



(12) PATENT

(19) NO

(11) 327043

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 17/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20003372	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2000.06.28	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2000.06.28	(30)	Prioritet	1999.07.02, US, 142254 1999.08.23, US, 150225 1999.08.31, US, 151548 1999.11.17, US, 166151
(41)	Alm.tilgj	2001.01.03			
(45)	Meddelt	2009.04.06			
(73)	Innehaver	F Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 BASEL, CH			
(72)	Oppfinner	Pascal Sebastian Bailon, 21 Woodbine Road, NJ07932 FLORHAM PARK, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

(54)	Benevnelse	Konjugat, preparat samt anvendelse derav og fremgangsmåte for fremstilling.		
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9911781, WO 9927897		
(57)	Sammendrag			

Foreliggende oppfinnelse vedrører konjugater av erythropoietin med poly(etylenglykol) omfattende et erythropoietin-glykoprotein som har minst en fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet som forårsaker at benmargceller øker produksjonen av reticulocytter og røde blodceller og er valgt fra gruppen bestående av humant erythropoietin og analoger derav som har sekvens av humant erythropoietin modifisert ved addisjon av fra 1 til 6 glykosyleringssteder eller en omleiring av minst ett glykosyleringssete; idet nevnte glyko-protein er kovalent bundet til "n" poly(etylenglykol)- grupper med formelen $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ idet karbonylen til hver poly(etylenglykol)gruppe danner en amidbinding med en av nevnte aminogrupeer; hvor R er lavere alkyl; x er 2 eller 3; m er ca. 450 til ca. 900; n er fra 1 til 3; og n og m er valgt slik at molekylvekten til konjugatet minus erythropoietin-glykoproteinet er fra 20 kilodalton til 100 kilodalton.

Foreliggende oppfinnelse vedrører konjugat, preparat samt anvendelse derav og fremgangsmåte for fremstilling.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Erytropoiese er dannelse av røde blodceller som forekommer for å kompensere celledestruksjon. Erytropoiese er en kontrollert fysiologisk mekanisme som gjør det mulig at tilstrekkelige røde blodceller blir tilgjengelig for riktig vevsoksygenering. Naturlig forekommende human erythropoietin (hEPO) blir produsert i nyrene og er den humorale plasmafaktoren som stimulerer rødt-blodcelleproduksjon (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W og Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). Naturlig forekommende EPO stimulerer delingen division og differensieringen av utøvende erytroide progenitorer i benmargen og utøver sin biologiske aktivitet ved binding til reseptorer på erytroidforløpere (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419).

Erythropoietin blir fremstilt biosyntetisk ved anvendelse av rekombinant DNA teknologi (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) og er produktet av et klonet human EPO gen innsatt i og uttrykt i eggstokkvevcellene til den kinesiske hamster (CHO celler). Primærstrukturen til den dominerende, fullstendig prosesserte form av hEPO er illustrert i SEKV ID NR:1. Det er to disulfidbroer mellom Cys⁷-Cys¹⁶¹ og Cys²⁹-Cys³³. Molekylvekten til polypeptidkjeden til EPO uten sukker- gruppene er 18,236 Da. I det intakte EPO-molekyl utgjøres omtrent 40% av molekyl-vekten av karbohydratgruppene som glykosylerer proteinet i glykosyleringssetene på proteinet (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A og Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

Fordi human-erythropoietin er essensiell i rød blodcelledannelse er hormonet nyttig ved behandling av blodsykdommer karakterisert ved lav eller defekt rød blodcelleproduksjon. Klinisk blir EPO anvendt ved behandling av anemi hos kronisk nyresvikt-pasienter (CRF) (Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) og i AIDS og kreftpasienter som gjennomgår kjemoterapi (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker, 1990: s.

301-324). Imidlertid er biotilgjengeligheten av kommersielt tilgjengelige terapeutiske proteinmidler så som EPO begrenset av deres korte plasmahalveringstid og tilbøyelighet til proteasenedbrytning. Disse mangler forhindrer dem fra å nå maksimal klinisk potensiale.

5 WO 9911781 beskriver rekombinant humant erytropoietin der glykosyleringsprofilen modifiseres slik at disse polypeptidene får en forlenget *in vivo* halveringstid og økt biologisk aktivitet.

WO 9927897 beskriver glykoprotein-konjugater der hGRF er bundet til PEG og dette
10 øker konjugatets sirkulerende halveringstid.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et konjugat, hvilket konjugat omfatter et
15 erytropoietin-glykoprotein som har minst én fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet hvilken forårsaker at benmargceller øker produksjon av reticulocytter og røde blodceller og er valgt fra gruppen bestående av humant erytropoietin og humant erytropoietin modifisert ved addisjon av fra 1 til 6 glykosyleringsseter eller en omleiring av minst ett glykosyleringssete; idet nevnte glykoprotein er kovalent bundet til "n"
20 poly(etylenglykol) grupper med formelen



slik at -CO i hver poly(etylenglykol) gruppe danner en amidbinding med én av nevnte
25 aminogrunder; hvor

R er C₁-C₆-alkyl;

x er 2 eller 3;

m er fra 450 til 900;

n er fra 1 til 3; og

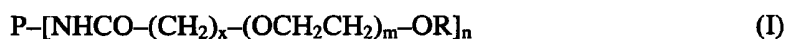
30 n og m er valgt slik at molekylvekten til konjugatet minus erytropoietin-glykoproteinet er fra 20 kilodalton til 100 kilodalton.

Sammenlignet med umodifisert EPO (dvs. EPO uten et PEG tilknyttet) og konven-
35 sjonelle PEG-EPO konjugater, har foreliggende konjugater en øket sirkulerende halveringstid

og plasmaoppholdstid, redusert utskillelse og øket klinisk aktivitet *in vivo*. Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse har samme anvendelser som EPO. Spesielt er konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse nyttige for å behandle pasienter ved å stimulere delingen og differensieringen av "committed erytroid progenitors" i benmargen på samme måte som EPO
5 blir anvendt for å behandle pasienter.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

10 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ovennevnte konjugater. Konjugater er kjennetegnet ved formelen



15 hvor x, m, n og R er som definert i krav 1 og P er resten av glykoproteinet uten n aminogruppen(e) som danner amidbinding(er) med poly(etylen-glykol)gruppen(e).

Det er funnet at konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes på samme måte som umodifisert EPO. Imidlertid har konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse en
20 øket sirkulasjonshalveringstid og plasmaoppholdstid, redusert utskillelse og øket klinisk aktivitet *in vivo*. På grunn av disse forbedrede egenskaper kan konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse administreres én gang ukentlig istedenfor tre ganger ukentlig for umodifisert EPO. Redusert administreringsfrekvens er forventet, hvilket resulterer i forbedret pasientfordragelighet, hvilket fører til forbedrete behandlingsresultater, så vel som forbedret
25 livskvalitet for pasienten. Sammenlignet med konvensjonelle konjugater av EPO bundet til poly(etylenglykol) er det funnet at konjugater som har molekylvekten og linkerstrukturen til konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse, har en forbedret styrke, stabilitet, AUC, sirkulasjonshalveringstid og kostnadsprofil.

30 Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres i en terapeutisk effektiv mengde til pasienter på samme måte som EPO blir administrert. Den terapeutisk effektive mengde er den mengde av konjugat som er nødvendig for den *in vivo* biologiske aktivitet som forårsaker at benmarg øker produksjon av reticulocytter og røde blodceller. Den nøyaktige mengde av konjugat er et spørsmål som er avhengig av slike faktorer som den nøyaktige type
35 tilstand som behandles, tilstanden til pasienten som behandles, så vel som de andre bestan-

deler i preparatet. For eksempel 0,01 til 10 µg pr. kg kroppsvekt, fortrinnsvis 0,1 til 1 µg pr. kg kroppsvekt, kan administreres f.eks. én gang ukentlig.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre preparat, kjennetegnet ved at det omfatter
5 konjugater, idet hvert av nevnte konjugater omfatter et erythropoietin-glykoprotein som har
minst én fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet som forårsaker at
benmargceller øker produksjonen av reticulocytter og røde blodceller og er valgt fra gruppen
bestående av humant erythropoietin og humant erythropoietin modifisert ved addisjon av fra 1
til 6 glykosyleringsseter eller en omleiring av minst ett glykosyleringssete; idet glykoproteinet
10 i hvert nevnte konjugat er kovalent bundet til "n" poly(etylenglykol) grupper med formelen
 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ idet -CO i hver poly(etylenglykol)gruppe danner en amid-
binding med én av nevnte aminogrupeer; hvor i hvert av nevnte konjugater R er C₁-C₄-alkyl;
x er 2 eller 3; m er fra 450 til 900; n er fra 1 til 3; n og m er valgt slik at molekylvekten
til hvert konjugat minus erythropoietin-glykoproteinet er fra 20 kilodalton til 100 kilodalton;
15 prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er minst nitti prosent.

Oppfinnelsen vedrører også farmasøytisk preparat, kjennetegnet ved at det omfatter et
konjugat eller et preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23 og et farmasøytisk
akseptabelt tilsetningsmiddel.

20 De farmasøytiske preparater inneholdende konjugatet kan formuleres til en styrke som
er effektiv for administrering med forskjellige midler til et menneske som har blod-
sykdommer karakterisert ved lav eller defekt produksjon av røde blodceller.
Gjennomsnittlige terapeutisk effektive mengder av konjugatet kan variere og bør spesielt
25 baseres på anbefalingene for resepten til en kvalifisert lege.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også anvendelse av et konjugat eller et preparat
ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23, for fremstilling av medikamenter for behandling
eller forebygging av sykdommer korrelert med anemi hos kronisk nyresvikt-pasienter (CRF),
30 AIDS og for behandling av kreftpasienter som gjennomgår kjemoterapi.

Erythropoietinglykoproteinproduktene fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse
kan følgelig dannes til farmasøytiske preparater egnet for injeksjon med en farmasøytisk
akseptabel bærer eller konstituent ved metoder kjent på området. For eksempel er egnete

preparater beskrevet i WO97/09996, WO97/40850, WO98/58660 og WO99/07401. Blant de foretrukne farmasøytisk akseptable bærere for formulering av produktene ifølge foreliggende oppfinnelse er humant serum albumin, humane plasmaproteiner, etc. Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan formuleres i 10 mM natrium/kaliumfosfatbuffer ved pH 7

5 inneholdende et tonisitettsmiddel, f.eks. 132 mM natriumklorid. Eventuelt kan det farmasøytiske preparatet inneholde et konserveringsmiddel. Det farmasøytiske preparatet kan inneholde forskjellig mengder av erythropoietin, f.eks. 10 - 1000 µg/ml, f.eks. 50 µg eller 400 µg.

10 Betegnelsen "erythropoietin" eller "EPO" angir et glykoprotein som har aminosyresekvensen angitt i (SEKV ID NR: 1) eller (SEKV ID NR: 2) eller en aminosyresekvens hovedsakelig homolog til denne, hvis biologiske egenskaper relaterer til stimuleringen av produksjonen av røde blodceller og stimuleringen av delingen og differensieringen av "committed erythroid progenitors" i benmargen. Som anvendt her omfatter disse betegnelser

15 slike proteiner modifisert bevisst, som for eksempel ved setedirigert mutagenese eller tilfeldig gjennom mutasjoner. Disse betegnelser omfatter også analoger som har fra 1 til 6 ytterligere seter for glykosylering, analoger som har minst én ytterligere aminosyre på karboksyenden av glykoproteinet, hvor den ytterligere aminosyre omfatter minst ett glykosyleringssete, og analoger som har en aminosyresekvens som omfatter en omleiring av minst ett sete for

20 glykosylering. Disse betegnelser omfatter både naturlig og rekombinant produsert human erythropoietin.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er R metyl. Fortrinnsvis er m fra ca. 650 til ca. 750 og n er fortrinnsvis 1.

25 Ved den mest foretrukne utførelsesform av oppfinnelsen er R metyl, m er fra ca. 650 til ca. 750 og n er 1, dvs. konjugatet som definert ovenfor som har formelen



30 hvor m er fra 650 til 750, n er 1 og P er som definert ovenfor. Fortrinnsvis har m et gjennomsnitt på ca. 680.

35 Fortrinnsvis er glykoproteinet i konjugatene som definert ovenfor et humnat erythropoietin. Humant erythropoietin og analoge proteiner som definert ovenfor kan uttrykkes

ved endogen genaktivering. Foretrukne humane erythropoietinglykoproteiner er de med SEKV ID NR:1 og SEKV ID NR:2, mest foretrukket de med SEKV ID NR:1.

Videre kan P velges fra gruppen bestående av rester av humant erythropoietin og
5 analoger derav som har fra 1 til 6 ytterligere seter for glykosylering. Som angitt i detalj
nedfor er fremstillingen og rensningen av EPO velkjent på området. Med EPO menes det
naturlige eller rekombinante protein, fortrinnsvis humant, som oppnås fra hvilken som helst
konvensjonell kilde så som vev, proteinsyntese, cellekultur med naturlige eller rekombinante
10 celler. Hvilket som helst protein som har aktiviteten til EPO, så som muteiner eller på annen
måte modifiserte proteiner er omfattet. Rekombinant EPO kan fremstilles gjennom
ekspressjon i CHO-, BHK- eller HeLa cellelinjer ved rekombinant DNA-teknologi eller ved
endogen genaktivering. Ekspressjon av proteiner, omfattende EPO ved endogen genaktivering
er velkjent på området og er beskrevet for eksempel i US patenter nr. 5,733,761, 5,641,670 og
5,733,746 og international patentpublikasjon nr. WO93/09222, WO94/12650, WO95/31560,
15 WO90/11354, WO91/06667 og WO91/09955. De foretrukne EPO-arter for fremstilling av
erythropoietinglykoproteinprodukter er humane EPO arter. Mer foretrukket er EPO-artene det
humane EPO som har aminosyresekvensen angitt i SEKV ID NR:1 eller SEKV ID NR:2, mer
foretrukket aminosyresekvensen SEKV ID NR:1.

20 I en utførelsesform kan P være resten av en glykoproteinanalog som har fra 1 til 6
ytterligere seter for glykosylering. Glykosylering av et protein med én eller flere
oligosakkarid-grupper forekommer på spesifikke stillinger langs en polypeptidkjede og
påvirker sterkt de fysikalske egenskapene til proteinet så som proteinstabilitet, sekresjon,
subcellulær lokalise-ring og biologisk aktivitet. Glykosylering er vanligvis av to typer.
25 O-bundete oligosakkarider er bundet til serin- eller treoninrester og N-bundete
oligosakkarider er bundet til asparagin-rester. Én type oligosakkarid funnet på både
N-bundete og O-bundete oligosakkarider er N-acetylneuraminsyre (sialinsyre), som er en
familie av aminosukkere inneholdende 9 eller flere karbonatomer. Sialinsyre er vanligvis den
terminale residue på både N-bundete og
30 O-bundete oligosakkarider, og fordi den har en negativ ladning, bringer den sure egenskaper
til glykoproteinet. Humant erythropoietin, som har 165 aminosyrer, inneholder tre N-bundete
og én O-bundet oligosakkaridkjeder som omfatter ca. 40% av den totale molekylvekt av
glykoproteinet. N-bundet glykosylering forekommer på asparagin-rester lokalisert i stillinger
24, 38 og 83, og O-bundet glykosylering forekommer på en serinrest lokalisert i stilling 126.

Oligosakkaridkjedene blir modifisert med terminale sialinsyrerester. Enzymatisk fjerning av alle sialinsyrerester fra det glykosylerte erythropoietin resulterer i tap av *in vivo* aktivitet, men ikke *in vitro* aktivitet, fordi sialylering av erythropoietin forhindrer dets binding og påfølgende utskillelse ved hepatisk bindingsprotein.

5

Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter analoger av humant erythropoietin med én eller flere endringer i aminosyresekvensen av humant erythropoietin som resulterer i en økning av antallet seter for sialinsyretilknytning. Disse glykoprotein- analoger kan dannes ved setedirigert mutagenese som har addisjoner, delesjoner eller substitusjoner av

10 aminosyrerester som øker eller endrer seter som er tilgjengelige for glykosylering. Glykoproteinanaloger som har nivåer av sialinsyre høyere enn de som er funnet i human erythropoietin er dannet ved addisjon av glykosyleringsseter som ikke forstyrrer den sekundære eller tertiære konformasjon som er nødvendig for biologisk aktivitet. Glykoproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også analoger som har økede nivåer av

15 karbohydrattilknytning på et glykosyleringssete som vanligvis involverer substitusjon av én eller flere aminosyrer i helt inntil et N-bundet eller O-bundet sete. Glykoproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også analoger som har én eller flere aminosyrer som strekker seg fra den karboksyterminale ende av erythropoietin og gir minst ett ytterligere karbohydratsete. Glykoproteinene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også analoger

20 som har en aminosyresekvens som omfatter en omleiring av et sete for glykosylering. En slik omleiring av glykosyleringssete involverer delesjon av ett eller flere glykosyleringsseter i humant erythropoietin og addisjon av ett eller flere ikke-naturlig forekommende glykosyleringsseter. Økende antallet karbohydratkjeder på erythropoietin og derfor antallet sialinsyrer pr. erythropoietin molekyler kan gi fordelaktige egenskaper så som øket løselighet,

25 større resistens mot proteolysis, redusert immunogenesitet, øket serumhalveringstid og øket biologisk aktivitet. Erythropoietinanaloger med ytterligere glykosyleringsseter er beskrevet i nærmere detalj i europeisk patentsøknad 640 619, til Elliot publisert 1 mars 1995.

I en foretrukket utførelsesform omfatter konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse en

30 aminosyresekvens som omfatter minst ett ytterligere sete for glykosylering så som, men ikke begrenset til, erythropoietiner omfattende sekvensen til humant erythropoietin modifisert ved en modifikasjon valgt fra de følgende:

Asn³⁰Thr³²;
 Asn⁵¹Thr⁵³;
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹;
 5 Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 10 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 15 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; og
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

20 Anmerkingen anvendt her for modifikasjon av aminosyresekvens betyr at stillingen(e) til det tilsvarende umodifiserte protein (f.eks. hEPO i SEKV ID NR:1 eller SEKV ID NR:2) angitt ved de hevete tall er forandret til aminosyren(e) som står umiddelbart forut for de respektive hevete tall.

25 Glykoproteinet kan også være en analog som har minst én ytterligere aminosyre på den karboksyterminale ende av glykoproteinet, hvor den ytterligere aminosyre omfatter minst ett glykosyleringssete, dvs. konjugatet som definert ovenfor angir også en forbindelse hvor glykoproteinet har en sekvens omfattende sekvensen til humant erythropoietin og en andre
 30 sekvens på karboksyenden av den humane erythropoietin sekvens, hvor den andre sekvens inneholder minst ett glykosyleringssete. Den ytterligere aminosyre kan omfatte et peptid-fragment avledet fra den karboksyterminale ende av humant chorionisk gonadotropin. Fortrinnsvis er glykoproteinet en analog valgt fra gruppen bestående av (a) humant erythropoietin som har aminosyresekvensen, Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEKV ID NR:3), og strekker seg fra karboksyenden; (b) analogen i (a) omfattende videre Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; og (c) analogen i (a) omfatter videre Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

- 5 Glykoproteinet kan også være en analog som har en aminosyresekvens som omfatter en omleiring av minst ett sete for glykosylering. Omleiringen kan omfatte en delesjon av hvilket som helst av de N-bundete karbohydratseter i humant erytropoietin og en addisjon av et N-bundet karbohydratsete i stilling 88 av aminosyresekvensen til humant erytropoietin. Fortrinnsvis er glykoproteinet en analog valgt fra gruppen bestående av Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; og Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

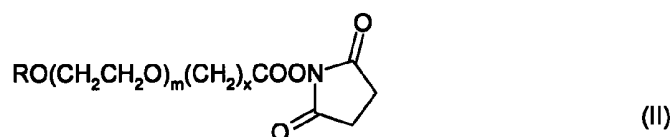
- Som anvendt her betyr "lavere alkyl" en lineær eller forgrenet alkylgruppe som har fra ett til seks karbonatomer. Eksempler på lavere alkylgrupper omfatter metyl, etyl og isopropyl. I henhold til foreliggende oppfinnelse er R hvilken som helst lavere alkyl. Konjugater hvor R er metyl, er foretrukket.

- Symbolet "m" representerer antallet etylenoksydrester (OCH₂CH₂) i poly(etylenoksyd)gruppen. En enkel PEG-subenhet av etylenoksyd har en molekylvekt på ca. 44 daltons. Således avhenger molekylvekten til konjugatet (unntatt molekylvekten av EPO) av tallet "m". I konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse er "m" fra ca. 450 til ca. 900 (tilsvarende en molekylvekt på ca. 20 kDa til ca. 40 kDa), fortrinnsvis fra ca. 650 til ca. 750 (tilsvarende til en molekylvekt på ca. 30 kDa). Tallet m er valgt slik at det resulterende konjugat ifølge foreliggende oppfinnelse har en fysiologisk aktivitet sammenlignbar med umodifisert EPO, hvilken aktivitet kan representere samme som, mer enn, eller en fraksjon av den tilsvarende aktivitet av umodifisert EPO. En molekylvekt på "ca. " et bestemt tall betyr at det er innenfor et rimelig område fra dette tallet som bestemmes ved konvensjonelle analytiske teknikker. Tallet "m" er valgt slik at molekylvekten av hver poly(etylenglykol)gruppe kovalent bundet til erytropoietin- glykoproteinet er fra ca. 20kDa til ca. 40kDa, og er fortrinnsvis ca. 30kDa.

- 30 I konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse er tallet "n" antallet polyetylenglykolgrupper kovalent bundet til frie aminogrupeer (omfattende ε-aminogrupeer av en lysin-aminosyre og/eller den amino-terminale aminogruppe) av et erytropoietinprotein via amidbinding(er). Et konjugat ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha én, to eller tre PEG-

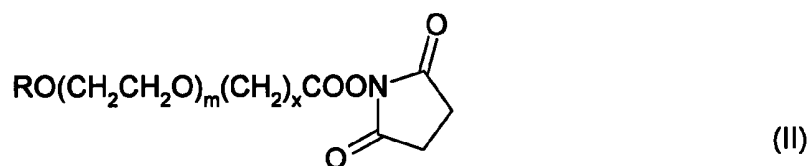
grupper pr. molekyl av EPO. "n" er et helt tall i området fra 1 til 3, fortrinnsvis er "n" 1 eller 2, og mer foretrukket er "n" 1.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre fremgangsmåte for fremstilling av konjugater eller preparater ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23, kjennetegnet ved at
5 den omfatter kondensering av forbindelsen med formel II



med et erythropoietin-glykoprotein og hvor R, m og x er som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 6.

10 Forbindelsen med formel I kan følgelig fremstilles fra det kjente polymere materiale:



hvor R og m er som beskrevet ovenfor, ved kondensering av forbindelsen med formel II med erythropoietinglykoproteinet. Forbindelser med formel II hvor x er 3 er alfa-lavere alkoksy, smørsyre-suksinimidylestere av poly(etylenglykol) (lavere alkoksy-PEG-SBA). Forbindelser
15 med formel II hvor x er 2 er alfa-lavere alkoksy, propionsyre suksinimidylestere av poly(etylenglykol) (lavere alkoksy-PEG-SPA). Hvilken som helst konvensjonell metode for omsetning av en aktivert ester med et amin for å danne et amid kan anvendes. I reaksjonen beskrevet ovenfor er den eksemplifiserte suksinimidylester en utgående gruppe som
20 forårsaker amiddannelsen. Anvendelse av suksinimidylestere så som forbindelsene med formel II for å fremstille konjugater med proteiner er beskrevet i US patent nr. 5,672,662, utstedt september 30, 1997 (Harris, et al.).

Humant EPO inneholder ni frie aminogrupper, den amino-terminale aminogruppe pluss
25 ϵ -aminogruppene av 8 lysin-rester. Når pegyleringsreagens ble kombinert med en SBA-forbindelse med formel II, er det funnet at ved pH 7,5 ble et protein:PEG-forhold på 1:3 og en reaksjonstemperatur på fra 20-25°C, en blanding av mono-, di- og spormengder av de tri-

pegylerte typer produsert. Når pegyleringsreagenset var en SPA-forbindelse med formel II, blir ved lignende betingelser bortsett fra at protein:PEG-forholdet var 1:2, primært de mono-pegylerte typer produsert. Det pegylerte EPO kan administreres som en blanding eller som de kationbytterkromatografi-separerte forskjellige pegylerte typer. Ved å manipulere reaksjons-
 5 betingelsene (f.eks. forhold av reagenser, pH, temperatur, protein- konsentrasjon, reaksjonstid etc.), kan de relative mengder av de forskjellige pegylerte arter varieres.

Humant erythropoietin (EPO) er et menneske-glykoprotein som stimulerer dannelsen av erytrocytter. Dets fresmtilling og terapeutiske applikasjon er beskrevet i detalj for eksempel i
 10 US patent nr. 5.547.933 og 5.621.080, 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 og EP-B 0 411 678 så vel som Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, en Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. Erythropoietin for terapeutiske anvendelser kan produseres ved rekombinante midler (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 og Egrie, J.C., Strickland, T.W.,
 15 Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224).

Metoder for ekspresjon og fremstilling av erythropoietin i serumfritt medium er beskrevet for eksempel i WO 96/35718, til Burg publisert 14. november 1996 og i europeisk patentpublikasjon nr. 513 738, til Koch publisert 12. juni 1992. I tillegg til de publikasjoner
 20 som er nevnt ovenfor, er det kjent at en serum-fri fermentering av rekombinante CHO-celler som inneholder et EPO-gen kan utføres. Slike metoder er beskrevet for eksempel i EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 og i en generell form av Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. og Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307
 25 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

I EP-A 0 267 678 er en ionebytterkromatografi på S-Sepharose, et preparativ revers-fase-HPLC på en C₈ kolonne og en gelfiltreringskromatografi beskrevet for rensingen av EPO produsert i serum-fri kultur etter dialyse. I denne forbindelse kan gelfiltrerings-
 30 kromatografitrinnet være erstattet av ionebytterkromatografi på S-Sepharose "fast flow". Det er også foreslått at en fargestoffkromatografi på en "Blue Trisacryl kolonne" utføres før ionebytterkromatografien.

En fremgangsmåte for rensing av rekombinant EPO er beskrevet av Nobuo, I. et al.,

J. Biochem. 107 (1990) 352-359. I denne prosessen blir EPO imidlertid behandlet med en løsning av Tween[®] 20, fenylmetylsulfonylfluorid, etylmaleimid, pepstatin A, kobber- sulfat og oksamsyre før rensetrinnet. Publikasjoner, omfattende WO 96/35718, til Burg publisert 14. november 1996, beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av erythropoietin i en serumfri fermenteringsprosess (EPOsf).

Den spesifikke aktivitet av EPO eller EPO-konjugater i henhold til foreliggende oppfinnelse kan bestemmes ved forskjellige forsøk kjent på området. Den biologiske aktiviteten til de rensede EPO-proteiner ifølge foreliggende oppfinnelse er slik at administrering av EPO-proteinet ved injeksjon til humane pasienter resulterer i benmargs- celleøkning/produksjon av reticulocytter og røde blodceller sammenlignet med ikke-injiserte eller kontrollgrupper av individer. Den biologiske aktiviteten til EPO proteinene eller fragmenter derav, oppnådd og rensed i henhold til foreliggende oppfinnelse, kan testes ved metoder i henhold til Annable, et al., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112 og Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2). Et annet biologisk forsøk for å bestemme aktiviteten til EPO-protein, det normocytaemiske museforsøk, er beskrevet i Eksempel 4.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgende et preparat omfattende konjugater som beskrevet ovenfor. Et preparat inneholdende minst nitti prosent mono-PEG konjugater, dvs. hvor n er 1, kan fremstilles som vist i Eksempel 5. Vanligvis er mono-PEG konjugater av erythropoietinglykoproteiner ønskelig fordi de tenderer til å ha høyere aktivitet enn di-PEG konjugater.. Prosentdelen av mono-PEG konjugater så vel som forholdet av mono- og di-PEG typer kan kontrolleres ved sammenslåing av bredere fraksjoner rundt elueringsstoppen for reduksjon av prosentdelen av mono-PEG eller snevrere fraksjoner for å øke prosentdelen av mono-PEG i preparatet. Omtrent nitti prosent mono-PEG konjugater er en god balanse av utbytte og aktivitet. Noen ganger kan preparater hvor for eksempel minst nittito prosent eller minst nittiseks prosent av konjugatene er mono-PEG typer (n equals 1) være ønsket. I en utførelsesform av oppfinnelsen er prosentdelen av konjugater hvor n er 1 fra nitti prosent til nittiseks prosent.

Oppfinnelsen vedrører også som angitt ovenfor de tilsvarende farmasøytiske preparater omfattende et konjugat eller et preparat som beskrevet ovenfor og et farmasøytisk akseptabelt tilsetnings-middel.

Konjugatene og preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse er spesielt nyttige for fremstilling av medikamenter for behandling eller forebygging av sykdommer i sammenheng med anemi hos kronisk nyresvikt-pasienter (CRF), AIDS og for behandling av kreftpasienter som gjennomgår kjemoterapi.

5

Oppfinnelsen vil bedre forstås ved referanse til de følgende eksempler som illustrerer oppfinnelsen beskrevet heri.

EKSEMPLER

10

EKSEMPEL 1: Fermentering og rensning av humant EPO

a) Inoculumfresmtilling og fermentering

15

Et medisingsglass fra Working Cell Bank, som stammer fra en EPO-produserende CHO cellelinje (ATCC CRL8695, beskrevet i EP 411 678 (Genetics Institute) kan anvendes) blir tatt fra gassfasen av den flytende nitrogenlagringstanken. Cellene blir overført i glass-spinnerkolber og dyrket i et hydrogenkarbonat-bufret medium i en fuktet CO₂-inkubator. Typiske serumfri medier anvendt for inoculumfremstillingen og fermenteringen er beskrevet i europeisk patentsøknad 513 738, til Koch publisert 12. juni 1992 eller WO 96/35718, til Burg publisert 14. november 1996, inneholder for eksempel som medium DMEM/F12 (f.eks. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, order No. 57-736) og i tillegg natriumhydrogenkarbonat, L+glutamin, D+glukose, rekombinant insulin, natriumselenitt, diaminobutan, hydrokortison, jern(II)sulfat, asparagin, asparaginsyre, serin og en stabilisator for pattedyrceller så som f.eks. polyvinylalkohol, metylcellulose, polydekstran, polyetylglykol, Pluronic F68, plasma ekspander-polygelin (HEMACCEL[®]) eller polyvinylpyrrolidon (WO 25 96/35718).

30

Kulturene blir mikroskopisk kontrollert for fravær av forurensende mikroorganismer og celledensitetene blir bestemt. Disse tester blir utført ved hvert spaltningstrinn.

Etter den innledende vekstperiode blir cellekulturen fortynnet med friskt medium til startcelledensiteten og gjennomgår en ny vekstcyklus. Denne prosedyren blir gjentatt inntil et kulturvolum på omtrent 2 l pr. glass "spinner kolbe" er oppnådd. Etter ca. 12 dobling 1 til 5 liter er denne kultur tilgjengelig, som deretter blir anvendt som inoculum for 10 l inoculumfermenteren.

35

Etter 3 - 5 dager kan kulturen i 10 l fermentoren anvendes som inoculum for 100 l inoculum-fermentoren.

5 Etter ytterligere 3 - 5 dager dyrking kan kulturen i 100 l fermenteren anvendes som inoculum for 1000 l produksjonsfermenteren.

b) Høsting og celleseparering

10 En satsvis gjenvinningsprosess blir anvendt, dvs. når den ønskede celledensitet blir oppnådd, blir ca. 80 % av kulturen høstet. Den gjenværende kultur er oppfylt med frisk dyrkningsmedium og dyrket inntil neste høsting. Én produksjonskjøring består av maksimum 10 påfølgende høstinger: 9 partielle høstinger og 1 total høsting ved slutten av fermenteringen. Høsting finner sted hver 3 - 4 dager.

15 Det bestemte høstevolum blir overført i et avkjølt kar. Cellene fjernes ved sentrifugering eller filtrering og kastes. Den EPO inneholdende supernatant fra sentrifugeringstrinnet blir in-line-filtrert og oppsamlet i et andre avkjølt kar. Hver høsting behandles separat under rensningen.

20 En typisk prosess for rensingen av EPO-protein er beskrevet i WO 96/35718, til Burg publisert 14. november 1996. Renseprosessen er forklart i det følgende.

a) Blå Sepharose-kromatografi

25 Blue Sepharose (Pharmacia) består av Sepharose-kuler til hvis overflate Cibacron blått fargestoff er kovalent bundet. Siden EPO binder sterkere til Blue Sepharose enn de fleste ikke-proteinaktige forurensninger, kan noen proteinaktige urenheter og PVA, EPO bli anrikt i dette trinnet. Elueringen av Blue Sepharose kolonnen blir utført ved økende saltkonsentrasjon så vel som pH.

30 Kolonnen blir fylt med 80 - 100 l av Blå Sepharose, regenerert med NaOH og ekvibrert med ekvibreringsbuffer (natrium/kalsiumklorid og natriumacetat). Den surgjorte og filtrerte fermentorsupernatant påsettes. Etter at påsettingen er ferdig blir kolonnen vasket
35 først med en lignende buffer til ekvibreringsbufferen inneholdende en høyere natriumklorid-

konsentrasjon og deretter med en Tris-base-buffer. Produktet blir eluert med en Tris-base-buffer og oppsamlet i en enkel fraksjon i henhold til master-elueringsprofilen.

b) Butyl-Toyopearl-kromatografi

5

Butyl Toyopearl 650 C (Toso Haas) er en polystyrenbasert matriks til hvilken alifatiske butylrester er koblet kovalent. Siden EPO binder sterkere til denne gel enn mesteparten av urenheterne og PVA, må den elueres med en buffer inneholdende isopropanol.

10

Kolonnen blir pakket med 30 - 40 l Butyl Toyopearl 650 C, regenerert med NaOH, vasket med en Tris-base buffer og ekvilibrert med en Tris-base buffer inneholdende isopropanol.

15

Blue Sepharose-eluat blir regulert til konsentrasjonen av isopropanol i kolonne-ekvilibreringsbufferen og satt på kolonnen. Deretter blir kolonnen vasket med ekvilibreringsbuffer med øket isopropanol konsentrasjon. Produktet blir eluert med elueringsbuffer (Tris-base-buffer med høyt isopropanolinnhold) og oppsamlet i en enkel fraksjon i henhold til master-elueringsprofilen.

20

c) Hydroksyapatit Ultrogelkromatografi

25

Hydroksyapatit-Ultrogel (Biosepra) består av hydroksyapatit som er innbygget i en agarose-matriks for å forbedre de mekaniske egenskaper. EPO har en lav affinitet til hydroksyapatit og kan derfor elueres ved at lavere fosfatkonsentrasjoner enn protein-urenheter.

Kolonnen blir fylt med 30 - 40 l Hydroksyapatite Ultrogel og regenerert med en kaliumfosfat/kalsiumklorid-buffer og NaOH fulgt av en Tris-base-buffer. Deretter blir den ekvilibrert med en Tris-base buffer inneholdende en liten mengde av isopropanol og natriumklorid.

30

Det EPO-holdige eluat fra Butyl Toyopearl-kromatografien settes på kolonnen. Deretter blir kolonnen vasket med ekvilibreringsbuffer og en Tris-base-buffer uten isopropanol og natriumklorid. Produktet blir eluert med en Tris-base-buffer inneholdende en lav konsentrasjon av kaliumfosfat og oppsamlet i en enkel fraksjon i henhold til master-elueringsprofilen.

35

d) Reversfase HPLC på Vydac C4

RP-HPLC-materialet Vydac C4 (Vydac) består av silikagelpartikler, hvis overflater bærer C4-alkylkjeder. Separering av EPO fra proteinaktige urenheter er basert på forskjeller i styrken av hydrofobe interaksjoner. Eluering blir utført med en acetonitril- gradient i

5 fortynnet trifluoreddiksyre.

Preparativ HPLC blir utført ved anvendelse av en rustfritt stålkolonne (fylt med 2,8 til 3,2 liter Vydac C4 silikagel). Hydroksyapatit Ultrogel-eluatet blir surgjort ved tilsetning av trifluor-eddiksyre og satt på Vydac C4 kolonnen. For vasking og eluering blir en acetonitril-

10 gradient i fortynnet trifluoreddiksyre anvendt. Fraksjoner blir oppsamlet og umiddelbart nøytralisert med fosfatbuffer. EPO fraksjonene som ligger innenfor IPC grensene blir samlet.

e) DEAE Sepharose-kromatografi

15 DEAE Sepharose (Pharmacia) materialet består av dietylamoetyl (DEAE) - grupper som er kovalent bundet til overflaten av Sepharose-kuler. Bindingen av EPO til DEAE gruppene blir mediert av ioniske interaksjoner. Acetonitril og trifluoreddiksyre går gjennom kolonnen uten å bli holdt tilbake. Etter at disse substanser er vasket ut, fjernes spor av urenheter ved vasking av kolonnen med acetat-buffer ved en lav pH. Deretter blir kolonnen

20 vasket med nøytral fosfatbuffer og EPO blir eluert med en buffer med øket ionestyrke.

Kolonnen blir pakket med DEAE Sepharose fast flow. Kolonnevolumet blir regulert for å sikre en EPO belastning i området 3 - 10 mg EPO/ml gel. Kolonnen blir vasket med vann og ekvibreringsbuffer (natrium/ kaliumfosfat). De samlede fraksjoner av HPLC eluatet

25 påsettes og kolonnen blir vasket med ekvibreringsbuffer. Deretter blir kolonnen vasket med vaskebuffer (natriumacetat-buffer) fulgt av vasking med ekvibreringsbuffer. Deretter blir EPO eluert fra kolonnen med elueringsbuffer (natriumklorid, natrium/kaliumfosfat) og oppsamlet i en enkel fraksjon i henhold til master-elueringsprofilen.

30 Eluatet fra DEAE Sepharose-kolonnen blir regulert til den spesifiserte ledningsevne. Den resulterende medikamentsubstans blir sterilfiltrert i teflon-flasker og lagret ved -70°C .

EKSEMPEL 2: Pegylering av EPO med mPEG-SBA

EPO renses i henhold til den serumfrie prosedyre i Eksempel 1 (EPOsf) var homogen bestemt ved analytiske metoder og viste det typiske isoform-mønster bestående av 8 isoformer. Det hadde en spesifikk biologisk aktivitet på 190,000 IU/mg bestemt ved det normocytæmiske museforsøk. Pegyleringsreagenset som ble anvendt var en metoksy-PEG-SBA, hvilken er en forbindelse med formel II hvor R er metyl; x er 3; og m er fra 650 til 750 (gjennomsnitt ca. 680, tilsvarende til en gjennomsnittsmolekylvekt på ca. 30 kDa).

10 Pegyleringsreaksjon

Til ett hundre milligram EPOsf (9,71 ml av en 10,3 mg/ml EPOsf stamløsning, 5,48 μ mol) ble 10 ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer, pH, 7,5 inneholdende 506 mg 30kDa metoksy-PEG-SBA (16,5 μ mol) (fra Shearwater Polymerer, Inc., Huntsville, Alabama) satt og blandet i 2 timer ved romtemperatur (20-23 °C). Den endelige proteinkonsentrasjon var 5 mg/ml og protein:PEG reagens-forholdet var 1:3. Etter to timer ble reaksjonen stanset ved å regulere pH til 4,5 med iseddik og lagret ved -20°C inntil klar for rensning.

Rensning

20

1. **Konjugatblanding:** Omtrent 28 ml SP-SEPHAROSE FF (sulfo-propyl kationbytterharpiks) ble pakket i en AMICON glasskolonne (2,2 x 7,5 cm) og ekvilibrert med 20 mM acetatbuffer pH, 4,5 ved en strømningshastighet på 150 ml/h. Seks milliliter av reaksjonsblandingen inneholdende 30 mg protein ble fortynnet 5 ganger med ekvibreringsbufferen og satt på kolonnen. Ikke-adsorberte materialer ble vasket vekk med bufferen og den adsorberte PEG-konjugatblanding ble eluert fra kolonnen med 0,175 M NaCl i ekvibreringsbufferen. Umodifisert EPOsf forsatt gjenværende på kolonnen ble eluert med 750 mM NaCl. Kolonnen ble reekvilibrert i startbufferen. Prøver ble analysert ved SDS-PAGE og deres pegyleringsgrad ble bestemt. Det ble funnet at 0,175M NaCl-eluatet inneholdt mono- så vel som di- og spor av mengder av de tri-pegylerte forbindelser, mens 750 mM NaCl-eluatet inneholdt umodifisert EPOsf.

30

2. **Di-PEG og Mono-PEG-EPOsf:** Den rensede konjugatblanding eluert fra kolonnen i foregående trinn ble fortynnet 4 ganger med bufferen og satt på kolonnen på nytt og

vasket som beskrevet. Di-PEG-EPOsf og mono-PEG-EPOsf ble separat eluert fra kolonnen med henholdsvis 0,1M NaCl og 0,175 M NaCl. Eluering ble også utført med 750mM NaCl for å eluere eventuelt gjenværende umodifisert EPOsf.

5 Alternativt ble reaksjonsblandingen fortennet 5 ganger med acetatbufferen og satt på SP-Sepharose-kolonnen (~0,5 mg protein/ml gel). Kolonnen ble vasket og adsorbent mono-PEG-EPOsf, di-PEG-EPOsf og umodifisert EPOsf ble eluert som beskrevet i det forutgående avsnitt.

10 Resultater

PEG-EPOsf ble syntetisert ved kjemisk konjugering av et lineært PEG molekyl med en tallgjennomsnittsmolekylvekt på 30 kDa. PEG-EPOsf ble derivatisert fra reaksjonen mellom de primære aminogrupeer av EPOsf og suksinimidylesterderivatet av en 30 kDa PEG-smørsyre, hvilket resulterer i en amidbinding.

Resultatene er oppsummert i Tabell 1. Renset konjugatblanding omfattet mono- og di-PEG-EPOsf og var fri for umodifisert EPOsf bestemt ved SDS-PAGE-analyse. Konjugatblanding utgjorde 23,4 mg eller 78% av utgangsmaterialet. Kationbytter- kromatografisk separering av mono- og di-PEG-EPOsf viste at mono- til di-PEG forhold i konjugatblandingen var nesten 1:1. Etter avslutning av reaksjonen var forholdet av de individuelle komponenter av Mono: Di: Umofisert 40: 38: 20 (%). Totalutbytte var nesten kvantitativt.

Tabell 1. Sammenfatning av resultater av EPOsf pegylering

25

Prøve	Protein (mg)	Utbytte (%)
Rxn. Mix.	30	100
Mono-	12,0	40
Di-	11,4	38
Umod.	6,0	20
30 Konju. Mix.	23,4	78

EKSEMPEL 3: Pegylering av EPO med mPEG-SPA

En forskjellig alikvot av EPOsf anvendt i Eksempel 2 ble omsatt med 30 kDa metoksy-PEG-SPA (Shearwater Polymerer, Inc., Huntsville, Alabama). Reaksjon ble utført ved et protein:reagens-forhold på 1:2 og renseteknikker var i henhold til Eksempel 2. Primært ble de mono-pegylerte forbindelser produsert.

EKSEMPEL 4: In-vivo aktivitet av pegylert EPO bestemt ved det normocytaemiske museforsøk

10

Den normocytaemiske musebioanalyse er kjent på området (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) og en metode i monografien om erythropoietin fra Ph. Eur. BRP. Prøvene ble fortynnet med BSA-PBS. Normale friske mus, 7-15 uker gamle, ble administrert s.c. 0,2 ml av det EPO-fraksjonsholdige ikke-pegylerte EPO eller tri-, di- eller mono-pegylerte EPO fra Eksempel 2 eller 3. Over en periode på 6 dager, ble blod tappet ved punktur av halevenen og fortynnet slik at 1 µl blod var tilstede i 1 ml av 0,15 µmol acridin-oransje fargeløsning. Fargetiden var 3 til 10 minutter. Reticulocyt- tellinger ble utført mikrofluorimetrisk i et strømningscytometer ved analyse av det røde fluorescenshistogram. Reticulocyt-tellingene ble gitt uttrykt som absolutte tall (pr. 30 000 blodceller analysert). For de presenterte data besto hver gruppe av 5 mus pr. dag og musene ble blodtappet bare én gang.

20

I separate eksperimenter ble en enkel dose av umodifisert EPO (25 ng EPO), PEG(SBA)-EPO blandingen fra Eksempel 2 (10 ng av konjugat), mono- og di- pegylerte EPOs fra Eksempel 2 (10 ng av konjugat), PEG(SPA)-EPO fra Eksempel 3 (10 ng av konjugat) og bufferløsning administrert til mus. Resultatene er vist i Tabell 2. Resultatene viser den overlegne aktivitet og den forlengete halveringstid for de pegylerte EPO forbindelser angitt ved de betydelig økete mengder av reticulocytter og forskyvningen av reticulocyt-tellingsmaksimum ved anvendelse av samme dose pr. mus (10 ng), sammenlignet med en dose av 25 ng for umodifisert EPO.

30

35

TABELL 2

	EPO (Umodifisert)	30 kDa SPA PEG	Mono 30K SBA	Di 30K SBA	PEG-EPO SBA Konjugat - blanding	Kontroll -buffer
72 h	1000	1393	1411	994	1328	857
96 h	500	1406	1501	926	1338	697
120 h	~200	1100	1182	791	944	701
144 h	~0	535	607	665	660	708

5 EKSEMPEL 5: Fremstilling av dominerende mono-PEG-EPO

Pegyleringsreaksjon

Ved å starte med 100 mg (5,48 μ mol) EPOsf i 100 mM kaliumfosfatbuffer pH 7,5, fremstilt i henhold til Eksempel 1, ble det tilsatt 329 mg (10,96 μ mol) 30 kDa PEG-SBE reagens oppløst i 3 ml 1 mM HCl. Nok 100 mM kaliumfosfatbuffer pH 7,5 ble tilsatt til å justere reaksjonsblandingsvolumet til 20 ml. Den endelige proteinkonsentrasjon var 5 mg/ml og protein : PEG-reagensforholdet var 1:2. Reaksjonsblandingen ble blandet i 2 timer ved omgivelsestemperatur (20 - 22°C). Etter 2 timer ble reaksjonen stanset ved å regulere pH til 4,5 med iseddik og lagret frosset ved -20°C inntil den var klar for rensning.

Rensning

Reaksjonsblandingen fra foregående trinn ble fortynnet 1:5 med 10 mM natriumacetat, pH 4,5 og satt på 300 ml SP-Sepharose FF (sulfopropyl-kationbytterharpiks) pakket i en 4,2 x 19 cm kolonne. Kolonnen var forut ekvilibrert med samme buffer. Kolonne-effluenter ble overvåket ved 280 nm med en Gilson UV monitor og registrert med en "Kipp and Zonen recorder". Kolonnen ble vasket med 300 ml eller 1 sjikt volum ekvilibreringsbuffer for å fjerne overskudd av reagenser, reaksjonsbiprodukter og oligomere PEG-EPO. Det ble fulgt av vasking med 2 sjikt volumer av 100 mM NaCl for å fjerne di-PEG-EPO. Mono-PEG-EPO ble deretter eluert med 200 mM NaCl. I løpet av elueringen av mono-PEG-EPO ble den første 50 ml proteintoppen kastet, og mono-PEG-EPO ble oppsamlet som en 150 ml fraksjon.

Umodifisert EPOsf gjenværende på kolonnen ble eluert med 750 mM NaCl. Alle eluerings-
buffere ble laget i ekvibreringsbufferen. Alle eluerte prøver ble analysert ved SDS-PAGE og
ved høy-ytelse størrelsesekskluderings-kromatografi (SEC). Mono-PEG-EPO samlingen
5 oppnådd fra 150 ml-fraksjonen, som ikke hadde noe detekterbart umodifisert EPOsf, ble
deretter inndampet til ~ 4,5 – 7,5 mg/ml og diafiltrert i lagringsbufferen, 10 mM kaliumfosfat,
100 mM NaCl , pH 7,5. Konsentrasjon/diafiltrering ble utført med Millipore Labscale™ TFF
System utstyrt med 50 kDa "cut off" Millipore Pellicon XL Biomaks 50 membran ved
omgivelsestemperatur. Konsentrert mono-PEG-EPO ble sterilfiltrert og lagret frosset ved
-20°C.

10

Omtrent 75% av EPOsf var pegylert. Etter rensning var totalutbyttet ~30% mono-PEG-
EPO uten detekterbart umodifisert EPOsf og rundt 25% di-PEG-EPO. Oligomerer og
upegylert EPOsf utgjorde det gjenværende protein. Mono-PEG-EPO-samlingen oppnådd fra
150 ml-fraksjonen inneholdt omtrent 90% mono-PEG-EPO og omtrent 10% di-PEG-EPO.

15

SEKVENSLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

5 (i) APPLICANT:

- (A) NAME: F.Hoffmann-La Roche AG
 (B) STREET: 124 Grenzacherstrasse
 (C) CITY: Basle
 (E) COUNTRY: Switzerland
 10 (F) POSTAL CODE (ZIP): CH-4070
 (G) TELEPHONE: (61) 688 11 11
 (H) TELEFAX: (61) 688 13 95
 (I) TELEX: 962 292 hlr ch

15 (ii) TITLE OF INVENTION: Erythropoietin Conjugates

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- 20 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) OPERATING SYSTEM: WORD
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release 2.0

25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu

1

5

10

15

35

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His

20

25

30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe

40

35

40

45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 5 65 70 75 80

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

10 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

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

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

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 20 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

25

<210> 2
 <211> 166
 <212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15

35 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 40 35 40 45

Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu
 5 65 70 75 80

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

10 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu
 100 105 110

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

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

Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 20 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

25
 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 3
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
 1 5 10 15

35 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 20 25

Patentkrav

1. Konjugat, karakterisert ved at konjugatet omfatter et erythropoietin-glykoprotein som har minst én fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet
 5 hvilken forårsaker at benmargceller øker produksjon av reticulocytter og røde blodceller og er valgt fra gruppen bestående av humant erythropoietin og humant erythropoietin modifisert ved addisjon av fra 1 til 6 glykosylerings seter eller en omleiring av minst ett glykosylerings sete; idet nevnte glykoprotein er kovalent bundet til "n" poly(etylen glykol) grupper med formelen



slik at -CO i hver poly(etylen glykol) gruppe danner en amidbinding med én av nevnte aminogru-
 15 pper; hvor

R er C₁-C₆-alkyl;

x er 2 eller 3;

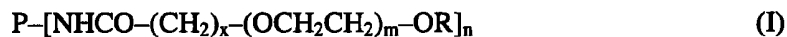
m er fra 450 til 900;

n er fra 1 til 3; og

n og m er valgt slik at molekylvekten til konjugatet minus erythropoietin-glykoproteinet er fra 20 kilodalton til 100 kilodalton.

20

2. Konjugat ifølge krav 1, karakterisert ved formelen:



25 hvor x, m, n og R er som definert i krav 1 og P er resten av glykoproteinet uten n aminogruppen(e) som danner amidbinding(er) med poly(etylen glykol)gruppen(e).

3. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at
 30 R er metyl.

4. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at m er fra ca. 650 til ca. 750.

5. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at n er 1.

6. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at R er metyl; m er fra ca. 650 til ca. 750; og n er 1.

7. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at det har formelen



10 hvor m er fra 650 til 750, n er 1 og P er som definert i krav 2.

8. Konjugat ifølge hvilket som helst av forutgående krav, karakterisert ved at glykoproteinet er et humant erytropoietin.

9. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, karakterisert ved at det humane erytropoietin-glykoprotein uttrykkes ved endogen gen-aktivering.

10. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 9, karakterisert ved at glykoproteinet har sekvensen SEKV ID NR:1.

11. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8, karakterisert ved at glykoproteinet har sekvensen av humant erytropoietin modifisert ved addisjon av fra 1 til 6 glykosyleringssteder.

12. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, karakterisert ved at glykoproteinet har sekvensen av humant erytropoietin modifisert ved en modifikasjon valgt fra gruppen bestående av:

Asn³⁰Thr³²;

Asn⁵¹Thr⁵³;

Asn⁵⁷Thr⁵⁹;

Asn⁶⁹;

Asn⁶⁹Thr⁷¹;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;

Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 5 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 10 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; og
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

15

13. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 12, karakterisert ved at glykoproteinet har en sekvens omfattende sekvensen til humant erytropoietin og en andre sekvens ved karboksyenden av den humane erytropoietin-sekvens, hvor den andre sekvens inneholder minst ett glykosyleringssete.

20

14. Konjugat ifølge krav 13, karakterisert ved at de andre sekvenser omfatter en sekvens avledet fra den karboksyterminale sekvens av humant chorionisk gonadotropin.

15. Konjugat ifølge krav 13, karakterisert ved at glykoproteinet har en sekvens valgt fra gruppen bestående av:

25

- (a) sekvensen til humant erytropoietin og sekvensen SEKV ID NR:3 på karboksyenden av den humane erytropoietin-sekvens;
- (b) sekvensen i (a) modifisert med Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰; og
- (c) sekvensen i (a) modifisert med Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰.

30

16. Konjugat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, karakterisert ved at glykoproteinet har sekvensen til humant erytropoietin modifisert ved en omleiring av minst ett glykosyleringssete.

17. Konjugat ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at omleiringen omfatter delesjon av hvilke som helst av de N-bundete glykosylerings seter i humant erythropoietin og addisjon av et N-bundet glykosylerings sete i stilling 88 av sekvensen til humant erythropoietin.

5 18. Konjugat ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at glykoproteinet har sekvensen til humant erythropoietin modifisert ved en modifikasjon valgt fra gruppen bestående av:

Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;

Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; og

Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

10

19. Preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter konjugater, idet hvert av nevnte konjugater omfatter et erythropoietin-glykoprotein som har minst én fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet som forårsaker at benmargceller øker produksjonen av reticulocytter og røde blodceller og er valgt fra gruppen bestående av humant erythropoietin og

15 humant erythropoietin modifisert ved addisjon av fra 1 til 6 glykosylerings seter eller en omleiring av minst ett glykosylerings sete; idet glykoproteinet i hvert nevnte konjugat er kovalent bundet til "n" poly(etylenglykol) grupper med formelen

$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ idet -CO i hver poly(etylenglykol)gruppe danner en amidbinding med én av nevnte aminogrupeer; hvor i hvert av nevnte konjugater R er C₁-C₄-alkyl;

20 x er 2 eller 3; m er fra 450 til 900; n er fra 1 til 3; n og m er valgt slik at molekylvekten til hvert konjugat minus erythropoietin-glykoproteinet er fra 20 kilodalton til 100 kilodalton; prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er minst nitti prosent.

20. Preparat omfattende konjugater som definert i hvilket som helst av kravene 1 til 18,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er minst nitti prosent.

21. Preparat ifølge kravene 19 eller 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er minst nittito prosent.

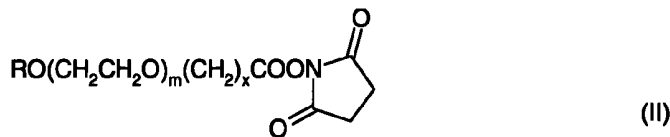
30 22. Preparat ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er minst nittiseks prosent.

23. Preparat ifølge krav 19 eller 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at prosentdelen av konjugater hvor n er 1 er fra nitti prosent til nittiseks prosent.

24. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et konjugat eller et preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23 og et farmasøytisk akseptabelt tilsetningsmiddel.

5 25. Anvendelse av et konjugat eller et preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23, for fremstilling av medikamenter for behandling eller forebygging av sykdommer korrelert med anemi hos kronisk nyresvikt-pasienter (CRF), AIDS og for behandling av kreftpasienter som gjennomgår kjemoterapi.

10 26. Fremgangsmåte for fremstilling av konjugater eller preparater ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter kondensering av forbindelsen med formel II



med et erythropoietin-glykoprotein og hvor R, m og x er som definert i
15 hvilket som helst av kravene 1 til 6.

27. Konjugater ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at de er for behandling av sykdommer som er forbundet med anemi hos kronisk nyresvikt-pasienter (CRF), AIDS og kreftpasienter som gjennomgår kjemoterapi.

20 28. Konjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at konjugatet omfatter et humant erythropoietin-glykoprotein som har misnt én fri aminogruppe og som har den *in vivo* biologiske aktivitet hvilken forårsaker at benmargsceller øker produksjon av reticulocytter og røde blodceller, idet nevnte glykoprotein er kovalent bundet til "n" poly(etylenglykol)grupper
25 med formelen



slik at -CO i hver poly(etylenglykol)gruppe danner en amidbinding med én av nevnte
30 aminogrupeer; hvor

R er metyl;

X er 3;

m er fra 650 til 750

5 n er 1; og

n og m er valgt slik at molekylvekten til konjugatet minus erytropoietin-glykoproteinet er omtrent 30 kilodalton.