietina humana modificada por uma modificação seleccionada nas seguintes:

- Asn⁵⁴Trp⁵²;
- Asn⁵¹Trp⁵³
- Asn⁵¹Trp⁵⁰;
- Asn⁶⁸;
- Asn⁶⁹Trp⁷¹;
- Ser⁶⁸Asn⁶⁸Trp⁷¹;
- Val⁶⁷Asn⁶⁸Trp⁶⁸;
- Ser⁶⁷Asn⁷⁰Trp⁶⁹;
- Ser⁶¹Asn⁶⁸Gln⁶⁸Trp⁶⁸;
- Ser⁶¹Asn⁶⁸Trp⁶⁸Trp⁶⁸;
- Val⁶⁷Asn⁶⁸Trp⁶⁸Lys⁶⁷;
- Asn⁶⁸Trp⁷¹Ser⁶⁷Asn⁶⁸Trp⁶⁸;
- Asn⁶⁰Trp⁶¹Val⁶⁷Asn⁶⁸Trp⁶⁸;
- Asn⁶⁸Ile⁶⁸Trp⁶¹;

Ser¹Asn²³Ile²⁶Tra³¹;
 Asn¹²⁴Tre¹²⁵;
 Asn¹²⁷Tre¹²⁸;
 Tre¹³¹; e
 Pro¹³³Tre¹³⁵.

A nomenclatura utilizada aqui para a modificação da sequência de aminoácidos significa que as posições da proteína não modificada correspondente (por exemplo, EPOh da SEQ ID NO: 1 ou da SEQ ID NO: 2) indicadas pelo número em potência são alteradas com os aminoácidos que precedem imediatamente os respectivos números em potência.

A glicoproteína pode também ser um análogo com pelo menos um aminoácido adicional na extremidade do terminal carboxi da glicoproteína, em que o aminoácido adicional inclui pelo menos um sítio de glicosilação, isto é, o conjugado conforme definido antes também se refere a um composto em que a glicoproteína tem uma sequência que compreende a sequência da eritropoietina humana e uma segunda sequência na terminação carboxi da sequência da eritropoietina humana, em que a segunda sequência contém pelo menos um sítio de glicosilação. O aminoácido adicional pode compreender um fragmento de péptido derivado da extremidade da terminação carboxi da gonadotropina coriônica humana. Preferencialmente, a glicoproteína é um análogo seleccionado no grupo que consiste numa (a) eritropoietina humana com a sequência de aminoácidos Ser Ser Ser His Ala Pro Phe Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Glu Pro Ser Asp Tre Pro Ile Leu Pro Glu (SEQ ID NO: 3), estendendo-se desde a terminação carboxi; (b) o análogo compreende ainda Ser¹⁷ Asn²³ Tre²⁵ EPO; e

(2) e análogo em se compreendendo ainda Asp¹³, Thr¹⁴, Val¹⁵, Asp¹⁶, Thr¹⁷ EPO.

A glicoproteína EPOE também ser um análogo com uma sequência de aminoácidos que inclui um resíduo de glicose por um sítio para a glicosilação. A sequência pode compreender a eliminação de quaisquer um dos aminoácidos de hidratos de carbono ligados a N- na eritropoietina humana e mais um ou mais de hidratos de carbono. A sequência de aminoácidos da eritropoietina humana. Preferencialmente, a glicoproteína é um análogo selecionado no grupo que consiste em Glu²⁴, Ser²⁵, Asp²⁶, Thr²⁷, EPO; Glu²⁸, Ser²⁹, Asp³⁰, Thr³¹, EPO; e Glu³², Ser³³, Asp³⁴, Thr³⁵, EPO.

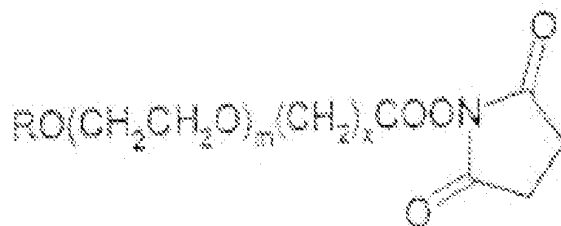
Tal como se utiliza aqui, "alquilo inferior" significa um grupo alquilo de cadeia linear ou ramificada comportando de um a seis átomos de carbono. Exemplos de grupos alquilo inferior incluem grupos metilo, etilo e isopropilo. De acordo com a presente invenção, o símbolo R representa qualquer grupo alquilo inferior. Os conjugados em que o símbolo R representa um grupo metilo são os preferidos.

O símbolo "m" representa o número de resíduos de ácido de etileno (EPO) no grupo de poli(óxido de etileno). Uma única sub-unidade de EPO é o ácido de etileno com um peso molecular de cerca de 44 daltons. Assim, o peso molecular do conjugado (excluindo o peso molecular da EPO) depende do número "m". Nos conjugados da presente invenção, o símbolo "m" está entre cerca de 450 e 2200 de 100 repetições e um peso molecular de cerca de 20 kDa a cerca de 100 kDa, preferencialmente de cerca de 50 a cerca de 100 correspondendo a um peso molecular de cerca de 20 kDa. O número m selecionado é de tal modo que o conjugado

de presente invenção resultante tenha uma atividade fisiológica comparável a uma EPO não modificada, cuja atividade pode representar a mesma, mais ou uma fração da atividade correspondente da EPO não modificada. Um peso molecular de "cerca" de um certo número significa que está dentro de um intervalo razoável desse número, conforme determinado por técnicas convencionais de análise. O número "n" seleciona-se de tal modo que o peso molecular de cada grupo de polietileno-glicol ligado covalentemente à glicoproteína da eritropoietina está entre cerca de 20 kDa e cerca de 40 kDa e é preferencialmente de cerca de 30 kDa.

Nos conjugados de presente invenção, o número "n" é o número de grupos de polietileno-glicol ligados covalentemente a grupos amino livres (incluindo os grupos ϵ -amino de um aminoácido de lisina e/ou um grupo amino do terminal amino) de uma proteína de eritropoietina por via das ligações amida. Um conjugado de presente invenção pode ter um, dois ou três grupos PEG por molécula de EPO. "n" é um número inteiro variando de 1 a 3, preferencialmente "n" representa 1 ou 2 e, mais preferencialmente "n" representa 1.

O composto de fórmula geral I pode ser preparado a partir de material polimérico conhecido:



em que os símbolos R e m têm o significado descrito antes, por meio da condensação do composto de fórmula geral II com a glicoproteína da eritropoietina. Os compostos de fórmula geral II em que o símbolo X representa I são alfa-álcool inferior, ésteres de succinimídio de ácido butírico de polietileno-glicol (álcool inferior - BEC - SBA). Os compostos de fórmula geral II em que o símbolo X representa II são alfa-álcool inferior, ésteres de succinimídio de ácido propiônico de polietileno-glicol (álcool inferior - BEC - SBA). Qualquer processo convencional de reação de um éster ativado com uma amina para formar uma amida pode ser utilizado. Na reação descrita antes, o éster de succinimídio exemplificado é um grupo eliminável que causa a formação de amidas. A utilização dos ésteres succinimídio tal como os compostos e fórmula geral I para produzir conjugados com proteínas é descrita na patente de invenção norte-americana U.S. 2.572.662 publicada em 10 de Setembro de 1952 (Harris, et al.).

A EPO humana contém nove grupos amino livres, o grupo amino do terminal amino mais os grupos α -amino de 8 resíduos de lisina. Quando se combina o reagente de tratamento do polietileno-glicol com um composto de SBA de fórmula geral II, verificou-se que, a pH 7,5, com uma relação de proteína: BEC de 1:3 e a uma temperatura de reação de 20-25 °C, produz-se uma mistura de mono-, di- e quantidades em traços de espécies com três polietileno-glicóis. Quando o reagente de tratamento do polietileno-glicol foi um composto de SBA de fórmula geral II, em condições semelhantes excepto no facto de a relação de proteína: BEC ser de 1:1, produziram-se essencialmente espécies só com uma unidade de polietileno-glicol. A EPO humana pode ser purificada por uma mistura de como espécies com polietileno-glicóis diferentes.

separadas por cromatografia de permuta de ânions. Manipulando as condições de reação (por exemplo, a relação molar dos reagentes, o pH, a temperatura, a concentração da proteína, o tempo de reação, etc.), as quantidades relativas das diferentes espécies com polietileno-glicol podem ser variadas.

A eritropoietina humana (EPO) é uma glicoproteína que atua na formação de eritrócitos. A preparação e aplicação terapêutica estão descritas em, por exemplo, nas patentes de invenção norte-americanas 3.3. Nov. 5.547.933 e 5.162.101, patentes de invenção europeias EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 e EP-B 0 411 578 assim como Lai, P.H. et al, J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, em Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. A eritropoietina para utilizações terapêuticas pode ser produzida por meios recombinantes (patentes de invenção europeias EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 e Egrie, J.P., Strickland, T. W., Lane, J. et al. (1985) Immunobiol. 72: 213-224).

Os processos para a expressão e a preparação da eritropoietina em meio isento de soro estão descritos, por exemplo, na patente de invenção WO 96135718, para Bore publicada em 14 de Novembro de 1996, e na publicação de patente de invenção europeia no. 513 738, para Koch publicada em 12 de Junho de 1992. Para além das publicações mencionadas antes, sabe-se que se pode realizar uma expressão isenta de soro das células recombinantes de CHO contêm um gene de EPO. Esses processos estão descritos, por exemplo, nas patentes de invenção europeias EP-B 0 513 738, EP-B 0 267 575 e de uma forma geral por, por exemplo, Sasaki et al., Analytical Biochem. 130 1983 443-453, EP-A 0 245

656. Kowar, T. & Franke, T., *Methode des Immunoblot* 421 (1982) 277-282. Barisken, E., *Immunoblot* 371 (1981) 45-51. EP-A 0 461 711, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, patente de invenção: NO 33 00967.

Na presente invenção descreve-se EP-A 0 267 576 descrever-se uma cromatografia de permuta iónica em S-Sepharose, a CIER preparativa da fase inversa numa coluna C8 e uma cromatografia de filtração em gel para a purificação da EPO produzida numa isenta de soro após diálise. Em relação com isto, a etapa 33 cromatografia de filtração em gel pode ser substituída por cromatografia de permuta iónica em S-Sepharose de fluxo rápido. Também se propõe a utilização de uma cromatografia com corante numa coluna de Triacrilato Azul, antes da cromatografia de permuta iónica.

Um processo para a purificação da EPO recombinante está descrito por Nobuo, T. et al., *J. Biochem.* 107 (1990) 352-359. Neste processo trata-se a EPO contida com uma solução de Tween® 20, fluoreto de fenilmetilsulfonilo, etilmalimida, pepstatina A, sulfato de cobre e ácido oxálico antes das etapas de purificação. Há publicações, incluindo a patente de invenção NO 96/35718, para surg publicada em 14 de Novembro de 1996, que descrevem um processo para a preparação de eritropoietina num processo para a preparação de eritropoietina num processo de fermentação isento de soro (EPOis).

A actividade específica da EPO ou dos conjugados de EPO de acordo com a presente invenção pode ser determinada por vários ensaios conhecidos na técnica. A actividade biológica das proteínas de EPO purificadas é tal que a administração da proteína de EPO por injeção a pacientes

humanos resulta num aumento da produção dos reticulócitos e dos eritrócitos na medula óssea, comparada com os grupos de indivíduos não injectados ou com os indivíduos do grupo de controlo. A actividade biológica das proteínas de EPO ou dos seus fragmentos, obtidas e purificadas de acordo com a presente invenção pode ser ensaiada por processos de acordo com Ansable, et al., Bull. Wild. Health. Org. (1972) 47: 99-112 e Pharm. Europe Spec. Issues Erythropoietin SEP Bio 1997(2). Um outro ensaio biológico para a determinação da actividade da proteína de EPO, o ensaio do rato ferrociténico, está descrito no exemplo 4.

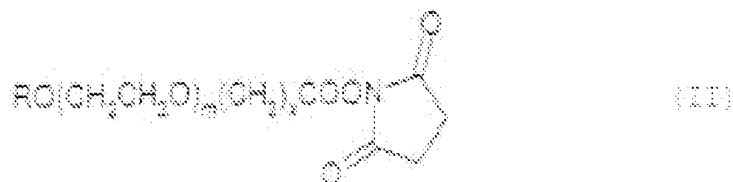
A presente invenção tem por objecto uma composição constituída por conjugados tal como se descreveu antes. Pode-se preparar uma composição contendo pelo menos noventa por cento de conjugados de mono-PEG, isto é, em que o símbolo n representa 1, como se mostra no exemplo 5. Normalmente os conjugados de mono-PEG de 2s glicoproteínas de eritropoietina são desejáveis porque tendem a ter uma actividade maior do que a dos conjugados de di-PEG. A percentagem de conjugados de mono-PEG assim como a relação entre espécies mono- e di-PEG pode ser controlada juntando as fracções maiores à volta do pico de eluição para diminuir a percentagem de mono-PEG ou fracções mais estreitas para aumentar a percentagem de mono-PEG na composição. Cerca de noventa por cento dos conjugados de mono-PEG estão num bom equilíbrio entre rendimento e actividade. Algumas vezes, podem ser desejáveis composições em que, por exemplo, pelo menos noventa e dois por cento ou pelo menos noventa e seis por cento dos conjugados são espécies mono-PEG igual a 1. O enquadramento da presente invenção a percentagem de conjugados em que n representa 1 é de noventa por cento a noventa e seis por cento.

a presente invenção tem por objecto um processo para a preparação de compostos de fórmula geral III, caracterizados pelo conjugado de uma composição conforme descrito antes e um excipiente aceitável, em o caso de vista regulamentada.

As conjugações e as composições da presente invenção são especialmente úteis para a preparação de medicamentos para o tratamento ou a profilaxia de doenças correlacionadas com anemia em pacientes com insuficiência renal crónica (IRC), SIDA e para o tratamento de pacientes com cancro que se submetem a quimioterapia.

Um outro enquadramento da presente invenção refere-se a um processo para o tratamento profilático e/ou terapêutico de distúrbios que envolvem anemia em pacientes com insuficiência renal crónica (IRC), SIDA e para o tratamento de pacientes com cancro que se submetem a quimioterapia, compreendendo a etapa de administração aos pacientes de uma composição conforme descrito antes.

Além disso, a presente invenção tem por objecto um processo para a preparação de compostos conforme descrito antes, processo esse que compreende a condensação do composto de fórmula geral III



com uma glicoproteína de E. coli ou de outro organismo e em que os símbolos R, n e m têm os significados definidos antes.

hidrocortisona, sulfato de ferro (II), asparagina, ácido aspartico, serina e um estabilizador para as células de mamífero tais como, por exemplo, álcool de polivinílico, metil-celulose, polidex-trans, polietileno-glicol, Fluoracil F89, poligelina dilataadora de plasma (HEMACULON) ou polivinil-pirrolidona (patente de invenção NO 86/35713).

As culturas são verificadas ao microscópio quando é ausente de microrganismos de contaminação e determinam-se as densidades das células. Estes ensaios realizam-se em cada etapa de divisão.

Depois do período de crescimento inicial, dilui-se 1 cultura de células com meio fresco até a densidade inicial das células e a cultura passa por um novo ciclo de crescimento. Este processo repete-se até se obter um volume de cultura de aproximadamente 2 L por frasco de várias tubuladuras (spinner flasks) de vidro. Depois de aproximadamente 12 duplicações está disponível 1 a 5 litros desta cultura que é depois utilizada como inóculo para o fermentador de inóculos de 10 L.

Passados 3 - 5 dias, pode-se utilizar a cultura que está no fermentador de inóculos de 10 L como inóculo para o fermentador de inóculos de 100 L.

Passados mais 3 - 5 dias de cultura, pode-se utilizar a cultura que está no fermentador de inóculos de 100 L como inóculo para o fermentador de produção de 1000 L.

b) Colheita e separação das células

Utiliza-se um processo semelhante com íons, para a separação das células. Utiliza-se uma solução de 3 unidades de CaCl_2 em uma solução, com-se-

aproximadamente 90 % da cultura. A cultura remanescente é reabastecida com mais de cultura fresco e faz-se a cultura até a próxima colheita. Um ciclo de produção consiste num máximo de 10 colheitas consecutivas: 9 colheitas parciais e 1 colheita completa no fim da fermentação. A colheita tem lugar de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias.

O volume de colheita determinado é transferido para um recipiente arrefecido. As células são retiradas por centrifugação ou por filtração e são descartadas. O sobrenadante contendo a EPO da etapa de centrifugação é filtrado em linha e recolhido num segundo recipiente arrefecido. Cada colheita é tratada separadamente durante a purificação.

Um processo típico para a purificação da proteína da EPO está descrito na patente de invenção WO 9613571B, para Berg publicada em 14 de Novembro de 1996. O processo de purificação explica-se como se segue.

a) Cromatografia em azul de safarose

O azul de safarose (Pharmacia) consiste em pércias de safarose a cuja superfície de liga, de forma covalente, o corante de azul de Cibacton. Dado que a EPO se liga mais fortemente ao azul de safarose do que a maior parte dos contaminantes não proteínicos, algumas impurezas de proteínicas e PVA. A EPO pode ser enriquecida nesta etapa. A eluição da coluna de azul de safarose realiza-se aumentando a concentração de sal assim como o pH.

Enche-se a coluna com 80 - 100 L de azul de safarose; regenera-se com NaOH e equilibra-se com tampão de equilíbrio (cloreto de sódio/cálcio e acetato de sódio).

Lavagem-se o supernatante do fermentador por filtração e
destilação. Destila-se para obter como produto principal a C₁₂ - em
ordem de um tempo, sendo então se faz uma solução de equilíbrio
contendo uma percentagem não elevada de álcool, de modo
a ser utilizada com um tampão à base de Tris. Faz-se a eluição
do produto com um tampão à base de Tris e recolhe-se numa
única fracção de acordo com o perfil principal de eluição.

b) Cromatografia com pérolas Toyo de butilo

As pérolas Toyo de butilo 850 C (Toyo Haas) têm uma
matriz à base de poliestireno à qual estão acoplados de
forma covalente resíduos de butilo alifático. Dado que a
EPO se liga mais fortemente a este gel do que a maior parte
das impurezas e FVA, tem que ser eluído com um tampão
contendo isopropanol.

A coluna é cheia com 30 - 40 L de pérolas Toyo de
butilo 850 C, regeneradas com NaOH, lavadas com um tampão à
base de Tris e equilibrada com um tampão à base de Tris
contendo isopropanol.

O produto é eluído da coluna de azul de sefaroze é
ajustado para uma concentração de isopropanol no tampão de
equilíbrio da coluna e carregado na coluna. Depois lava-se
a coluna com tampão de equilíbrio com concentrações
crescentes de isopropanol. O produto é então eluído com
tampão de eluição (tampão à base de Tris com um elevado
teor de isopropanol) e recolhe-se numa única fracção de
acordo com o perfil de eluição principal.

c) Cromatografia em ultra-gel de Hidroxapatite

O ultra-gel de hidroxiapatite (Bioagora) consiste em hidroxiapatite que é incorporada numa matriz de agarose para melhorar as propriedades mecânicas. A EPO tem uma baixa afinidade com a hidroxiapatite e pode por isso ser eluída a concentrações mais baixas de fosfato do que as impurezas de proteínas.

Enche-se a coluna com 30 - 40 L de ultra-gel de hidroxiapatite e regenera-se com um tampão de acetato de potássio/cloreto de cálcio e MOPS regulado para um tampão a base de Tris. Depois é utilizada também à base de Tris contendo uma pequena quantidade de isopropanol e de cloreto de sódio.

Carrega-se na coluna o produto eluído da cromatografia com pérolas Toyo de butilo, contendo EPO. Em seguida, lava-se a coluna com tampão de equilíbrio e um tampão à base de Tris sem isopropanol nem cloreto de sódio. O produto é eluído com um tampão à base de Tris contendo uma concentração baixa de fosfato de potássio e recolheu-se numa única fracção de acordo com o perfil de eluição principal.

d) CLSR de fase inversa em Vydac C4

O material de Vydac C4 (Vydac) na configuração consiste em partículas de gel de sílica, cujas superfícies comportam cadeias de alquila em C4. A separação da maioria das proteínas de proteínas baseia-se nas diferenças das forças interações hidrofóbicas. A eluição é realizada com um tampão de acetato em 200 mM trifluoroacético ácido.

Faz-se a CLEP 0,001 g/ml utilizando uma mistura de
solventes miscíveis. Faz-se com 2,5 e 2,2 litros de gel de sílica
Vydac 04. O produto é eluído de 2,5 litros de acetonitrila
e acidificação por meio de soluções de ácido trifluoroacético
e separada numa coluna Vydac 04. Faz-se a lavagem e o
produto é eluído com 2,5 litros de acetonitrila. O ácido
trifluoroacético é eluído. Faz-se a lavagem e o
produto é eluído com 2,5 litros de ácido trifluoroacético. Faz-se
a lavagem e o produto é eluído com 2,5 litros de ácido trifluoroacético.
Faz-se a lavagem e o produto é eluído com 2,5 litros de ácido trifluoroacético.
Faz-se a lavagem e o produto é eluído com 2,5 litros de ácido trifluoroacético.

a) Cromatografia em DEAE sefarose

O material de DEAE sefarose (Pharmacia) consiste em
grupos de dietilaminoetil (DEAE) que estão ligados
covalentemente à superfície das partículas de sefarose. A
ligação da EPO aos grupos de DEAE é mediada por interações
iônicas. O acetonitrilo e o ácido trifluoroacético passam
através da coluna sem ficar retido. Depois destas
substâncias serem lavadas, eliminam-se os traços de
impurezas por meio da lavagem da coluna com tampão de
acetato a um pH baixo. Depois lava-se a coluna com tampão
neutro de fosfato e faz-se a eluição com um tampão com uma
força iônica aumentada.

Enche-se a coluna com DEAE e sefarose de fluxo rápido.
Ajusta-se o volume da coluna para assegurar uma carga de
EPO no intervalo de 3 - 10 mg EPO/ml de gel. Lava-se a
coluna com água e com tampão de equilíbrio (fosfato de
sódio/potássio). Carregam-se as frações que se juntaram do
ácido da CLEP e lava-se a coluna com água e com tampão de
equilíbrio. Lava-se então a coluna com tampão de lavagem.
Em seguida, faz-se a eluição de EPO a partir da coluna com
tampão de eluição (clorato de sódio, fosfato de

homogeneizada, e recolhe-se numa única fracção de acordo com o perfil de eluição principal.

O eluato da coluna com DEAE e sulfatos é ajustado a condutividade específica. A substância farmacêutica resultante é filtrada em meio esterilizado em garrações de Teflon e armazenada a -20 °C.

EXEMPLO 2: Tratamento com polietileno-glicol da EPO com PEGm-SBA

Homogeneizou-se a EPO purificada de acordo com o processo isento de soro do exemplo 1 (EPOis), conforme determinado por processos analíticos e exibiu o padrão de isoforma típico que consiste em 3 isoformas. Tinha uma actividade biológica específica de 190.000 UI/mg como determinado pelo ensaio de rato normocitémico. O reagente de polietileno-glicol utilizado foi o metoxi-PEG-SBA, que é um composto de fórmula II na qual o símbolo R representa um grupo metilo; x representa 3; e o símbolo m está entre 500 e 750 (com uma média de cerca de 650, correspondendo a um peso molecular médio de cerca de 30 kDa).

Reacção de tratamento com um reagente de polietileno-glicol

Em 100 microlitros de EPO is 19,71 mL de um concentrado de 10 mg/mL de EPO, 5,46 microlitros adicionou-se 10 mL de um tampão de fosfato 0,1 M pH 7,5 contendo 0,1 M de NaCl e 0,01 M de NaHCO₃. O reagente de metoxi-PEG-SBA (16,5 u de metoxi-PEG-SBA) (obtido da Shearwater Polymers, Inc., 18 Annville, Alabama) adicionou-se a 25 °C temperatura ambiente (20-23 °C). A reacção foi iniciada com a adição de 5 mg/mL de EPO is e a reacção parou-se a reacção ajustando o pH para 4,5 com ácido

solução glicérol e armazenou-se a -20°C , até estar pronto para purificação.

Purificação

1. **Mistura de conjugados:** Carregou-se aproximadamente 24 mL de SP-320HAROSE FT (resina permeável de cálcio de sulfato-propilo) numa coluna de vidro EMILCON (2,2 x 7,5 cm) e equilibrou-se com tampão de acetato 20 mM a pH 4,5 a uma velocidade de fluxo de 150 mL/h. Dissolveu-se seis mililitros de mistura reacional contendo 30 mg de proteína 5 vezes com o tampão de equilíbrio e aplicou-se na coluna. Lavar-se os materiais não adsorvidos com o tampão e eluiu-se a mistura de conjugado de PEG adsorvida a partir da coluna com NaCl 0,175 M ao seio de tampão de equilíbrio. Eluiu-se a EPOis não modificada, ainda remanescente na coluna, com NaCl 750 mM. Re-equilibrou-se a coluna com o tampão inicial. Analisaram-se as amostras por ECPA-SDS (electroforese em gel de poliacrilamida e sulfato de dodecilo e sódio; SDS-PAGE na terminologia inglesa) e determinou-se o grau de existência de PEG. Verificou-se que o eluato de NaCl 0,175 M continha mono- assim como di- e traços de espécies com tri-PEG, enquanto que o eluato de NaCl 750 mM continha EPO is não modificada.

2. **EPOis di-PEG e mono-PEG:** A mistura purificada de conjugado eluida da coluna no escape anterior foi diluída 4 vezes com o tampão e re-aplicada na coluna e lavou-se conforme descrito. As EPOis di-PEG e mono-PEG foram eluidas separadamente da coluna com NaCl 0,1 M e NaCl 0,175 M, respectivamente. Realizou-se também a

eluição com NaCl 750 mM para eluir qualquer EPO is não modificada remanescente.

Alternativamente, realizou-se a mistura reacional 5 vezes com o tempo de secar e aplicou-se na coluna de 10-Sepharose 1-0.5 mg de gel de proteína/mL. Lavou-se a coluna e eluiu-se a mono-PEG-EPOis, a di-PEG-EPOis e a EPO is não modificada como se descreveu na secção anterior.

Resultados

Sintetizou-se PEG-EPOis por conjugação química de uma molécula linear de PEG com um número de peso molecular médio de 30 kDa. PEG-EPOis derivou da reacção entre os grupos amino primários da EPO is e o derivado de éster de succinimido de um ácido PEG-butírico de 30 kDa, resultando numa ligação amida.

Os resultados estão resumidos no quadro I. A mistura purificada de conjugados continha mono-PEG-EPOis e di-PEG-EPOis e estava isenta de EPO is não modificada conforme determinado por análise por EGSA-SDS. A mistura de conjugados tinha 23,4 mg ou 7% do material inicial. A separação por cromatografia de permuta catiónica de mono-PEG-EPOis e di-PEG-EPOis indicou que a relação entre mono- e di-PEG na mistura de conjugados foi aproximadamente de 1:1. Depois da reacção ester completa, a relação dos componentes individuais de mono-difunção modificada foi de 40: 18: 20 (%). O resultado global foi quase quantitativo.

Quadro 1. Resumo dos resultados do tratamento de EPOs com PEG

Mistura	Proteína (µg)	Reatividade (%)
Mis. 3xn.	30	100
Mis. 2	10,7	40
Mis. 1	11,4	15
Mis. 4	6,8	25
Mis. 5	23,4	75

EXEMPLO 3: Tratamento de EPO com PEG -SPA

Faz-se reagir, em solução aquosa, 100 µg de EPOs, diferente da utilizada no exemplo 2, com 30 mg de metoxi-PEG-SPA de 35 kDa (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama). Realizou-se a reacção numa relação de proteína:reagente de 1:3 e as técnicas de purificação estavam de acordo com o exemplo 2. Produziram-se principalmente espécies com mono-PEG.

EXEMPLO 4: Actividade in-vivo da EPO com PEG determinada pelo ensaio do rato normocitémico

O bio-ensaio do rato normocitémico é conhecido na técnica (Pharm. Europa Spec. 1 Erythropoietin SSP Bio 1007 (2)); assim como um processo numa monografia sobre a eritropoietina de Ph. Eur. SSP. Diluíram-se as amostras com ASB-SSP. Administraram-se s.c. de 0,2 ml da fracção de EPO contendo a EPO sem PEG ou EPO como monomero, di- ou tri-PEG dos exemplos 2 ou 3, a ratos normais, saudáveis, com 7-10 semanas de idade. Durante um período de 6 dias, colheu-se sangue por meio de H_2O_2 e o mesmo da veia caudal e diluiu-se em solução normal por de volume de ácido fólico 0,1 mg/ml. O tempo de incubação foi de 3 a 10 minutos.

Realizou-se a contagem de reticulócitos micro-fluorométrica com um citômetro de fluxo, por meio da análise do histograma da fluorescência vermelha. As contagens de reticulócitos foram dadas em termos de números absolutos (por 10.000 células de sangue analisadas). Para os dados apresentados, cada grupo consistia em 5 ratos por dia e os ratos eram sacrificados apenas uma vez.

Foram preparadas, somadas, as seguintes soluções: uma dose de 25 µg de EPO modificada 25 na de EPO, a mistura de PEG(SBA)-EPO do Exemplo 2 (10 ng de conjugado), EPOs mono- e 1 µg do exemplo 1 (10 ng de conjugado), e PEG(SBA)-EPO do Exemplo 3 (10 ng de conjugado) e a solução de controle. Os resultados indicados no quadro 2. Os resultados mostram a atividade superior a um semi-período de vida normal, das espécies EPO com EPO indicados por quantidades significativamente aumentadas de reticulócitos a 0 desvio da contagem máxima de reticulócitos utilizando a mesma dose por rato (10 ng), comparada a uma dose de 25 µg para a EPO não modificada.

QUADRO 2

	EPO (não modificada)	SBA- PEG 30 kDa	Mono SBA 30K	Dí SBA 30 K	Mistura de conjugado de PEG-EPO SBA	Grupo de controle
72 h	1000	1391	1411	994	1329	857
96 h	500	1454	1501	824	1338	897
120 h	<200	1190	1182	781	944	701
144 h	~0	835	807	663	680	708

EXEMPLO 5: Preparação com predominância de mono-PEG-EPC

Reacção com produtos de PEG

Companho 500-100 FF 5,40 g de EPO de 100 kDa em 10 ml de tampão de fosfato de cálcio 100 mM a pH 7,5, ajustada de acordo com o exemplo 1, adicionou-se 329 mg (10,96 μ moles) de reagente de PEG-SBA 30 40% dissolvido em 2 ml de HCl 1 M. Adicionou-se suficiente tampão de fosfato de cálcio (100 mM a pH 7,5) para levar o volume da mistura reaccional a 20 ml. A concentração final da proteína foi de 4 mg/ml e a relação entre proteína e reagente de PEG foi de 1:2. Misturou-se a mistura reaccional durante 2 h à temperatura ambiente (20 - 22°C). Passadas 2 h, a reacção foi parada por acrescento do pH para 4,5 com ácido acético glacial e armazenou-se congelado a -20 °C até estar pronta para purificação.

Purificação

Diluiu-se a mistura reaccional da etapa anterior a 1:5 com acetato de sódio 10 mM, a pH 4,5 e aplicou-se a 100 ml de SP-Sepharose FF (resina permutadora de cátions de sulfopropilo) carregada numa coluna de 4,2 x 19 cm. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão. Controlaram-se os efluentes da coluna a 280 nm com um receptor de UV de Gilson e registou-se com um registador de Kipp e Zonen. Lavou-se a coluna com 100 ml ou 1 volume de leite de tampão de equilíbrio para eliminar os reagentes em excesso, os sub-productos da reacção e PEG-SFO oligomérico. Seguiu-se a lavagem com 2 volumes de leite de NaCl 100 mM para eliminar di-PEG-SFO. O mono-PEG-SFO foi então eluído com NaCl 100 mM. Durante a eluição de mono-PEG-SFO, rejeitaram-se os primeiros 50 ml do pico de proteína e recolheu-se o mono-PEG-SFO com uma fracção de 150 ml. A

EPOis não modificada que permaneceu na coluna foi eluída com NaCl 750 mM. Todas as amostras de eluição foram feitas com tampão de equilíbrio. Análises de amostras alíquotas por HPLC-SEC e por cromatografia de exclusão de dimensão (CED) de elevada resolução. O aglomerado de mono-FEG-EPO obtido da fracção de 150 mL, que não tinha EPOis não modificada, detectável, foi então concentrado para ~ 4,5 a 7,5 mg/mL e fez-se a re-filtração em tampão de armazenagem, fosfato de potássio 10 mM, NaCl 100 mM, e pH 7,5. A concentração/re-filtração foram realizadas com um sistema LabScale™ TFF da Millipore ligada com um corte de 50 kDa da membrana Pallflex XL Biomax 50 da Millipore à temperatura ambiente. A mono-FEG-EPO concentrada foi filtrada em meio esterilizado e armazenou-se congelado a -20 °C.

Aproximadamente 75 % da EPOis reagiram com o reagente de FEG. Depois da purificação, o rendimento total foi de ~10 % de mono-FEG-EPO sem EPOis não modificada, detectável e cerca de 25 % de di-FEG-EPO. Os oligómeros e a EPOis que não reagiu com FEG correspondem à proteína restante. O aglomerado de mono-FEG-EPO obtido da fracção de 150 mL contém aproximadamente 90 % de mono-FEG-EPO e aproximadamente 10 % de di-FEG-EPO.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(3) INFORMAÇÃO GERAL

(1) REQUERENTE

(A) NOME: F. Hoffmann-La Roche AG
(B) END: 124 Grenzachstrasse
(C) CIDADE: Basle
(E) PAÍS: Suíça
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070
(G) TELEFONE: (61) 688 11 11
(H) TELEFAX: (61) 688 13 93
(I) TELEX: 962 292 niz ch

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Conjugados de eritropoietina

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 3

(iv) FORMA LÍSEVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Floppy disk
(B) COMPUTADOR: compatível com IBM PC
(C) SISTEMA OPERATIVO: WORD
(D) SOFTWARE: Patentis Release 2.0

<170> Patentis Ver. 2.0

<210> 1

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Aia Fro Fro Arg Lys Ile Cys Arg Ser Arg Val Leu Glu Arg Val Leu

Leu Glu Ala His Glu Ala Glu Asp Ile Thr Thr Glu His Ala Glu His
23 25 30

Glu Ser Leu Asp Glu Asp Ile Thr Val Pro Asp Thr His Val Asp Ser
35 40 45

Thr Ala Trp His Arg Met Glu Val Gln Gln His Ala Val Glu Val Trp
50 55 60

Glu Gln Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gln Gln Ala Leu
65 70 75 80

Leu Val Asp Ser Ser Glu Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp
85 90 95

His Ala Val Ser Gln Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110

Gln Ala Gln His Glu Ala His Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125

Pro Leu Arg Thr His Thr Ala Asp Thr Phe Arg His Leu Phe Arg Val
130 135 140

Thr Ser Asp Phe Leu Arg Gln His Leu His Leu Thr Thr Gln Glu Ala
145 150 155 160

Glu Arg Thr Gln Asp
165

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Phe Ser Asn Leu Val Cys Asp Ser Arg Val Leu Val Arg Trp Leu
10 15

Leu Glu Ala Val Val Phe Val Asp Val Trp Trp Cys Val Ala Val Val
20 25

Glu Ser Leu Asp Glu Asn Ile Trp Val Ser Asp Trp Val Val Ser Phe
30 35 40

Trp Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Glu Glu Glu Ala Val Glu Val Trp
45 50 55

Glu Glu Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Glu Glu Ala Leu
60 65 70 75 80

Leu Val Asn Ser Ser Glu Pro Trp Glu Pro Leu Glu Leu His Val Asp
85 90 95

His Ala Val Ser Glu Leu Arg Ser Leu Trp Trp Leu Leu Arg Ala Leu
100 105 110

Glu Ala Glu Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
115 120 125

Pro Leu Arg Trp Ile Trp Ala Asp Trp Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
130 135 140

Trp Ser Asn Phe Leu Arg Glu His Leu His Leu Trp Trp Glu Glu Ala
145 150 155 160

Glu Arg Trp Glu Asp Arg
165

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

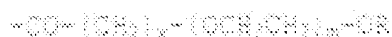
Ser Ser Ser Ser Lis Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser I r a Ser Arg
1 3 10 15

Leu Pro Gln Pro Ser Asp Tre Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

Lisboa, 27 de Agosto de 2037

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado caracterizado pelo facto de compreender uma ou mais cadeias de oligossacáridos com pelo menos um grupo amino livre e um ou mais sítios de ligação glicosídica, em que cada uma das unidades de módulo dessa oligossacárida é formada por uma ou mais unidades hexosídicas e que se trata de um ou mais derivados da entropoleitina humana modificada pela adição de 1 a 6 sítios de ligação glicosídica ou um rearranjo de pelo menos um sítio de ligação glicosídica; estando a referida glicoproteína ligada por uma ligação covalente a um ou mais grupos de poli(etileno-glicol), com a fórmula geral:



em que o grupo -CO (i.e. carbonilo) de cada grupo poli(etileno-glicol) formando uma ligação de amida com um dos referidos grupos amino; em que

x representa um grupo alquilo C₁-C₄;

x representa 2 ou 3;

n representa entre 450 e 900;

n representa de 1 a 3; e

o e n escolhem-se de tal modo que o peso molecular do conjugado tenha menos de 6 da glicoproteína de entropoleitina humana, entre 20 kilodaltons e 100 kilodaltons.

2. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de ter a fórmula geral:



em que os símbolos X, Y, Z e W têm as significações definidas na reivindicação 1 e o símbolo " representa um radical de uma cadeia carbónica saturada ou não saturada, os grupos amino ou formam ligação amida aos os grupos de volúatilidade.

3. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de o símbolo Z representar um grupo metilo.
4. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de o símbolo W representar entre cerca de 650 e cerca de 750.
5. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de o símbolo X representar I.
6. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de o símbolo Z representar um grupo metilo; o símbolo W representar entre cerca de 650 e cerca de 750; e o símbolo X representar I.
7. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de ter a fórmula geral:



em que o símbolo m representa desde cerca de 300 até cerca de 750 e o símbolo n representa 1 e P tem o significado definido na reivindicação 2.

4. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ser uma eritropoietina humana.
5. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de a glicoproteína de eritropoietina ser expressa por activação antigénica de genes.
10. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ter a sequência SEQ ID NO: 1.
11. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ter a sequência da eritropoietina humana modificada pela adição de 1 a 6 sítios de glicosilação.
12. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ter a sequência da eritropoietina humana modificada por uma modificação seleccionada no grupo que consiste em:

Asn⁷⁰Tre⁷³;
 Asn⁸¹Tre⁸³;
 Asn⁸¹Tre⁸³;
 Asn⁸⁵;
 Asn⁸⁶Tre⁸⁷;
 Ser⁸⁸Asn⁸⁹Tre⁹¹;
 Val⁹¹Asn⁹³Tre⁹⁵;
 Ser⁹⁷Asn⁹⁸Tre¹⁰¹;
 Ser⁹⁷Asn⁹⁸Gln¹⁰⁰Tre¹⁰²;
 Ser⁹⁷Asn⁹⁸Tre¹⁰¹Tre¹⁰²;
 Ser⁹⁷Asn⁹⁸Tre¹⁰¹Ala¹⁰³.

Asn⁸⁸Tre⁷⁷Ser⁸⁷Asn⁸⁹Tre⁹⁰;
 Asn⁸⁸Tre⁷⁸Val⁸⁷Asn⁸⁸Tre⁸⁹;
 Asn⁸⁸Ile⁸⁹Tre⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Tre⁹¹;
 Asn¹²⁸Tre¹²⁸;
 Asn¹²⁸Tre¹²⁹;
 Tre¹²¹; e
 Pro¹²⁹Tre¹²⁹.

13. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ter uma sequência que compreende a sequência de eritropoietina humana e uma segunda sequência na terminação carboxi da sequência de eritropoietina humana, em que a segunda sequência contém pelo menos um sítio de glicosilação.

14. Conjugado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de as segundas sequências compreenderem uma sequência derivada da sequência de terminal carboxi da globulina coriônica humana.

15. Conjugado, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ter uma sequência seleccionada no grupo que consiste em:

- (a) a sequência de eritropoietina humana e a sequência ■EQ IP NO: 3 no terminal carboxi da sequência de eritropoietina humana;
- (b) a sequência de (a) modificada por Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Tre⁸⁹; e
- (c) a sequência de (a) modificada por Asn⁸⁸ Tre⁸⁹ Val⁸⁷ Asn⁸⁹ Tre⁹⁰.

15. Conjugado de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 e 7, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ser a sequência de eritropoietina humana modificada por um rearranjo de pelo menos um sítio de glicosilação.

16. Conjugado, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de o rearranjo compreender a eliminação de qualquer um dos sítios de glicosilação ligados a N na eritropoietina humana e a adição de um sítio de glicosilação ligado a N na posição 53 da sequência de eritropoietina humana.

18. Conjugado, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo facto de a glicoproteína ser a sequência de eritropoietina humana modificada por uma modificação seleccionada no grupo que consiste em:

Gln⁵⁴ Ser⁵¹ Asn⁵⁸ Thr⁶⁰;

Gln⁵⁸ Ser⁵¹ Asn⁵⁸ Thr⁶⁰; e

Gln⁶³ Ser⁵¹ Asn⁵⁸ Thr⁶⁰.

19. Composição compreendendo conjugados, caracterizada pelo facto de cada um dos referidos conjugados compreender uma glicoproteína de eritropoietina com pelo menos um grupo amino livre e de ter a actividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de células de reticulócitos e de glóbulos vermelhos e de se seleccionar do grupo que consiste em eritropoietina humana e eritropoietina humana modificada, por meio da adição de 1 a 6 sítios de glicosilação ou um rearranjo de pelo menos um sítio de glicosilação; a glicoproteína em cada um dos referidos conjugados está ligada covalentemente a "n" grupos de poli(etileno-glicol) de fórmula geral -CO-

10k, -00k, 0k, -0k com o grupo -10. De cada grupo de polissacarídeo-glicol) a formar uma ligação amida com um dos referidos grupos amino/ em que cada um dos referidos conjugados representados pelo símbolo β representa um grupo alquila C-C-f; o símbolo α representa l ou 2; o símbolo m representa de 40 a 800; o símbolo n representa de 1 a 3; os símbolos r e s são escolhidos de tal maneira que o peso molecular de cada conjugado menos o de glicoproteína de oxitriptina seja de 20 milodaltone a 100 kilodaltone; a percentagem de conjugados em que n representa 1 é de pelo menos noventa por cento.

20. Composição compreendendo conjugados, tal como definidos em uma qualquer das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo facto de a percentagem de conjugados, quando n representa 1, ser de pelo menos noventa por cento.

21. Composição de acordo com as reivindicações 19 ou 20, caracterizada pelo facto de a percentagem de conjugados, quando n representa 1 ser de pelo menos noventa e dois por cento.

22. Composição de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo facto de a percentagem de conjugados, quando n representa 1, ser de pelo menos noventa e seis por cento.

23. Composição de acordo com as reivindicações 19 ou 20, caracterizada pelo facto de a percentagem de conjugados, quando n representa 1, ser entre noventa por cento de e noventa e seis por cento.

14. Conjugado farmacológico caracterizado pelo facto de compreender um conjugado de uma composição de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 23 e um excipiente aceitável sob o ponto de vista farmacológico.

15. Utilização de um conjugado de acordo com uma reivindicação, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo facto de se destinar a ser utilizada em tratamentos para o tratamento ou a prevenção de doenças associadas com anemia em pacientes com insuficiência renal crónica (IRC), SIDA e para o tratamento de doentes com cancro que são sujeitos a quimioterapia.

16. Processo para a preparação de conjugados, de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo facto de compreender a condensação do composto de fórmula geral II:



com uma glicoproteína de eritropoietina e em que os símbolos R, m e n têm os significados definidos nas reivindicações 1 a 5.

17. Conjugados de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo facto de se destinarem ao tratamento de doenças que estão associadas com anemia em pacientes com insuficiência renal crónica (IRC), SIDA e para o tratamento de doentes de cancro que são sujeitos a quimioterapia.

Conjugado, caracterizado pelo facto de compreender uma glicoproteína Se eritropoietina humana comportando pelo menos um grupo amino livre e tendo actividade biológica *in vivo* que faz com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de células de glóbulos vermelhos; estando a referida glicoproteína ligada covalentemente a "n" grupos de poli(etileno-glicol) de fórmula geral



com o grupo $-CO$ de cada grupo de poli(etileno-glicol) a formar uma ligação amida com um dos referidos grupos amino; em que

R representa um grupo metilo;

x representa 3;

m representa entre 650 e 750;

n representa 1; e

n e m são escolhidos de tal maneira que o peso molecular médio do conjugado menos a glicoproteína de eritropoietina é de cerca de 30 kilodaltons.

Lisboa, 27 de Agosto de 2007