



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

<b>DOMANDA NUMERO</b>	102000900858503
<b>Data Deposito</b>	30/06/2000
<b>Data Pubblicazione</b>	30/12/2001

<b>Priorità</b>	60/142.254
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Priorità</b>	60/150225
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Priorità</b>	60/151548
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Priorità</b>	60/166151
<b>Nazione Priorità</b>	US
<b>Data Deposito Priorità</b>	

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K		

Titolo

DERIVATI DELLA ERITROPOIETINA.

*DESCRIZIONE dell'invenzione industriale*

a nome: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.

di nazionalità: svizzera

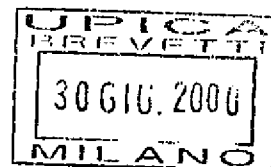
con sede in: BASILEA, SVIZZERA

MI 2000A001479

° = ° = °

Le eritropoiesi è la produzione di globuli rossi del sangue che avviene per compensare la distruzione delle cellule. La eritropoiesi è un meccanismo fisiologico controllato che fa sì che un numero sufficiente di globuli rossi del sangue sia disponibile per una opportuna ossigenazione dei tessuti. La eritropoietina umana che si trova in natura (hEPO) viene prodotta nel rene ed è il fattore del plasma umorale che stimola la produzione di globuli rossi del sangue (Carnot, P e 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, Fred, W e Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). La EPO che si trova in natura stimola la divisione e la differenziazione di progenitori eritroidi impegnati nel midollo osseo ed esercita la sua attività biologica mediante legame ai recettori sui precursori eritroidi (Krantz, BS (1991) Blood 77:419).

La eritropoietina è stata fabbricata mediante biosintesi impiegando la tecnologia del DNA ricombi-



nante (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72:213-224) ed è il prodotto di un gene EPO umano clonato inserito ed espresso nelle cellule del tessuto ovarico del criceto cinese (cellule CHO). La struttura primaria della forma predominante, completamente lavorata di hEPO viene illustrata in SEQ ID NO:1. Vi sono due ponti di disolfuro tra Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup> e Cys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>. Il peso molecolare della catena polipeptidica di EPO senza le porzioni di zucchero è 18.236 Da. Nella molecola di EPO intatta, per circa 40% del peso molecolare sono responsabili i gruppi di carboidrati che provocano la glicosilazione della proteina in siti di glicosilazione sulla proteina (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A e Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262:12059).

Poiché la eritropoietina umana è essenziale per la formazione dei globuli rossi del sangue, l'ormone è utile nel trattamento di disturbi del sangue, caratterizzati da una produzione scarsa oppure difettosa di globuli rossi. Clinicamente, la EPO viene usata nel trattamento di anemie in pazienti con insufficienza renale cronica (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, McGui-

re, T, Adamson, JW (1988) *Kidney Intl.* 33: 262, Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) *Ann. Intern. Med.* 110: 108-114) e in AIDS e in pazienti affetti da cancro sottoposti a chemioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI in: MB, Garnick, ed. *Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective*. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: pg. 301-324). Tuttavia, la biodisponibilità di prodotti terapeutici disponibili a base della proteina come EPO è limitata dalla loro breve semivita nel plasma e dalla loro sensibilità nei confronti di una degradazione da parte delle proteasi. Questi inconvenienti impediscono che tali prodotti terapeutici realizzino la loro massima attività clinica.

#### Riassunto dell'invenzione

Questa invenzione mette a disposizione un prodotto di coniugazione della eritropoietina, detto prodotto di coniugazione comprendendo una glicoproteina costituita da eritropoietina avente almeno un gruppo amminico libero ed avente attività biologica in vivo che fa sì che cellule del midollo osseo aumentino la produzione di reticulociti e di globuli rossi del sangue e scelta dal gruppo costituito da eritropoietina umana e suoi analoghi che hanno una sequenza della eritropoietina umana modificata me-

diante addizione di 1 fino a 6 siti di glicosilazione oppure mediante una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione, detta glicoproteina essendo collegata con legame covalente a 'n' gruppi di poli(etilen glicol) di formula  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ , il  $-\text{CO}$  (ossia il carbonile) di ciascun gruppo di poli(etilen glicol) formando un legame di ammidi con uno di detti gruppi amminici; in cui R è alchile inferiore; x è il numero 2 oppure 3; m è compreso tra circa 450 e circa 900; n è compreso tra 1 e 3; e n e m vengono scelti in modo che il peso molecolare del prodotto di coniugazione meno la glicoproteina costituita da eritropoietina sia compreso tra 20 chilodalton e 100 chilodalton. Questa invenzione inoltre mette a disposizione composizioni che contengono i prodotti di coniugazione qui descritti in cui la percentuale dei prodotti di coniugazione della composizione in cui n è 1, è almeno novanta per cento.

In confronto a EPO non modificata (ossia EPO senza un PEG collegato) e in confronto a prodotti di coniugazione PEG-EPO convenzionali, i prodotti di coniugazione della presente invenzione hanno una semivita di circolazione aumentata ed un tempo di permanenza nel plasma aumentato, un indice di depurazione diminuito ed una attività clinica in vivo aumentata.

I prodotti di coniugazione di questa invenzione hanno le medesime applicazioni della EPO. In particolare, i prodotti di questa invenzione sono utili per trattare pazienti mediante stimolazione della divisione e della differenziazione di progenitori eritroidi coinvolti nel midollo osseo nel medesimo modo in cui la EPO viene usata per trattare i pazienti.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione mette a disposizione prodotti di coniugazione, detti prodotti di coniugazione comprendendo una glicoproteina eritropoietina avente almeno un gruppo amminico libero e avente l'attività biologica in vivo che consiste nel far sì che le cellule del midollo osseo aumentino la produzione di reticulociti e di globuli rossi del sangue e scelta dal gruppo costituito da eritropoietina umana e suoi analoghi che hanno una sequenza della eritropoietina umana modificata mediante l'aggiunta di 1 fino a 6 siti di glicosilazione oppure mediante una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione; detta glicoproteina essendo legata con legame covalente a 'n' gruppi di poli(etilen glicol) di formula  $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ , il  $-CO$  (ossia carbonile) di ciascun gruppo di poli(etilen glicol) formando un legame di ammido con uno di detti gruppi amminici; in cui R è

alchile inferiore;  $x$  è il numero 2 oppure 3;  $m$  è compreso tra circa 450 e circa 900;  $n$  è compreso tra 1 e 3; e  $n$  e  $m$  vengono scelti in modo che il peso molecolare del prodotto di coniugazione meno la eritropoietina-glicoproteina sia compreso tra 20 chilodalton e 100 chilodalton.

Si è trovato che i prodotti di coniugazione della presente invenzione possono venire usati nel medesimo modo in cui viene usata la EPO non modificata. Tuttavia, i prodotti di coniugazione di questa invenzione hanno una semivita di circolazione aumentata ed un tempo di permanenza nel plasma aumentato, una clearance diminuita, e un'attività clinica in vivo aumentata. A causa di queste proprietà migliorate, i prodotti di coniugazione di questa invenzione possono venire somministrati una volta alla settimana invece di tre volte alla settimana per una EPO non modificata. Si prevede che una frequenza diminuita di somministrazione dia come risultato una migliorata accettabilità da parte del paziente che porta a risultati di trattamento migliorati e anche ad una migliorata qualità di vita del paziente. In confronto ai prodotti di coniugazione della EPO convenzionali, collegata a poli(etilen glicol) si è trovato che i prodotti di coniugazione aventi il peso molecolare e la struttura

di linker dei prodotti di coniugazione di questa invenzione hanno un profilo migliorato di potenza, stabilità, AUC, semivita di circolazione e costo.

I prodotti di coniugazione secondo questa invenzione possono venire somministrati in una quantità efficace dal punto di vista terapeutico a pazienti nel medesimo modo in cui viene somministrata la EPO. La quantità efficace dal punto di vista terapeutico è quella quantità di prodotto di coniugazione necessaria affinché l'attività biologica in vivo faccia sì che le cellule del midollo osseo aumentino la produzione di reticulociti e di globuli rossi. L'esatta quantità del prodotto di coniugazione è una questione di preferenza soggetta a fattori come l'esatto tipo della condizione da trattare, la condizione del paziente che viene trattato e anche gli altri ingredienti presenti nella composizione. Per esempio, da 0,01 fino a 10  $\mu\text{g}$  per kg di peso corporeo, preferibilmente da 0,1 fino a 1  $\mu\text{g}$  per kg di peso corporeo possono venire somministrati per esempio una volta alla settimana.

Le composizioni farmaceutiche che contengono il prodotto di coniugazione possono venire formulate con una concentrazione efficace per la somministrazione mediante diversi metodi ad un paziente umano che è



affetto da disturbi del sangue, caratterizzati da una produzione di globuli rossi scarsa oppure difettosa. Quantità medie efficaci dal punto di vista terapeutico del prodotto di coniugazione possono variare e in particolare devono essere basate sulle indicazioni e sulla prescrizione di un medico qualificato.

I prodotti della glicoproteina costituita da eritropoietina preparati secondo questa invenzione possono venire trasformati in composizioni farmaceutiche adatte per uso iniettabile con una sostanza di supporto o sostanza veicolo farmaceuticamente accettabile mediante metodi noti nel settore. Per esempio, opportune composizioni sono state descritte in WO 97/09996, WO97/40850, WO98/58660 e WO99/07401. Tra le sostanze-veicolo farmaceuticamente accettabili, preferite per la formulazione dei prodotti dell'invenzione vi sono albumina di siero umano, proteine del plasma umano, ecc. I composti della presente invenzione possono venire formulati in un tampone di fosfato di sodio/potassio 10 mM a pH 7 contenenti un agente che conferisce tonicità, per esempio cloruro di sodio 132 mM. Eventualmente, la composizione farmaceutica può contenere una sostanza conservante. La composizione farmaceutica può contenere quantità differenti di eritropoietina, per esempio da 10 a

1000 µg/ml, per esempio 50 µg oppure 400 µg.

Il termine 'eritropoietina' oppure 'EPO' si riferisce ad una glicoproteina avente la sequenza di amminoacidi riportata in (SEQ ID NO: 1) oppure (SEQ ID NO: 2) oppure una sequenza di amminoacidi sostanzialmente omologa a queste le cui proprietà biologiche riguardano la stimolazione della produzione di globuli rossi del sangue e la stimolazione della suddivisione e della differenziazione di progenitori eritroidi destinati a questo scopo nel midollo osseo. Come vengono usate, queste espressioni comprendono quelle proteine modificate deliberatamente, per esempio mediante mutagenesi sito-diretta oppure mediante mutazioni accidentali. Questi termini comprendono quindi analoghi aventi da 1 a 6 ulteriori siti di glicosilazione, analoghi aventi almeno un ulteriore amminoacido in corrispondenza dell'estremità carbossi-terminale della glicoproteina in cui l'ulteriore amminoacido comprende almeno un sito di glicosilazione e analoghi aventi una sequenza di amminoacidi che comprende una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione. Questi termini comprendono eritropoietina umana sia naturale che prodotta mediante la tecnologia ricombinante.

I prodotti di coniugazione della eritropoietina

di questa invenzione possono essere rappresentati con la formula I:



in cui  $x$ ,  $m$ ,  $n$  e  $R$  hanno i significati indicati sopra. Nella formula I,  $P$  è il residuo di una glicoproteina costituita da eritropoietina qui descritta (ossia senza il gruppo amminico o i gruppi amminici che formano un legame di ammido con il gruppo carbonile mostrato nella formula I) avente l'attività biologica in vivo che fa sì che le cellule del midollo osseo facciano aumentare la produzione di reticulociti e di globuli rossi del sangue.

In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione,  $R$  è metile. Preferibilmente,  $m$  è compreso tra circa 650 e circa 750 e  $n$  preferibilmente è il numero 1.

Nella forma di realizzazione più preferita della presente invenzione,  $R$  è metile,  $m$  è compreso tra circa 650 e circa 750 e  $n$  è il numero 1 ossia il prodotto di coniugazione come definito sopra avente la formula



in cui  $m$  è compreso tra 650 e 750,  $n$  è il numero 1 e  $P$  è come definito sopra. Preferibilmente,  $m$  in media ha un valore di circa 680.

Preferibilmente, la glicoproteina dei prodotti di coniugazione come definiti sopra è una eritropoietina umana. La eritropoietina umana e proteine analoghe come definite sopra, possono venire espresse mediante attivazione endogena di un gene. Glicoproteine costituite da eritropoietine umane preferite sono quelle del SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, nel modo più preferibile quelle di SEQ ID NO: 1.

Inoltre, P può venire scelta dal gruppo costituito da residui di eritropoietina umana e suoi analoghi aventi da 1 fino a 6 ulteriori siti per la glicosilazione. Come riportato dettagliatamente di seguito, la preparazione e la purificazione di EPO sono ben note nel settore. Per EPO si intende la proteina naturale oppure ricombinante preferibilmente umana come viene ottenuta da qualsiasi origine convenzionale come tessuti, sintesi delle proteine, coltura di cellule con cellule naturali oppure ricombinanti. Viene compresa qualsiasi proteina avente l'attività di EPO come muteine oppure proteine altrimenti modificate. EPO ricombinante può venire preparata tramite l'espressione in linee di cellule CHO-, BHK- o HeLa, mediante la tecnologia del DNA ricombinante oppure mediante attivazione di un gene endogeno. L'espressione di proteine, ivi compresa, EPO, median-

te attivazione di un gene endogeno, è ben nota nel settore e viene descritta per esempio nei brevetti US 5.733.761, 5.641.670, e 5.733.746 e nelle pubblicazioni di brevetti internazionali NO. WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 e WO 90/09955, i contenuti di ciascuno dei quali vengono qui incorporati come riferimento. La specie EPO preferita per la preparazione di prodotti costituiti da eritropoietina-glicoproteine sono le specie di EPO umane. Più preferibilmente, la specie EPO è la EPO umana avente la sequenza degli amminoacidi riportata in SEQ ID NO: 1 oppure SEQ ID NO: 2, più preferibilmente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO: 1.

In una forma di realizzazione, P può essere il residuo di un analogo di glicoproteina avente da 1 a 6 ulteriori siti per la glicosilazione. La glicosilazione di una proteina con uno o più gruppi di oligosaccaridi, avviene in corrispondenza di posizioni specifiche lungo lo scheletro del polipeptide ed influisce notevolmente sulle proprietà fisiche della proteina come stabilità della proteina, secrezione, localizzazione subcellulare e attività biologica. La glicosilazione usualmente è di due tipi. Gli oligosaccaridi O-collegati sono collegati a residui della serina oppure della treonina e gli oligosaccaridi N-

collegati sono collegati a residui della asparagina. Un tipo di oligosaccaride che è stato trovato sia N-collegato che O-collegato è l'acido N-acetilneuraminico (acido sialico), che costituisce un gruppo di ammino zuccheri contenenti 9 o più atomi di carbonio. L'acido sialico usualmente è il residuo terminale su oligosaccaridi sia N-collegati che O-collegati e poiché esso porta una carica negativa, conferisce proprietà acide alla glicoproteina. La eritropoietina umana, avente 165 amminoacidi, contiene tre catene di oligosaccaridi N-collegate ed una catena di oligosaccaride O-collegata che rappresenta circa il 40% del peso molecolare totale della glicoproteina. La glicosilazione N-collegata avviene in corrispondenza dei residui di asparagina situati nelle posizioni 24, 38 e 83 e la glicosilazione O-collegata avviene in corrispondenza di un residuo della serina situato nella posizione 126. Le catene di oligosaccaridi sono modificate con residui terminali di acido sialico. L'allontanamento enzimatico di tutti i residui di acido sialico dalla eritropoietina glicosilata porta come risultato alla perdita di attività in vivo ma non di attività in vitro, poiché la sialilazione della eritropoietina impedisce il suo legame e la sua successiva clearance da parte di una

proteina di legame epatica.

Le glicoproteine della presente invenzione comprendono analoghi di eritropoietina umana con uno o più cambiamenti nella sequenza degli amminoacidi della eritropoietina umana i quali danno come risultato un aumento nel numero di siti per il collegamento dell'acido sialico. Questi analoghi di glicoproteina possono venire generati mediante mutagenesi sito-diretta che provoca addizioni, delezioni oppure sostituzioni di residui di amminoacidi che fanno aumentare oppure alterano siti che sono disponibili per la glicosilazione. Gli analoghi della glicoproteina che hanno livelli di acido sialico maggiori di quelli che si trovano nella eritropoietina umana vengono generati mediante addizione di siti di glicosilazione che non disturbano la conformazione secondaria oppure terziaria richiesta per l'attività biologica. Le glicoproteine della presente invenzione comprendono inoltre analoghi che hanno aumentati livelli di un collegamento di carboidrati in corrispondenza di un sito di glicosilazione che di solito comportano la sostituzione di uno o più amminoacidi in stretta vicinanza rispetto ad un sito N-collegato oppure O-collegato. Le glicoproteine della presente invenzione comprendono inoltre analoghi che hanno uno o più am-

minoacidi che si estendono dall'estremità carbossi-terminali della eritropoietina e che forniscono almeno un ulteriore sito per i carboidrati. Le glicoproteine della presente invenzione comprendono inoltre analoghi aventi una sequenza di amminoacidi che comprende una trasposizione di almeno un sito per la glicosilazione. Una tale trasposizione di un sito di glicosilazione comporta la delezione di uno o più siti di glicosilazione in una eritropoietina umana e l'addizione di uno o più siti di glicosilazione che non si trovano nella eritropoietina naturale. L'aumento nel numero delle catene di carboidrati sulla eritropoietina e pertanto del numero di acidi sialici per molecole di eritropoietina possono conferire proprietà vantaggiose come una aumentata solubilità, una maggiore resistenza nei confronti di una proteolisi, un potere immunogeno diminuito, una semivita nel siero aumentata ed una aumentata attività biologica. Gli analoghi della eritropoietina con ulteriori siti di glicosilazione vengono descritti più dettagliatamente nella domanda di brevetto europeo 640.619 a nome di Elliot, pubblicata il 1 marzo 1995.

In una forma di realizzazione preferita, le glicoproteine della presente invenzione contengono una sequenza di amminoacidi che comprende almeno un ulte-



riore sito per la glicosilazione come, però senza essere limitati a questi, eritropoietine che contengono la sequenza della eritropoietina umana modificata mediante una modificazione scelta tra le seguenti:

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;  
Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;  
Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;  
Asn<sup>69</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>102</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
Thr<sup>125</sup>; e  
Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

L'indicazione qui usata per la modificazione della sequenza degli amminoacidi sta ad indicare che

la posizione (le posizioni) della corrispondente proteina non modificata (per esempio hEPO di SEQ ID NO: 1 oppure SEQ ID NO: 2) indicata dal numero scritto sopra (dai numeri scritti sopra) è cambiata rispetto all'amminoacido (agli amminoacidi) che immediatamente precedono il rispettivo numero scritto sopra (i rispettivi numeri scritti sopra).

La glicoproteina inoltre può essere un analogo avente almeno un ulteriore amminoacido in corrispondenza dell'estremità carbossi-terminale della glicoproteina, in cui l'ulteriore amminoacido comprende almeno un sito di glicosilazione, ossia il prodotto di coniugazione come definito sopra riguarda inoltre un composto in cui la glicoproteina ha una sequenza che comprende la sequenza della eritropoietina umana ed una seconda sequenza in corrispondenza del terminale carbossile della sequenza della eritropoietina umana in cui la seconda sequenza contiene almeno un sito di glicosilazione. L'ulteriore amminoacido può essere costituito da un frammento di un peptide derivato dall'estremità carbossiterminale di una gonadotropina corionica umana. Preferibilmente, la glicoproteina è un analogo scelto dal gruppo costituito da (a) eritropoietina umana avente la sequenza di amminoacidi 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 (SEQ ID NO: 3), che si estende dal  
terminale carbossile, (b) l'analogo in (a) che com-  
prende inoltre Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO; e (c) l'analogo  
in (a) che comprende inoltra Asn<sup>30</sup> Thr<sup>32</sup> Val<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup>  
Thr<sup>90</sup> EPO.

La glicoproteina può essere anche un analogo  
avente una sequenza di amminoacidi che comprende una  
trasposizione di almeno un sito per la glicosilazio-  
ne. La trasposizione può comprendere una delezione di  
uno qualsiasi dei siti di carboidrati N-collegati  
della eritropoietina umana ed una addizione di un si-  
to di carboidrato N-collegato in corrispondenza della  
posizione 88 della sequenza degli amminoacidi della  
eritropoietina umana. Preferibilmente, la glicopro-  
teina è un analogo scelto dal gruppo costituito da  
Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO; Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO; e  
Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup> EPO.

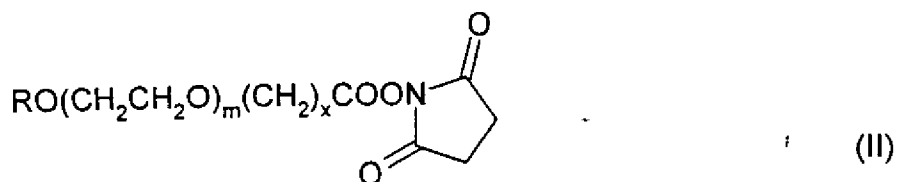
Come viene usato qui, il termine 'alchile infe-  
riore' indica un gruppo alchile lineare oppure rami-  
ficato avente da 1 a 6 atomi di carbonio. Esempi di  
gruppi alchilici inferiori comprendono metile, etile  
e isopropile. Secondo la presente invenzione, R è un  
qualsiasi alchile inferiore. Si preferiscono prodotti  
di coniugazione in cui R è metile.

Il simbolo 'm' rappresenta il numero di residui di ossido di etilene ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ) nel gruppo di poli(etilen ossido). Una singola sub-unità PEG di ossido di etilene ha un peso molecolare di circa 44 dalton. Così, il peso molecolare del prodotto di coniugazione (escludendo il peso molecolare della EPO) dipende dal numero 'm'. Nei prodotti di coniugazione di questa invenzione 'm' è compreso tra circa 450 e circa 900 (corrispondenti ad un peso molecolare di circa 20 kDa fino a circa 40 kDa), preferibilmente compreso tra circa 650 e circa 750 (corrispondente ad un peso molecolare di circa 30 kDa). Il numero m viene scelto in modo che il prodotto di coniugazione di questa invenzione ottenuto abbia una attività fisiologica paragonabile a quella della EPO non modificata, la quale attività può rappresentare la medesima attività oppure una attività superiore oppure una attività costituita da una frazione rispetto alla corrispondente attività della EPO non modificata. Un peso molecolare di 'circa' un certo numero sta ad indicare che esso è compreso entro un intervallo ragionevole di quel numero come viene determinato mediante tecniche analitiche convenzionali. Il numero 'm' viene scelto in modo che il peso molecolare di ciascun gruppo di poli(etilen glicol) collegato con legame covalente alla

glicoproteina di eritropoietina sia compreso tra circa 20 kDa fino a circa 40 kDa, e preferibilmente sia di circa 30 kDa.

Nei prodotti di coniugazione di questa invenzione, il numero 'n' è il numero di gruppi di polietilenglicol legati con legame covalente a gruppi amminici liberi (ivi compresi gruppi  $\epsilon$ -amminici di un amminoacido costituito da lisina e/o il gruppo amminico ammino-terminale) di una proteina costituita da eritropoietina tramite un legame di ammido (legami di ammido). Un prodotto di coniugazione di questa invenzione può avere uno, due oppure tre gruppi PEG per molecola di EPO. 'n' è un numero intero compreso tra 1 e 3, preferibilmente 'n' è il numero 1 oppure 2 e più preferibilmente 'n' è il numero 1.

Il composto di formula I può venire preparato dal composto polimero noto:



in cui R e m sono come descritti sopra, facendo condensare il composto di formula II con la glicoproteina eritropoietina. I composti di formula II, in cui x è il numero 3 sono alfa-inferiore alcolossi succinimmi-

dil esteri dell'acido butirrico del poli(etilen glicol) (inferiore alcossi-PEG-SBA). I composti di formula II, in cui x è il numero 2, sono alfa-inferiore alcossi succinimidil esteri con l'acido propionico del poli(etilen glicol) (inferiore alcossi-PEG-SPA). Si può utilizzare qualsiasi metodo di reazione di un estere attivato con una ammina per formare una ammido. Nella reazione descritta sopra, il succinimidil estere esemplificato è un gruppo scindibile che provoca la formazione della ammido. L'impiego di succinimidil esteri come i composti di formula II per produrre prodotti di coniugazione con proteine viene descritto nel brevetto US NO. 5.672.662, concesso il 30 settembre 1997 (Harris, et al.).

La EPO umana contiene nove gruppi amminici liberi, il gruppo amminico ammino-terminale più i gruppi  $\epsilon$ -amminici di 8 residui di lisina. Quando il reagente di peghilazione è stato combinato con un composto SBA di formula II, si è trovato che in corrispondenza di un pH di 7,5, di un rapporto proteina:PEG di 1,3 e di una temperatura di reazione di 20-25°C, si è ottenuta una miscela di specie mono-peghilate, di-peghilate e quantità in tracce della specie tri-peghilata. Quando il reagente di peghilazione era un composto SPA di formula II, in condizioni simili tranne che il rap-

porto proteina:PEG era 1:2, si produce prevalentemente la specie mono-peghilata. La EPO peghilata può venire somministrata sotto forma di una miscela oppure mediante cromatografia di scambio cationico può venire separata in differenti specie peghilate. Manipolando le condizioni di reazione (per esempio il rapporto tra i reagenti, il pH, la temperatura, la concentrazione di proteina, il tempo di reazione, ecc.), si possono fare variare le relative quantità delle differenti specie peghilate.

La eritropoietina umana (EPO) è una glicoproteina umana che stimola la formazione degli eritrociti. La sua preparazione e la sua applicazione terapeutica vengono descritte dettagliatamente per esempio nei brevetti U.S. NI. 5.547.933 e 5.621.080, in 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 0 411 678 come pure Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, in Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. La eritropoietina per scopi terapeutici può venire prodotta mediante la tecnica ricombinante (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 e Wgrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224).

Metodi per l'espressione e la preparazione della

eritropoietina in un mezzo privo di siero vengono descritti per esempio in WO 96/35718, a nome di Burg, pubblicata il 14 novembre 1996, e nella pubblicazione del brevetto europeo NO. 513 738, a nome di Koch, pubblicato il 12 giugno 1992. Oltre alle pubblicazioni citate sopra, è noto che si può effettuare una fermentazione senza siero di cellule di CHO ricombinanti che contengono un gene EPO. Tali metodi vengono descritti per esempio in EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 e in forma generale da Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. e Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 6355, WO 88/00967.

In EP-A 0 267 678, vengono descritte una cromatografia di scambio ionico su sefarosio-S, una HPLC a fasi inverse preparativa su una colonna C<sub>8</sub> ed una cromatografia di filtrazione su gel per la purificazione di EPO prodotta in coltura priva di siero dopo dialisi. A questo riguardo, lo stadio di cromatografia di filtrazione su gel può venire sostituito con una cromatografia di scambio ionico su flusso rapido di S-sefarosio. E' stato anche proposto che si può effettuare una cromatografia con colorante su una co-



lonna di Blue Trisacryl prima della cromatografia di scambio ionico.

Un procedimento per la purificazione di EPO ricombinante viene descritto da Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359. Nel procedimento tuttavia, la EPO viene trattata con una soluzione di Tween® 20, fenilmetilsolfonil fluoruro, etilmaleimide, pepstatina A, solfato di rame e acido ossamico prima degli stadi di purificazione. Pubblicazioni, ivi compresi WO 96/35718, a nome di Burg pubblicato il 14 novembre 1996, descrivono un procedimento per la preparazione di eritropoietina in un processo di fermentazione senza siero (EPOsf).

L'attività specifica di EPO oppure di prodotti di coniugazione di EPO secondo questa invenzione può venire determinata mediante diversi saggi noti nel settore. L'attività biologica delle proteine EPO purificate di questa invenzione è tale che la somministrazione della proteina EPO mediante iniezione a pazienti umani, porta come risultato ad una produzione crescente di cellule del midollo osseo costituite da reticulociti e globuli rossi, in confronto a gruppi di soggetti non iniettati oppure di controllo. L'attività biologica della proteine EPO oppure di loro frammenti ottenuti e purificati secondo questa in-

venzione può venire esaminata mediante metodi secondo Annable, et al., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47:99-112 e Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2). Un altro saggio biologico per determinare l'attività della proteina EPO, il saggio su topo normocitemico, viene descritto nell'esempio 4.

La presente invenzione mette a disposizione la composizione costituita da prodotti di coniugazione descritti sopra. Una composizione che contiene almeno 90% di prodotti di coniugazione mono-PEG ossia in cui  $n$  è il numero 1, può venire preparata come indicato nell'esempio 5. Di solito, i prodotti di coniugazione mono-PEG di glicoproteine di eritropoietina sono desiderabili poiché esse tendono ad avere una attività maggiore rispetto ai prodotti di coniugazione di-PEG. La percentuale di prodotti di coniugazione mono-PEG e anche il rapporto tra mono-PEG e di-PEG può venire controllato mescolando frazioni più ampie attorno al picco di eluizione, in modo da fare diminuire la percentuale della frazione mono-PEG oppure di frazioni più ristrette per fare aumentare la percentuale di mono-PEG nella composizione. Una concentrazione di circa novanta per cento di prodotti di coniugazione mono-PEG rappresenta un buon equilibrio di resa e di attività. Qualche volta, possono essere desiderabili

composizioni nelle quali per esempio almeno novantadue percento, oppure almeno novantasei percento dei prodotti di coniugazione è costituito da specie mono-PEG ( $n = 1$ ). In una forma di realizzazione di questa invenzione, la percentuale dei prodotti di coniugazione in cui  $n$  è il numero 1, è compresa tra novanta percento e novantasei percento.

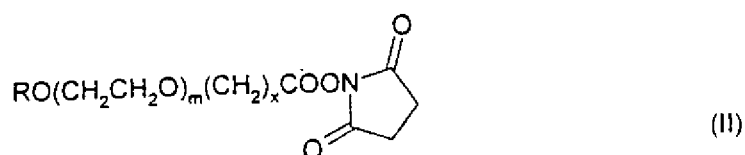
L'invenzione inoltre riguarda le corrispondenti composizioni farmaceutiche che contengono un prodotto di coniugazione oppure una composizione come descritte sopra ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

I prodotti di coniugazione e le composizioni della presente invenzione sono particolarmente utili per la preparazione di farmaci per il trattamento oppure la profilassi di malattie correlate con anemia in pazienti con insufficienza renale cronica (CRF), AIDS e per il trattamento di pazienti affetti da cancro che subiscono una chemioterapia.

Una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione riguarda un metodo per il trattamento profilattico e/o terapeutico di disturbi che comportano anemia in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (CRF), in pazienti affetti da AIDS e affetti da cancro che subiscono una chemioterapia, il

quale metodo comprende lo stadio di somministrazione ad un paziente di una composizione come descritta sopra.

Inoltre, l'invenzione riguarda un procedimento per la preparazione di composti come descritti sopra, il quale procedimento consiste nel fare condensare il composto di formula II



con una glicoproteina-eritropoietina in cui R, m e x sono come definiti sopra.

L'invenzione riguarda inoltre composti come definiti sopra per il trattamento di malattie che sono associate con anemia in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (CRF), in pazienti affetti da AIDS e affetti da cancro che subiscono una chemioterapia.

L'invenzione verrà meglio compresa riferendosi agli esempi che seguono che illustrano però non limitano l'invenzione qui descritta.

### ESEMPI

#### **Esempio 1: Fermentazione e purificazione di una EPO umana**

##### **a) Preparazione dell'inoculo e fermentazione**

Una fiala del Working Cell Bank, che deriva da

una linea di cellule di CHO che producono EPO (si può usare ATCC CRL8695, descritto in EP 411 678 (Genetics Institute)) viene prelevata dalla fase gassosa del serbatoio di conservazione con azoto liquido. Le cellule vengono trasferite in palloni a rotazione di vetro e vengono sottoposte a coltura in un mezzo tamponato con bicarbonato in un dispositivo di incubazione con CO<sub>2</sub> umidificato. Mezzi tipici privi di siero usati per la preparazione dell'inoculo e per la fermentazione vengono descritti nella domanda di brevetto europeo 513 738, a nome di Koch pubblicata il 12 giugno 1992 oppure in WO 96/35718 a nome di Burg pubblicato il 14 novembre 1996, contengono per esempio come mezzo DMEM/F12 (per esempio JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US NO. di ordine 57-736) e inoltre bicarbonato di sodio, L+glutamina, D+glucosio, insulina ricombinante, selenite di sodio, diamminobutano, idrocortisone, solfato di ferro(II), asparagina, acido aspartico, serina e uno stabilizzante per cellule di mammiferi, per esempio alcol polivinilico, metil cellulosa, polidestrano, polietilenglicol, Pluronic F68, un diluente del plasma Polygelin (HEMACCEL®) oppure polivinil pirrolidone (WO 96/35718).

Le colture vengono controllate al microscopio

per stabilire l'assenza di microrganismi contaminanti e si determinano le densità delle cellule. Queste prove vengono effettuate in corrispondenza di ciascun stadio di separazione.

Dopo il periodo iniziale di crescita, la coltura delle cellule viene diluita con un mezzo fresco fino alla densità delle cellule di partenza e subisce un altro ciclo di crescita. Questo procedimento viene ripetuto fino a che si è ottenuto un volume di coltura di circa 2 l per pallone ruotante di vetro. Dopo circa 12 raddoppiamenti, sono disponibili da 1 fino a 5 litri di questa coltura che quindi viene usata come inoculo per un fermentatore di inoculo da 10 litri.

Dopo 3-5 giorni, la coltura nel fermentatore da 10 l può venire usata come inoculo per un fermentatore da 100 l.

Dopo ulteriori 3-5 giorni di coltura, la coltura nel fermentatore da 100 l può venire usata come inoculo per un fermentatore di produzione da 1000 l.

#### **b) Raccolta e separazione delle cellule**

Si adotta un processo di rialimentazione di una carica ossia quando si raggiunge la densità desiderata delle cellule, si raccoglie circa 80% della coltura. La coltura rimanente viene integrata con un mezzo di coltura fresco e viene sottoposta a coltura fino

alla raccolta successiva. Un ciclo di produzione è costituito da un massimo di 10 successive raccolte: 9 raccolte parziali e 1 raccolta totale alla fine della fermentazione. La raccolta viene effettuata ogni 3-4 giorni.

Il volume raccolto determinato viene trasferito in un recipiente raffreddato. Le cellule vengono separate mediante centrifugazione oppure mediante filtrazione e vengono scartate. Il surnatante che contiene EPO dello stadio di centrifugazione viene filtrato in linea e viene raccolto in un secondo recipiente raffreddato. Ciascuna raccolta viene sottoposta a lavorazione separatamente durante la purificazione.

Un tipico procedimento per la purificazione di una proteina EPO viene descritto in WO 96/35718 a nome di Burg pubblicato il 14 novembre 1996. Il procedimento di purificazione viene spiegato di seguito.

**a) Cromatografia con blu di sefarosio**

Blu Sepharose (Pharmacia) è costituito da perline di sefarosio sulla superficie delle quali è collegato con legame covalente il colorante blu Cibacron. Poiché EPO si lega più fortemente al sefarosio blu rispetto alla massima parte dei contaminanti non proteici di alcune impurezze proteiche e di PVA, in que-

sto stadio si può arricchire la EPO. La eluizione della colonna di blu-sefariosio viene effettuata facendo aumentare la concentrazione di sale e anche il pH.

La colonna viene riempita con 80-100 l di Blu Sepharose, viene rigenerata con idrossido di sodio e viene equilibrata con un tampone di equilibratura (cloruro di sodio/cloruro di calcio e acetato di sodio). Si carica il surnatante del fermentatore acidificato e filtrato. Completato il carico, la colonna viene lavata dapprima con un tampone simile al tampone di equilibratura che contiene una maggiore concentrazione di cloruro di sodio e successivamente viene lavato con tampone tris-base. Il prodotto viene eluito con un tampone tris-base e viene raccolto in una singola frazione secondo il profilo di eluizione generale.

**b) Cromatografia su butyl Toyopearl**

Il Butyl Toyopearl 650 C (Toso Haas) è una matrice a base di polistirene con la quale sono copulati con legame covalente residui butilici alifatici. Poiché EPO si lega più fortemente a questo gel rispetto alla massima parte delle impurezze e di PVA, essa deve venire eluita con un tampone che contiene isopropanolo.



La colonna viene riempita con 30-40 l di Butyl Toyopearl 650 C, viene rigenerata con idrossido di sodio, viene lavata con tampone tris-base e viene equilibrata con un tampone tris-base contenente isopropanolo.

L'eluato da Blue Sepharose viene regolato ad una concentrazione di isopropanolo nel tampone di equilibratura della colonna e viene caricato sulla colonna. La colonna viene quindi lavata con un tampone di equilibratura con concentrazioni crescenti di isopropanolo. Il prodotto viene eluito con un tampone di eluizione (tampone tris-base con elevato contenuto in isopropanolo) e viene raccolto in una singola frazione secondo il profilo di eluizione generale.

### c) **Cromatografia su Hydroxyapatite Ultrogel**

Il Hydroxyapatite Ultrogel (Biosepra) è costituito da idrossiapatite che è incorporata in una matrice di agarosio per migliorare le proprietà meccaniche. La EPO ha una bassa affinità nei confronti della idrossiapatite e pertanto può venire eluita con concentrazioni minori di fosfato rispetto alle impurezze costituite da proteine.

La colonna viene riempita con 30-40 l di Hydroxyapatite Ultrogel e viene rigenerata con un tampone di fosfato di potassio/cloruro di calcio e idrossido

di sodio e quindi con tampone Tris-base. Quindi la colonna viene equilibrata con un tampone tris-base contenente una piccola quantità di isopropanolo e cloruro di sodio.

L'eluato contenente la EPO proveniente dalla cromatografia su Butyl Toyopearl viene caricato sulla colonna. Successivamente, la colonna viene lavata con un tampone di equilibratura e con un tampone tris-base senza isopropanolo e senza cloruro di sodio. Il prodotto viene eluito con tampone tris-base contenente una bassa concentrazione di fosfato di potassio e viene raccolta in una singola frazione secondo il profilo di eluizione generale.

**d) HPLC a fasi inverse su Vydac C4**

Il materiale per la RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) è costituito da particelle di gel di silice le cui superfici portano catene C4-alchiliche. La separazione di EPO dalle impurezze proteiche si basa sulla differenze nella forza di interazioni idrofobe. La eluizione viene effettuata con un gradiente di acetonitrile in acido trifluoroacetico diluito.

La HPLC preparativa viene effettuata impiegando una colonna di acciaio inossidabile (riempita con 2,8 fino a 3,2 litri di gel di silice Vydac C4). L'eluato proveniente dalla cromatografia con Hydroxyapatite

Ultrogel viene acidificato mediante aggiunta di acido trifluoroacetico e viene caricato sulla colonna di Vydac C4. Per il lavaggio e la eluizione si usa un gradiente di acetonitrile in acido trifluoroacetico diluito. Le frazioni vengono raccolte e vengono immediatamente neutralizzate con tampone fosfato. Le frazioni EPO che rientrano nei limiti IPC vengono riunite.

**e) Cromatografia su DEAE Sepharose**

Il materiale costituito da DEAE Sepharose (Pharmacia) è costituito da gruppi dietilamminoetilici (DEAE) che sono legati con legame covalente alla superficie di perline di sefarosio. Il legame di EPO con i gruppi DEAE è mediato da interazioni ioniche. Acetonitrile e acido trifluoroacetico passano attraverso la colonna senza venire trattieneuti. Dopo che queste sostanze sono state dilavate via, le impurezze in tracce vengono allontanate lavando la colonna con tampone acetato ad un basso pH. Quindi la colonna viene lavata con tampone di fosfato neutro e la EPO viene eluita con un tampone con una aumentata forza ionica.

La colonna viene riempita con DEAE Sepharose fast flow. Il volume della colonna viene regolato in modo da assicurare un carico di EPO compreso tra 3 e

10 mg di EPO/ml di gel. La colonna viene lavata con acqua e con tampone di equilibratura (fosfato di sodio/potassio). Le frazioni raccolte dall'eluato ottenuto mediante HPLC vengono caricate e la colonna viene lavata con tampone di equilibratura. Quindi la colonna viene lavata con un tampone di lavaggio (tampone di acetato di sodio) e quindi si effettua un lavaggio con un tampone di equilibratura. Successivamente, la EPO viene eluita dalla colonna con un tampone di eluizione (cloruro di sodio, fosfato di sodio/potassio) e viene raccolta in una singola frazione secondo il profilo di eluizione generale.

L'eluato della colonna di DEAE Sepharose viene regolato fino ad una conduttività specificata. La sostanza risultante viene filtrata sterilmente in flaconi di teflon e viene conservata a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Esempio 2: Peghilazione di EPO con mPEG-SBA**

EPO purificata secondo il procedimento in assenza di siero dell'esempio 1 (EPOsf) era omogenea come è stato determinato mediante metodi di analisi e presentava un tipico modello isoformico costituito da 8 isoforme. Essa aveva una attività biologica specifica di 190.000 UI/mg come determinato mediante il saggio su topi normocitemici. Il reagente di peghilazione usato era metossi-PEG-SBA che è un composto di formu-

la II, in cui R è metile; x è 3; e m è compreso tra 650 e 750 (media circa 680, corrispondente ad un peso molecolare medio di circa 30 kDa).

### **Reazione di peghilazione**

A 100 mg di EPOsf (9,71 ml di una partita da 10,3 mg/ml di EPOsf, 5,48  $\mu$ moli) si sono aggiunti 10 ml di un tampone di fosfato di potassio a 0,1M, pH 7,5 contenente 506 mg di metossi-PEG-SBA da 30 kDa (16,5  $\mu$ moli) (ottenuto da Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama) e si è mescolato per 2 ore a temperatura ambiente (20-23°C). La concentrazione finale della proteina era 5 mg/ml e il rapporto proteina:reagente PEG era 1:3. Dopo 2 ore, la reazione è stata interrotta regolando il pH a 4,5 con acido acetico glaciale e la miscela è stata conservata a -20°C fino a che era pronta per la purificazione.

### **Purificazione**

1. **Miscela di prodotti di coniugazione:** circa 28 ml di SP-SEPHAROSE FF (resina scambiatrice di cationi solfo-propilica) sono stati introdotti in una colonna di vetro AMICON (2,2 x 7,5 cm) e sono stati equilibrati con tampone di acetato 20 mM pH 4,5 con una portata di 150 ml/ora. Sei millilitri della miscela di reazione contenente 30 mg di proteina sono stati diluiti 5 volte con il tampone di

equilibratura e sono stati applicati sulla colonna. Le sostanze non adsorbite sono state dilavate via con il tampone e la miscela prodotta di coniugazione di PEG adsorbita è stata eluita dalla colonna con cloruro di sodio 0,175M in un tampone di equilibratura. La EPOsf non modificata ancora presente sulla colonna, è stata eluita con cloruro di sodio 750 mM. La colonna è stata di nuovo equilibrata con il tampone di partenza. Campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e si è determinato il loro grado di peghilazione. Si è trovato che l'eluato con cloruro di sodio 0,175M conteneva specie mono-peghilate e di-peghilate e quantità in tracce della specie tri-peghilata, mentre l'eluato con cloruro di sodio 750 mM conteneva EPOsf non modificata.

2. **Di-PEG e mono-PEG-EPOsf:** La miscela di prodotto di coniugazione purificata, eluita dalla colonna nello stadio precedente è stata diluita 4 volte con il tampone ed è stata di nuovo applicata sulla colonna ed è stata lavata come descritto. Di-PEG-EPOsf e mono-PEG-EPOsf sono state eluite separatamente dalla colonna rispettivamente con cloruro di sodio 0,1M e con cloruro di sodio 0,175M. La eluizione è stata effettuata anche con cloruro di so-

dio 750 mM per eluire EPOsf non modificata, eventualmente rimasta.

Come alternativa, la miscela di reazione è stata diluita 5 volte con il tampone di acetato ed è stata applicata su una colonna di SP-Sepharose (circa 0,5 mg di proteina/ml di gel). La colonna è stata lavata e mono-PEG-EPOsf, di-PEG-EPOsf e EPOsf non modificata adsorbite sono state eluite come descritto nel capoverso precedente.

### **Risultati**

PEG-EPOsf è stata sintetizzata mediante coniugazione chimica di una molecola lineare di PEG con un peso molecolare medio numerico di 30 kDa. PEG-EPOsf era derivata dalla reazione tra i gruppi amminici primari di EPOsf e il succinimmidil estere derivato di un acido PEG-butirrico da 30 kDa ottenendo come risultato un legame di ammide.

I risultati sono riassunti nella tabella 1. La miscela del prodotto di coniugazione purificata era costituita da mono- e di-PEG-EPOsf ed era priva di EPOsf non modificata come determinato mediante l'analisi SDS-PAGE. La miscela dei prodotti di coniugazione rappresentava 23,4 mg oppure 78% della sostanza di partenza. Una separazione cromatografica a scambio di cationi di mono- e di-PEG-EPOsf indicava

che il rapporto tra mono-PEG e di-PEG nella miscela di coniugazione era quasi 1:1. Completata la reazione, il rapporto tra i singoli componenti mono:di:composto non modificato era 40:38:20 (%). La resa totale era quasi quantitativa.

**Tabella 1. Riassunto dei risultati della peghilazione di EPOsf**

Campione	Proteina (mg)	Resa (%)
Miscela Rxn.	30	100
Mono-	12,0	40
Di-	11,4	38
Non mod.	6,0	20
Misc. coniug.	23,4	78

#### **Esempio 3: Peghilazione di EPO con mPEG-SPA**

Una differente porzione della EPOsf usata nell'esempio 2 è stata fatta reagire con metossi-PEG-SPA da 30 kDa (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama). La reazione è stata effettuata con un rapporto proteina:reagente di 1:2 e le tecniche di purificazione sono state effettuate secondo l'esempio 2. Si è ottenuta prevalentemente la specie mono-peghilata.

#### **Esempio 4: Attività in vivo di EPO peghilata determinata mediante il saggio su topi normocitemici**

Il biosaggio su topi normocitemici è noto nel settore (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) e un metodo nella monografia della eri-



tropoietina di Ph. Eur. BRP. I campioni sono stati diluiti con BSA-PBS. A topi sani normali da 7-15 settimane, si sono somministrati per via sottocutanea 0,2 ml della frazione EPO contenente EPO non peghilata, EPO tri-, di- oppure mono-peghilata ottenuta dall'esempio 2 oppure 3. Nel corso di 6 giorni, mediante una puntura nella vena della coda si è prelevato sangue e lo si è diluito in modo che 1  $\mu$ l di sangue fosse presente in 1 ml di una soluzione di colorazione di arancione di acridina da 0,15  $\mu$ mol/l. Il tempo di colorazione era di 3-10 minuti. I conteggi dei reticulociti sono stati effettuati mediante microfluorometria in un citometro a flusso mediante analisi dell'istogramma di fluorescenza nel rosso. I conteggi dei reticulociti vengono dati in termini di numeri assoluti (per 30.000 cellule del sangue analizzate). Per i dati presentati ciascun gruppo era costituito da 5 topi/giorno, e ai topi si è effettuato un solo prelievo.

In esperimenti separati, a topi si è somministrata una singola dose di EPO non modificata (25 ng di EPO), la miscela di PEG(SBA)-EPO dell'esempio 2 (10 ng di prodotto di coniugazione), le EPO mono- e di-peghilate dell'esempio 2 (10 ng di prodotto di coniugazione), la PEG(SPA)-EPO dell'esempio 3 (10 ng di

prodotto di coniugazione), e soluzione tampone. I risultati vengono mostrati nella tabella 2. I risultati mostrano la superiore attività e la semivita prolungata delle specie di EPO peghilate indicate dalle quantità significativamente aumentate di reticulociti e dallo spostamento del massimo conteggio di reticulociti impiegando la medesima dose per topo (10 ng), in confronto ad una dose di 25 ng per EPO non modificata.

**Tabella 2**

	<u>EPO</u> (non modificata)	<u>39 kDa</u> <u>SPA</u> <u>PEG</u>	<u>Mono</u> <u>30K</u> <u>SBA</u>	<u>Di30K</u> <u>SBA</u>	<u>Miscela di co-</u> <u>niugati PEG-</u> <u>EPO SBA</u>	<u>Tampone di</u> <u>controllo</u>
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

**Esempio 5: Preparazione di mono-PEG-EPO in modo prevalente**

**Reazione di peghilazione**

Partendo da 100 mg (5,48  $\mu$ moli) di EPOsf in tampone di fosfato di potassio 100 mM pH 7,5 preparato secondo l'esempio 1, si sono aggiunti 329 mg (10,96  $\mu$ moli) di reagente PEG-SBA da 30 kDa sciolto in 3 ml di HCl 1 mM. Si è aggiunta una quantità di tampone di fosfato di potassio 100 mM pH 7,5 sufficiente a por-

tare il volume della miscela di reazione a 20 ml. La concentrazione finale della proteina era 5 mg/ml e il rapporto proteina:reagente PEG era 1:2. La miscela di reazione è stata mescolata per 2 ore a temperatura ambiente (20-22°C). Dopo 2 ore, la reazione è stata interrotta regolando il pH a 4,5 con acido acetico glaciale e la miscela è stata conservata congelata a -20°C fino al momento della purificazione.

### **Purificazione**

La miscela di reazione ottenuta dallo stadio precedente è stata diluita 1:5 con acetato di sodio 10 mM, pH 4,5 ed è stata applicata a 300 ml di SP-Sepharose FF (resina scambiatrice di cationi solfo-propilica) contenuta in una colonna da 4,2 x 19 cm. La colonna è stata in precedenza equilibrata con il medesimo tampone. Gli effluenti della colonna sono stati controllati a 280 nm con un dispositivo di controllo UV Gilson e sono stati registrati con un registratore Kipp e Zonen. La colonna è stata lavata con 300 ml oppure 1 volume di letto di tampone di equilibratura per rimuovere i reagenti in eccessi, i sottoprodotti della reazione e PEG-EPO oligomero. Si è effettuato quindi un lavaggio con 2 volumi di letto di NaCl 100 mM per rimuovere di-PEG-EPO. La mono-PEG-EPO è stata quindi eluita con NaCl 200 mM. Durante la

eluizione della mono-PEG-EPO, i primi 50 ml del picco di proteina sono stati scartati e la mono-PEG-EPO è stata raccolta sotto forma di una frazione da 150 ml. La EPOsf non modificata rimasta sulla colonna è stata eluita con NaCl 750 mM. Tutti i tamponi di eluizione sono stati preparati nel tampone di equilibratura. Tutti i campioni eluiti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e mediante cromatografia di esclusione in base alle dimensioni ad elevata prestazione (SEC). La miscela di mono-PEG-EPO ottenuta dalla frazione da 150 ml, che non conteneva EPOsf non modificata rivelabile è stata quindi concentrata a circa 4,5-7,5 mg/ml ed è stata sottoposta a diafiltrazione nel tampone di conservazione, fosfato di potassio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. La concentrazione/diafiltrazione è stata effettuata con un sistema Millipore Labscale® TFF dotato di una membrana Millipore Pellicon XL Biomax 50 con una soglia di separazione di 50 kDa a temperatura ambiente. La mono-PEG-EPO concentrata è stata sterilizzata mediante filtrazione ed è stata conservata congelata a -20°C.

Circa il 75% della EPOsf è stata peghilata. Dopo purificazione, la resa totale era circa 30% di mono-PEG-EPO che non conteneva EPOsf non modificata rivelabile e con circa 25% di di-PEG-EPO. Oligomeri ed

EPOsf non peghilata rappresentavano la proteina residua. La miscela di mono-PEG-EPO ottenuta da una frazione da 150 ml conteneva circa 90% di mono-PEG-EPO e circa 10% di di-PEG-EPO.

## ELENCO DELLE SEQUENZE

- (1) INFORMAZIONI GENERALI
- (i) **Richiedente**
- (A) NOME: F.HOFFMANN-LA ROCHE
  - (B) INDIRIZZO: Grenzacherstrasse 124
  - (C) CITTÀ: Basilea
  - (E) STATO: Svizzera
  - (F) CODICE POSTALE (ZIP): CH-4070
  - (G) TELEFONO: (61)-688 11 11
  - (H) TELEFAX: (61) 688 13 95
  - (I) TELEX: 962 292 hlr ch
- (ii) **Titolo dell'invenzione:** Prodotti di coniugazione di eritropoietina
- (iii) **Numero di sequenze:** 3
- (iv) **Forma leggibile al computer:**
- (A) TIPO DI MEZZO: floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatibile
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: WORD
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release 2,0

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homc sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
1 5 10 15

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  
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  
65 70 75 80

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

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

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  
145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp  
165

5  
<210> 2  
<211> 166  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

15 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  
35 40 45

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

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

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

30 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

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

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

Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
165

45  
<210> 3  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50  
<400> 3  
Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
1 5 10 15

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

### RIVENDICAZIONI

1. Un prodotto di coniugazione, detto prodotto di coniugazione comprendendo una glicoproteina costituita da eritropoietina avente almeno un gruppo amminico libero e avente l'attività biologica in vivo tale da far sì che le cellule del midollo osseo aumentino la produzione di reticulociti e di globuli rossi e scelta dal gruppo costituito da eritropoietina umana e suoi analoghi che hanno una sequenza della eritropoietina umana modificata mediante l'aggiunta di 1 fino a 6 siti di glicosilazione oppure mediante una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione; detta glicoproteina essendo legata con legame covalente a 'n' gruppi di poli(etilene glicol) di formula



il -CO di ciascun gruppo di poli(etilene glicol) formando un legame di ammidato con uno di detti gruppi amminici; in cui

R è alchile inferiore;

x è 2 oppure 3;

m è compreso tra circa 450 e circa 900;

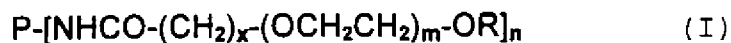
n è compreso tra 1 e 3; e

n e m vengono scelti in modo che il peso molecolare del prodotto di coniugazione meno la glicoproteina eritropoietina sia compreso tra 20 chilodalton e 100



chilodalton.

2. Il prodotto di coniugazione della rivendicazione 1 di formula



in cui  $x$ ,  $m$ ,  $n$  e  $R$  sono come definiti nella rivendicazione 1 e  $P$  è il residuo della glicoproteina senza il gruppo amminico ( $n$  gruppi amminici) che forma un legame di amide (che formano legami di ammidi) con il gruppo ( $i$  gruppi) di poli(etilen glicol).

3. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi precedente rivendicazione, in cui  $R$  è metile.

4. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui  $m$  è compreso tra circa 650 e circa 750.

5. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui  $n$  è il numero 1.

6. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui  $R$  è metile;  $m$  è compreso tra circa 650 e circa 750; e  $n$  è il numero 1.

7. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni avente la formula



in cui m è compreso tra 650 e 750, n è il numero 1 e P è come definito nella rivendicazione 1.

8. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la glicoproteina è una eritropoietina umana.

9. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la glicoproteina-eritropoietina umana viene espressa mediante attivazione di un gene endogeno.

10. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la glicoproteina ha la sequenza SEQ ID NO: 1.

11. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui la glicoproteina ha la sequenza della eritropoietina umana modificata mediante l'aggiunta di 1 fino a 6 siti di glicosilazione.

12. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui la glicoproteina ha la sequenza della eritropoietina umana modificata mediante una modificazione scelta dal gruppo costituito da:

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>;

Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>;

Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>;

Asn<sup>69</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>;  
Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;  
Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>;  
Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>;  
Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>;  
Thr<sup>125</sup>; e  
Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

13. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui la glicoproteina ha una sequenza che comprende la sequenza delle eritropoietina umana ed una seconda sequenza in corrispondenza del terminale carbossile della sequenza della eritropoietina umana, la seconda sequenza contenendo almeno un sito di glicosilazione.

14. Il prodotto di coniugazione secondo la rivendicazione 13, in cui la seconda sequenza comprende

una sequenza derivata dalla sequenza carbossi-terminale di una gonadotropina corionica umana.

15. Il prodotto di coniugazione della rivendicazione 13, in cui la glicoproteina ha una sequenza scelta dal gruppo costituito da:

- (a) la sequenza della eritropoietina umana e la sequenza SEQ ID NO: 3 in corrispondenza del terminale carbossile della sequenza della eritropoietina umana;
- (b) la sequenza indicata in (a) modificata con Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>; e
- (c) la sequenza indicata in (a) modificata con Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>.

16. Il prodotto di coniugazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la glicoproteina ha la sequenza della eritropoietina umana modificata mediante una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione.

17. Il prodotto di coniugazione della rivendicazione 16, in cui la trasposizione comprende una delezione di uno qualsiasi dei siti di glicosilazione N-collegati nella eritropoietina umana e l'aggiunta di un sito di glicosilazione N-collegato in corrispondenza della posizione 88 della sequenza della eritropoietina umana.

18. Il prodotto di coniugazione secondo la rivendicazione 17, in cui la glicoproteina ha la sequenza della eritropoietina umana modificata mediante una modificazione scelta dal gruppo costituito da:

Gln<sup>24</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>;

Gln<sup>38</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>; e

Gln<sup>83</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>.

19. Una composizione che contiene prodotti di coniugazione, ciascuno di detti prodotti di coniugazione essendo costituito da una glicoproteina-eritropoietina avente almeno un gruppo amminico libero e avente l'attività biologica in vivo da far sì che le cellule del midollo osseo aumentino la produzione di reticulociti e di globuli rossi del sangue e scelta dal gruppo costituita da eritropoietina umana e suoi analoghi che hanno una sequenza della eritropoietina umana modificata mediante l'addizione di 1 fino a 6 siti di glicosilazione oppure mediante una trasposizione di almeno un sito di glicosilazione; la glicoproteina in ciascuno detto prodotto di coniugazione essendo legata con legame covalente a 'n' gruppi di poli(etilen glicol) di formula  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  il  $-\text{CO}$  di ciascun gruppo di poli(etilen glicol) formando un legame di ammide con uno di detti gruppi amminici; in cui in ciascuno di detti prodotti

di coniugazione, R è alchile inferiore; x è il numero 2 oppure 3; m è compreso tra circa 450 e circa 900; n è compreso tra 1 e 3; n e m vengono scelti in modo che il peso molecolare di ciascun prodotto di coniugazione meno la glicoproteina eritropoietina sia compreso tra 20 chilodalton e 100 chilodalton; la percentuale di prodotti di coniugazione in cui n è il numero 1 essendo almeno novanta per cento.

20. La composizione che contiene i prodotti di coniugazione come definiti in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 18, in cui la percentuale dei prodotti di coniugazione in cui n è il numero 1, è almeno novanta per cento.

21. La composizione secondo le rivendicazioni 19 oppure 20, in cui la percentuale dei prodotti di coniugazione, in cui n è il numero 1, è almeno novantadue per cento.

22. La composizione secondo la rivendicazione 21, in cui la percentuale dei prodotti di coniugazione in cui n è il numero 1, è almeno novantasei per cento.

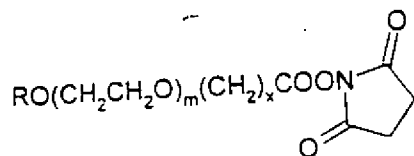
23. La composizione secondo la rivendicazione 19 oppure 20, in cui la percentuale dei prodotti di coniugazione, in cui n è il numero 1, è compresa tra novanta per cento e novantasei per cento.

24. Una composizione farmaceutica che comprende un prodotto di coniugazione oppure una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 23, e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

25. Impiego di un prodotto di coniugazione oppure di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 23, per la preparazione di farmaci per il trattamento oppure la profilassi di malattie correlate con anemia in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (CRF), per il trattamento di AIDS e per il trattamento di pazienti affetti da cancro sottoposti a chemioterapia.

26. Un metodo per il trattamento di profilassi e/o terapia di disturbi che comportano anemia in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (CRF), per il trattamento di AIDS e di pazienti affetti da cancro che sono sottoposti a chemioterapia che comprende lo stadio che consiste nel somministrare ad un paziente una composizione come rivendicata in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 23.

27. Un procedimento per la preparazione dei composti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 23, il quale procedimento consiste nel fare condensare il composto di formula II



(II)

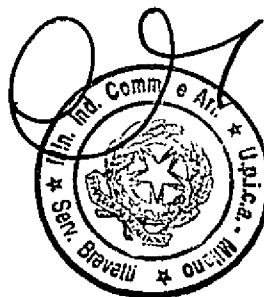
con una glicoproteina costituita da eritropoietina e in cui R, m e x sono come definiti in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6.

28. Composti secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, ogni qualvolta vengono preparati mediante il procedimento secondo la rivendicazione 27.

29. Composti secondo una qualsiasi della rivendicazioni da 1 a 23, per il trattamento di malattie che sono associate con anemia, in pazienti affetti da insufficienza renale cronica (CRF), in pazienti affetti da AIDS e in pazienti affetti da cancro che subiscono una chemioterapia.

30. I nuovi composti, i nuovi procedimenti ed i nuovi metodi e anche l'impiego di tali composti sostanzialmente come qui in precedenza descritti.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.



I MANDATARI  
(firma)

*[Handwritten signature]*  
(per se e per gli altri)

C/rb/1464