

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N°

11442

51 Inter. Cl. 7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 120000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le: 28 AVR 2004

73 Titulaire(s):
Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N°

11442

51 Inter. Cl.7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 1200000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le:

73 Titulaire(s):
Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N° 11442

51 Inter. Cl.7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 1200000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le:

73 Titulaire(s):
Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG*
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N°

11442

51

Inter. Cl.7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 1200000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le:

73 Titulaire(s):

Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG³
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N°

11442

51 Inter. Cl.7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 1200000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le:

73 Titulaire(s):
Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

ORGANISATION AFRICAINE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE (O.A.P.I.)



19

11

N° 11442

51 Inter. Cl.7

C12P 21/02
C12N 15/09
C07H 21/00
A61K 38/14, 38/16

12 BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt: 120000197

22 Date de dépôt: 30.06.2000

30 Priorité(s): USA
02.07.1999 N° 60/142,254
23.08.1999 N° 60/150,225
31.08.1999 N° 60/151,548
17.11.1999 N° 60/166,151

24 Délivré le: 29.12.2000

45 Publié le:

73 Titulaire(s):
Société dite : F. HOFFMANN-LA ROCHE AG*
124 Grenzacherstrasse
4070 BALE (CH)

72 Inventeur(s): BAILON Pascal Sebastian
21 Woodbine Road
FLORHAM PARK
New Jersey 07932 (US)

74 Mandataire: CABINET CAZENAVE
B.P. 500
YAOUNDE - Cameroun

54 Titre: Conjugués d'érythropoïétine.

57 Abrégé:

L'invention concerne des conjugués d'érythropoïétine avec le polyéthylène glycol comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues ayant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou d'une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à «n» groupe poly(éthylène glycol) de formule



le carbonyle de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

5

10

CONJUGUES D'ERYTHROPOÏËTINE

15

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

L'érythropoïèse est la production d'hématies qui s'effectue pour s'opposer à la destruction des cellules. L'érythropoïèse est un mécanisme physiologique régulé qui permet de disposer d'un nombre suffisant d'hématies pour oxygéner convenablement les tissus. L'érythropoïèse humaine (hEPO) est produite dans le rein et est le facteur plasmatique humoral qui stimule la production d'érythrocytes (Carnot, P et 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 et Plzak LF (1957) Nature 179: 6331-4). L'EPO stimule la division et la différenciation des progéniteurs érythroïdes spécialisés dans la moelle osseuse et exerce son activité biologique en se liant aux récepteurs sur les précurseurs d'érythroïdes (Krantz, BS (1991) Blood 77:419).

On a produit l'érythropoïétine par biosynthèse en utilisant la technologie de l'ADN recombinant (Egrie,

35

011442

J.C. Strickland, TW, Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) et elle est le produit d'un gène d'EPO humain cloné inséré dans et exprimé dans les cellules tissulaires ovariennes du hamster chinois (CHO). La structure primaire de la forme prédominante, pleinement traitée de hEPO est présentée dans SEQ ID N°1. Il y a deux ponts disulfure entre Cys⁷-Cys¹⁶¹ et Cys²⁹-Cys³³. Le poids moléculaire de la chaîne polypeptidique d'EPO sans les fractions sucres est de 18 236 Da. Dans la molécule d'EPO intacte, environ 40 % du poids moléculaire sont représentés par les groupes hydrocarbonés qui glycosylent la protéine aux sites de glycosylation sur la protéine (Sasaki, H. Bothner, B. Dell, A et Fukuda, M (1987), J. Biol. Chem. 262: 12059).

Comme l'érythropoïétine humaine est essentielle dans la formation des hématies, l'hormone est utile dans le traitement des maladies sanguines caractérisées par une production faible ou défectueuse d'érythrocytes. Cliniquement, l'EPO est utilisée dans le traitement de l'anémie chez les malades atteints de déficience rénale chronique (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) et chez les malades atteints de SIDA et de cancer qui subissent une chimiothérapie (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI dans MB, Garnick, dir. publ. Erythropoietin dans Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY : Marcel Dekker 1990: p. 301-324). Cependant, la biodisponibilité de la thérapeutique protéique commercialement disponible comme la thérapeutique à EPO est limitée par la courte

011442

demi-vie plasmatique de ces protéines et leur sensibilité à la dégradation par une protéase. Ces inconvénients les empêchent d'atteindre une efficacité clinique maximale.

5

RESUME DE L'INVENTION

L'invention fournit un conjugué d'érythropoïétine, ledit conjugué comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à
10 faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisis dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues qui ont la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par
15 l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou le réarrangement d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à "n" groupes poly(éthylène glycol) de formule
 $CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$, le -CO (c'est-à-dire carbonyle)
20 de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du
25 conjugué diminué de celui de la glycoprotéine de l'érythropoïétine est compris entre 20 kDaltons et 100 kDaltons. L'invention fournit en outre des compositions contenant des conjugués ici décrits dans lesquels le pourcentage de conjugués dans la composition dans
30 lesquels n vaut 1 est d'au moins 90 %.

Par comparaison avec l'EPO non modifiée (c'est-à-dire l'EPO sans PEG attaché) et les conjugués PEG-EPO classiques, les présents conjugués ont une demi-vie de circulation et un temps de séjour dans le plasma
35 accrus, une baisse de la clairance et une activité

011442

clinique in vivo accrues. Les conjugués de l'invention ont les mêmes utilisations que l'EPO. En particulier les conjugués de l'invention sont utiles pour traiter les malades en stimulant la division et la différenciation des précurseurs d'érythroïdes spécialisés dans la moelle osseuse de la même manière que l'on utilise l'EPO pour traiter les malades.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention fournit des conjugués, lesdits conjugués comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à déclencher, sous l'action des cellules de moelle osseuse, l'augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine humaine et ses analogues qui ont la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à "n" groupes poly(éthylène glycol) de formule $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$, le $-\text{CO}$ (carbonyle) de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut d'environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 ; et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine d'érythropoïétine est compris entre 20 kD à 100 kD.

On a trouvé que les conjugués de l'invention peuvent être utilisés de la même manière que l'EPO non modifiée. Cependant, les conjugués de l'invention présentent une diminution de la demi-vie de circulation et du temps de séjour plasmatique, une baisse de la clairance, et une augmentation de l'activité clinique

011442

in vivo. Etant donné ces propriétés améliorées, les conjugués de l'invention peuvent être améliorés une fois par semaine au lieu de trois fois par semaine pour l'EPO non modifiée. On s'attend à ce qu'une baisse de la fréquence d'administration aboutisse à une coopération accrue chez le malade, menant à un meilleur succès dans le traitement ainsi qu'à une amélioration dans la qualité de vie des malades. Par comparaison avec les conjugués classiques d'EPO liés au poly(éthylène glycol) on a trouvé que les conjugués ayant les poids moléculaire et la structure de lieur des conjugués de l'invention présentent une amélioration de leur puissance, de leur stabilité, de leur AUC, de leur demi-vie de circulation et de leur profil économique.

Les conjugués selon l'invention peuvent être administrés en une quantité thérapeutiquement efficace à des malades de la même manière que l'on administre l'EPO. La quantité thérapeutiquement efficace est la quantité de conjugué nécessaire pour l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse l'augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes. La quantité exacte de conjugué est une question de préférence par rapport à des facteurs tels que le type exact de maladie traitée, l'état du malade traité, ainsi que les autres ingrédients de la composition. Ainsi, on peut administrer de 0,01 à 10 µg par kg de poids corporel, de préférence de 0,1 à 1 µg/kg de poids corporel, par exemple une fois par semaine.

Les compositions pharmaceutiques contenant le conjugué peuvent être formulées à une concentration efficace pour l'administration par divers moyens à un malade humain subissant des maladies sanguines caractérisées par une baisse ou une déféctuosité dans

la production des érythrocytes. Les quantités thérapeutiquement efficaces moyennes du conjugué peuvent varier, et en particulier doivent être fondées sur les recommandations et la prescription d'un médecin qualifié.

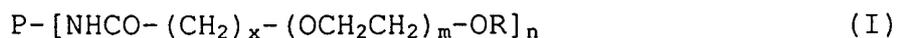
Les produits glycoprotéiques d'érythropoïétine obtenus selon l'invention peuvent être préparés dans des compositions pharmaceutiques appropriées pour l'injection avec un support ou véhicule pharmaceutiquement acceptable par des procédés connus des spécialistes. Ainsi, des compositions appropriées ont été décrites dans les documents WO97/09996, WO97/40850, WO98/58660 et WO99/07401. Parmi les supports pharmaceutiquement acceptables préférés pour formuler les produits de l'invention, il faut citer la sérum albumine humaine, les protéines plasmatiques humaines, etc. Les composés de l'invention peuvent être formulés dans un tampon phosphate de sodium/potassium 10 mM à pH 7 contenant un agent de tonicité, par exemple le chlorure de sodium 132 mM. Facultativement, la composition pharmaceutique peut contenir un agent de conservation. La composition pharmaceutique peut contenir différentes quantités d'érythropoïétine, par exemple 10 à 1000 µg/ml, par exemple 50 µg ou 400 µg.

Le terme d'"érythropoïétine" ou EPO se réfère à une glycoprotéine ayant la séquence d'acides aminés exposée dans (SEQ ID NO:1) ou (SEQ ID NO:2) ou une séquence d'acides aminés qui y est sensiblement homologue, dont les propriétés biologiques concernent la stimulation de la production d'érythrocytes et la stimulation de la division et de la différenciation de précurseurs d'érythrocytes spécialisés dans la moelle osseuse. Tels qu'utilisés ici, ces termes comprennent de telles protéines modifiées délibérément, par exemple par une mutagenèse dirigée ou accidentellement par des

011442

mutations. Ces termes incluent également les analogues ayant de 1 à 6 sites additionnels de glycosylation, les analogues ayant au moins un acide aminé additionnel à l'extrémité carboxy-terminale de la glycoprotéine, l'acide aminé additionnel incluant au moins un site de glycosylation, et les analogues ayant une séquence d'acide aminés qui incluent une transposition d'au moins un site pour la glycosylation. Ces termes comprennent l'érythropoïétine humaine tant naturelle que produite par voie recombinante.

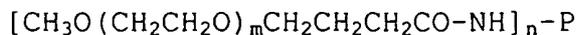
Les conjugués d'érythropoïétine de l'invention peuvent être représentés par la formule I :



dans laquelle x, m, n et R sont tels que ci-dessus. Dans la formule i, P est le résidu d'une glycoprotéine d'érythropoïétine ici décrite (c'est-à-dire sans le ou les groupes amino qui forment une liaison amide avec le carbonyle représenté dans la formule I), ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse l'augmentation de la production des réticulocytes et des érythrocytes.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, R est un méthyle. De préférence, m vaut d'environ 650 à environ 750 et n vaut de préférence 1.

Dans le mode de réalisation le plus préféré de l'invention, R est un méthyle, n vaut d'environ 650 à environ 750 et n vaut 1, c'est-à-dire le conjugué tel que défini ci-dessus répondant à la formule



dans laquelle m vaut de 650 à 750, n vaut 1 et P est tel que défini ci-dessus. De préférence, m a une moyenne d'environ 680.

De préférence, la glycoprotéine des conjugués définis ci-dessus est une érythropoïétine humaine. L'érythropoïétine humaine et les protéines analogues telles que définies ci-dessus peuvent être exprimées par une activation génique endogène. Les glycoprotéines d'érythropoïétine humaine sont celles de SEQ ID NO:1 et de SEQ ID NO:2, de préférence celles de SEQ ID NO:1.

En outre, P peut être choisi dans le groupe constitué par les résidus d'érythropoïétine humaine et leurs analogues ayant de 1 à 6 sites de glycosylation additionnels. Comme il est exposé en détail ci-dessus, la préparation et la purification de l'EPO sont bien connus des spécialistes. L'EPO désigne la protéine naturelle ou recombinante, de préférence humaine, obtenue à partir de n'importe quelle source classique comme les tissus, la synthèse des protéines, la culture cellulaire avec des cellules naturelles ou recombinantes. Ceci comprend toute protéine ayant l'activité d'EPO, comme les mutéines ou des protéines modifiées d'une autre manière. On peut préparer l'EPO recombinante par expression dans des lignées cellulaires CHO, BHK ou HeLa, par la technologie de l'ADN recombinant ou par une activation génique endogène. L'expression de protéines, y compris l'EPO, par activation génique endogène est bien connue des spécialistes et est décrite, par exemple, dans les brevets américains N° 5 733 761, 5 641 670 et 5 733 746 et les publications de brevets internationaux N° WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 et WO 91/09955, la teneur de chacun de ces documents étant ici incorporée à titre de référence. Les espèces d'EPO préférées pour la préparation des

011442

produits glycoprotéiques d'érythropoïétine sont les espèces d'EPO humaines. De préférence, l'espèce d'EPO est l'EPO humaine ayant la séquence d'acides aminés représentée dans SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:2, de préférence la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO:1.

Dans un mode de réalisation, P peut être le résidu d'un analogue de glycoprotéine ayant de 1 à 6 additionnels pour la glycosylation. La glycosylation d'une protéine, avec un ou plusieurs groupes oligosaccharides, s'effectue en des endroits spécifiques le long d'une ossature polypeptidique, et affecte grandement les propriétés physiques de la protéine comme la stabilité de la protéine, la sécrétion, la localisation intracellulaire et l'activité biologique. La glycosylation est généralement de deux types. Les oligosaccharides liés à l'oxygène sont attachés à des résidus sérine ou thréonine et les oligosaccharides liés à l'azote sont attachés à des résidus asparagine. Un type d'oligosaccharide que l'on trouve tant sur les oligosaccharides liés à l'azote que sur ceux qui sont liés à l'oxygène est l'acide N-acétyl neuraminique (acide sialique), qui est une famille de sucres aminés contenant 9 atomes de carbone ou plus. L'acide sialique est généralement le résidu terminal sur les oligosaccharides liés à l'azote comme sur ceux qui sont liés à l'oxydène et, étant donné qu'ils portent une charge négative, ils confèrent des propriétés acides à la glycoprotéine. L'érythropoéiétine humaine, ayant 165 acides aminés, contient trois chaînes oligosaccharidiques liées à l'azote et une chaîne liée à l'oxygène qui constitue environ 40 % du poids moléculaire total de la glycoprotéine. La glycosylation liée à l'azote s'effectue aux résidus asparagine localisés dans les positions 24, 38 et 83, et la

localisation liée à l'oxygène s'effectue en un résidu sérine localisé en la position 126. Les chaînes oligosaccharidiques sont modifiées par des résidus acides sialiques terminaux. L'élimination enzymatique de tous les résidus acide sialique de l'érythropoïétine glycosylée aboutit à une perte d'activité in vivo, mais non d'activité in vitro car la sialylation de l'érythropoïétine empêche sa liaison, et sa clairance ultérieure, par la protéine de liaison hépatique.

10 Les glycoprotéines de l'invention comprennent des analogues d'érythropoïétine humaine comportant une ou plusieurs modifications de la séquence d'acides aminés de l'érythropoïétine humaine aboutissant à une augmentation du nombre de sites de fixation de l'acide sialique. On peut engendrer ces analogues de glycoprotéine par une mutagenèse dirigée ayant des additions, des délétions et/ou des substitutions de résidus acides aminés qui augmentent ou modifient les sites qui sont disponibles pour la glycosylation. On engendre les analogues de glycoprotéine ayant des niveaux d'acide sialique supérieurs à ceux que l'on trouve dans l'érythropoïétine humaine en ajoutant des sites de glycosylation qui ne perturbent pas la conformation secondaire ou tertiaire requise pour l'activité biologique. Les glycoprotéines de l'invention incluent également des analogues ayant des niveaux accrus de fixation d'hydrates de carbone en un site de glycosylation qui comporte généralement la substitution d'un ou plusieurs acides aminés à proximité étroite d'un site de liaison à l'azote ou à l'oxygène. Les glycoprotéines de l'invention comprennent généralement les analogues ayant un ou plusieurs acides aminés s'étendant à partir de l'extrémité carboxy-terminale de l'érythropoïétine et fournissant au moins un site hydrate de carbone

011442

additionnel. Les glycoprotéines de l'invention incluent également des analogues ayant une séquence d'acides aminés incluant une transposition d'au moins un site pour la glycosylation. Une telle transposition de site de glycosylation implique la délétion d'un ou plusieurs sites de glycosylation dans l'érythropoïétine humaine et l'addition d'un ou plusieurs sites de glycosylation que l'on ne trouve pas dans la nature. L'augmentation du nombre de chaînes hydrocarbonées sur l'érythropoïétine, et par conséquent du nombre d'acides sialiques par molécule d'érythropoïétine, peut conférer des propriétés avantageuses comme une augmentation de la solubilité, une augmentation de la résistance à la protéolyse, une réduction de l'immunogénicité, un accroissement de la durée de vie dans le sérum et une augmentation de l'activité biologique. Des analogues d'érythropoïétine comportant des sites de glycosylation additionnels sont décrits plus en détail dans la demande de brevet européen N° 640 619, d'Elliot, publiée le 1^{er} mars 1995.

Dans un mode de réalisation préféré, les glycoprotéines de l'invention comprennent une séquence d'acides aminés incluant au moins un site additionnel pour la glycosylation comme, sans s'y limiter, les érythropoïétines comprenant la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par une modification choisie parmi les suivantes :

Asn³⁰Thr³² ;
Asn⁵¹Thr⁵³ ;
Asn⁵⁷Thr⁵⁹ ;
Asn⁶⁹ ;
Asn⁶⁹Thr⁷¹ ;
Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ ;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ ;

011442

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ ;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² ;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² ;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ ;
 5 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ ;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ ;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ ;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ ;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ ;
 10 Thr¹²⁵ ; et
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

La notation utilisée pour la modification de la
 séquence d'acides aminés signifie que la ou les
 15 positions de la protéine non modifiée correspondante
 (par exemple hEPO de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:2)
 indiquée par le ou les nombres en indices hauts est
 changé en le ou les indices aminés précédents
 immédiatement le ou les nombres mis en indices hauts
 20 respectifs.

La glycoprotéine peut également être un analogue
 ayant au moins un indice aminé additionnel à
 l'extrémité carboxy-terminale de la glycoprotéine,
 l'acide aminé additionnel incluant au moins un site de
 25 glycosylation, c'est-à-dire que le conjugué tel que
 défini ci-dessus se réfère également à un composé dans
 lequel la glycoprotéine comporte une séquence
 comprenant la séquence de l'érythropoïétine humaine et
 une seconde séquence à l'extrémité carboxy-terminale de
 30 la séquence d'érythropoïétine humaine, la seconde
 séquence contenant au moins un site de glycosylation.
 L'acide aminé additionnel peut comprendre un fragment
 peptidique dérivé de l'extrémité carboxy-terminal de la
 gonadotropine chorionique humaine. De préférence, la
 35 glycoprotéine est un analogue choisi dans le groupe

011442

constitué par (a) l'érythropoïétine humaine ayant la
séquence d'acides aminés 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 BO:3), s'étendant à
5 partir de l'extrémité carboxy-terminale ; (b)
l'analogue dans (a) comprenant en outre Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰
EPO ; et (c) l'analogue en (a) comprenant en outre
Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

La glycoprotéine peut également être un analogue
10 ayant une séquence d'acides aminés qui inclut une
transposition d'au moins un site pour la glycosylation.
La transposition peut comprendre une délétion de l'un
quelconque des sites hydrates de carbone lié à l'azote
dans l'érythropoïétine humaine et une addition d'un
15 site hydrate de carbone lié à l'azote en position 88 de
la séquence d'acides aminés de l'érythropoïétine
humaine. De préférence, la glycoprotéine est un
analogue choisi dans le groupe constitué par Gln²⁴ Ser⁸⁷
Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO ; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO ; et Gln⁸³
20 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

Tel qu'utilisé ici, le terme "alkyle inférieur"
désigne un groupe alkyle linéaire ou ramifié ayant de 1
à 6 atomes de carbone. Comme exemple de groupes alkyle
inférieur, on peut citer méthyle, éthyle et isopropyle.
25 Selon l'invention, R représente n'importe quel alkyle
inférieur. On préfère les conjugués dans lesquels R est
un méthyle.

Le symbole "m" représente le nombre de résidus
oxyde d'éthylène (OCH₂CH₂) dans le groupe poly(oxyde
30 d'éthylène). Une seule sous-unité PEG d'oxyde
d'éthylène a un poids moléculaire d'environ 44 daltons.
Ainsi, le poids moléculaire du conjugué (excluant le
poids moléculaire de l'EPO) dépend du nombre "m". Dans
les conjugués de l'invention, "m" est d'environ 450 à
35 environ 900 (ce qui correspond à un poids moléculaire à

011442

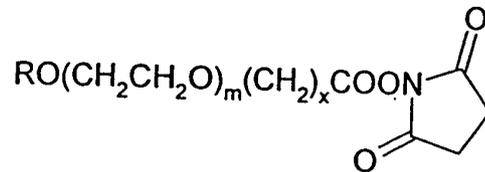
environ 20 kDa à environ 40 kDa), de préférence à environ 60 à environ 750 (ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 30 kDa). Le nombre m est choisi de manière que le conjugué de l'invention résultant ait une activité physiologique comparable à celle de l'EPO non modifiée, laquelle activité peut représenter la même activité, une activité supérieure ou une fraction de l'activité correspondante de l'EPO non modifiée. Un poids moléculaire "d'environ" un certain nombre signifie qu'il est dans un intervalle raisonnable par rapport à ce nombre, déterminé par des techniques d'analyse classiques. Le nombre " m " est choisi de manière que le poids moléculaire de chaque groupe poly(éthylène glycol) lié de façon covalente à la glycoprotéine érythropoïétine soit d'environ 20 kDa à environ 40 kDa, et soit de préférence d'environ 30kDa.

Dans les conjugués de l'invention, le nombre " n " est le nombre de groupes polyéthylène glycol liés de façon covalente à des groupes amino libres (y compris les groupes ϵ -amino d'un acide aminé lysine et/ou le groupe amino terminal) d'une protéine d'érythropoïétine via une ou plusieurs liaisons amides. Un conjugué de l'invention peut avoir 1, 2 ou 3 molécules de PEG par groupe d'EPO. " n " est un nombre entier compris entre 1 et 3, de préférence " n " vaut 1 ou 2 ou de préférence " n " vaut 1.

On peut préparer le composé de formule I à partir du matériau polymérique connu

011442

5



(II)

10 dans lequel R et m sont tels que décrits ci-dessus, en
 composant le composé de formule II avec la
 glycoprotéine d'érythropoïétine. Les composés de
 formule I dans lesquels x vaut 3 sont les esters
 succinimidyliques d'acide alpha-alcoxy inférieur
 15 butyrique de poly(éthylène glycol) (alcoxy inférieur-
 PEG-SPA). Les composés de formule II dans laquelle x
 vaut 2 sont les esters succinimidyliques d'acide alpha-
 alcoxy inférieur propionique de poly(éthylène
 glycol) (alcoxy inférieur-PEG-SPA). On peut utiliser
 20 n'importe quel procédé classique pour faire réagir un
 ester activé avec une amine afin de former un amide. La
 réaction décrite ci-dessus, l'ester succinimidylique
 donné en exemple est un groupe sortant causant la
 formation d'un amide. L'utilisation d'esters
 25 succinimidyliques comme les composés de formule II pour
 produire des conjugués avec les protéines est décrite
 dans le brevet américain N° 5 672 662 publié le 30
 septembre 1997 (Harris et al.).

30 L'EPO humaine contient neuf groupes amino libres,
 le groupe amino terminal auquel s'ajoute les groupes ε-
 amino de 8 résidus lysine. Lorsqu'on combine le réactif
 de pégylation avec un composé SBA de formule II, on a
 trouvé qu'à un pH de 7,5 un rapport protéine:PEG de 1:3
 et une température réactionnelle comprise entre 20 et
 35 25°C, on produit un mélange de mono-, di- et de traces

011442

d'espèces tripégyllées. Lorsque le réacteur de
pégylation est un composé SPA de formule II, dans des
conditions similaires sauf que le rapport protéine:PEG
est de 1:2, on produit principalement l'espèce
5 monopégyllée. On peut administrer l'EPO pégyllée sous la
forme d'un mélange, ou bien sous la forme d'espèces
pégyllées différentes séparées par chromatographie
échangeuse de cations. En manipulant les conditions de
la réaction (par exemple le rapport des réactifs, le
10 pH, la température, la concentration de protéine, la
durée de réaction, etc), on peut faire varier les
quantités relatives des différentes espèces pégyllées.

L'érythropoïétine humaine (EPO) est une
glycoprotéine humaine qui stimule la formation
15 d'érythrocytes. Sa préparation et son application
thérapeutiques sont décrites en détail par exemple dans
les brevets américains N° 5 547 933 et 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 et EP-
20 B 0 411 678 ainsi que Lai P.H. et al., J. Biol. Chem.
261 (1986) 3116-3121 et Sasaki H. et al., J. Biol.
Chem. 262 (1987) 10259-12076. L'érythropoïétine pour
utilisations thérapeutiques peut être produite par un
moyen recombinant (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 et
25 Egrie, J.C., Strickland, T.W. Lane, J. et al. (1986)
Immunobiol 72:213-224).

Des procédés pour l'expression et la préparation
de l'érythropoïétine dans un milieu dépourvu de sérum
sont décrits par exemple dans le document XO 96/35718,
30 de Burg, publié le 14 novembre 1996, et dans la
publication de brevet européen 513 738, de Koch,
publiée le 12 juin 1992. Outre les publications
mentionnées ci-dessus, il est connu que l'on réaliser
une fermentation sans sérum de cellules CHO
35 recombinantes qui contiennent un gène EPO. Ces procédés

sont décrits par exemple dans les documents EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 et sous une forme générale par Kawamoto, T. et al. Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. et Franek, F. Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B. Expcology 271 (1981) 42-51n EP-A 0 481 791 EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

Dans le document EP-A 0 267 678, il est décrit une chromatographie échangeuse d'ions sur S-Sepharose, une HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance) à phases inversées préparative sur une colonne en C8 et une chromatographie de filtration sur gel pour la purification de l'EPO produit dans une culture dépourvue de sérum après dialyse. A ce propos, on peut remplacer l'étape de chromatographie par filtration sur gel par une chromatographie d'échange d'ions, sur débit rapide de S-Sepharose. Il est également proposé de réaliser une chromatographie colorante sur colonne de bleu tris-acrylique avant la chromatographie échangeuse d'ions.

Un procédé de purification d'EPO recombinante est décrit par Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107(1990) 352-359. Dans ce procédé, on traite cependant l'EPO avec une solution de Tween® 20, de fluorure de phénylméthyl sulfonyle, d'éthyl maléimide, le pepstatine A, de sulfate de cuivre et d'acide oxamique avant les étapes de purification. Certaines publications, y compris le document WO 96/35718, de Burg, publiée le 14 novembre 1996, décrit un procédé de préparation d'érythropoïétine dans un procédé de fermentation sans sérum (EPOsf).

On peut déterminer l'activité spécifique de l'EPO ou de conjugués d'EPO selon l'invention par divers essais connus des spécialistes. L'activité biologique des protéines d'EPO purifiées de l'invention est telle

011442

que l'administration de la protéine EPO par injection à des malades humains aboutit à une augmentation de la production de réticulocytes et d'hématies par les cellules de moelle osseuse, par comparaison avec un groupe témoin de sujets n'ayant pas reçu d'injection. On peut tester l'activité biologique des protéines d'EPO, ou de certains de leurs fragments, obtenus et purifiés selon l'invention en ayant recours à des procédés selon Annable, et al., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47:99-112 et Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2). Un autre essai biologique pour déterminer l'activité de la protéine d'EPO, l'essai de la souris normocythémique, est décrit dans l'exemple 4.

L'invention fournit une composition constituée de conjugués tels que décrits ci-dessus. Une composition contenant au moins 90 % de conjugués mono-PEG, c'est-à-dire dans lesquels n vaut 1 peut être préparée comme on le voit dans l'exemple 5. Généralement les composés monoPEG de glycoprotéines d'érythropoïétine sont souhaitables, car ils tendent à avoir une activité plus élevée que les conjugués di-PEG. On peut réguler le pourcentage de conjugués mono-PEG ainsi que le rapport d'espèces mono-PEG et d'espèces di-PEG en mettant ensemble des fractions plus larges autour du pic d'élution pour diminuer le pourcentage de mono-PEG, ou des fractions plus étroites pour augmenter le pourcentage de mono-PEG dans la composition. Environ 90 % de conjugués mono-PEG est un bon équilibre de rendement et d'activité. On peut souhaiter quelques fois des compositions dans lesquelles, par exemple, au moins 92 % et au moins 96 % des conjugués sont des espèces mono-PEG (n = 1). Dans un mode de réalisation de l'invention, le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est de 90 % à 96 %.

011442

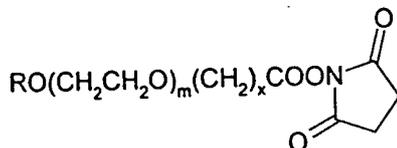
L'invention se réfère également aux compositions pharmaceutiques correspondantes comprenant un conjugué ou une composition telle que décrite ci-dessus et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

5 Les conjugués et compositions de l'invention sont particulièrement utiles pour la préparation de médicaments pour le traitement ou la prophylaxie des maladies corrélées à l'anémie chez les malades atteints de déficience rénale chronique (CRL), de SIDA, et pour
10 le traitement des malades cancéreux qui subissent une chimiothérapie.

Un mode de réalisation additionnel de l'invention se réfère à un procédé de traitement prophylactique et/ou thérapeutique de maladies faisant intervenir une
15 anémie chez des malades atteints de déficience rénale chronique (CRF), de SIDA et des malades cancéreux subissant une chimiothérapie, comprenant l'étape d'administration à un malade d'une composition telle que décrite ci-dessus.

20 En outre, l'invention concerne un procédé de préparation de composés tels que décrits ci-dessus, ce procédé comprenant la condensation du composé de formule II

25



(II)

30

avec une glycoprotéine d'érythropoïétine et où r, m et x sont tels que définis ci-dessus.

L'invention se réfère également aux composés tels que définis ci-dessus pour le traitement de maladies
35 qui sont associées à l'anémie chez les malades atteints

011442

de déficience rénale chronique (CRF), de SIDA, et les malades cancéreux subissant une chimiothérapie.

L'invention sera mieux comprise en se référant aux exemples suivants qui précisent mais ne limitent pas l'invention ici décrite.

EXEMPLES

Exemple 1 : Fermentation et purification de l'EPO humaine

10 a) Préparation et fermentation de l'inoculum

On prélève un flacon de la bande cellulaire de travail, provenant d'une lignée cellulaire CHO productrice d'EPO (ATCC CRL 8695, décrite dans le document EPO 411 678 (Genetics Institute)) dans la phase gazeuse de la cuve de stockage à azote liquide. On transfère les cellules dans des ballons de centrifugation en verre et on cultive dans un milieu tamponné au carbonate acide dans un incubateur de CO₂ modifié. Les milieux dépourvus de sérum typiques utilisés pour la préparation et la fermentation de l'inoculum sont décrits dans le demande de brevet européen N° 513 738 de Koch publiée le 12 juin 1992, ou le document WO 96/35718 de Burg publiée le 15 novembre 1996, et ils contiennent par exemple comme milieu de DMEM/F12 (par exemple JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, Etats-Unis, commande N° 57-736) ainsi que du carbonate acide de sodium, de la L+glutamine, du D+glucose, de l'insuline recombinante, du sélénite de sodium, du diamino butane, de l'hydrocortisone, du sulfate de fer (II), de l'asparagine, de l'acide aspartique, de la sérine et un stabilisateur des cellules de mammifère comme par exemple l'alcool polyvinylique, la méthyl cellulose, le polydextrane, le polyéthylène glycol, le Pluronic F68,

011442

un dilatateur plasmétique polygeline (HEMACCEL®) ou de la polyvinyl pyrrolidone (document WO 96/35718).

On vérifie au microscope l'absence dans les cellules de microorganismes contaminants, et on détermine des densités cellulaires. Ces tests sont effectués à chaque étape de division.

Après la période de croissance, initiale, on dilue la culture cellulaire avec du milieu frais à la densité cellulaire de départ, et elle connaît un autre cycle de croissance. On répète ce procédé jusqu'à obtention d'un volume de culture d'environ 2 litres par ballon de centrifugation en verre. Après environ 12 doublements, on obtient de 1 à 5 litres de cette culture que l'on emploie alors comme inoculum pour le fermenteur d'inoculum de 10 litres.

Au bout de 3 à 5 jours, on peut utiliser la culture dans le fermenteur de 10 litres comme inoculum pour le fermenteur à inoculum de 100 litres. Au bout de 3 à 5 jours additionnels de culture, on peut utiliser la culture dans le fermenteur de 100 litres pour le fermenteur de production de 1000 litres.

b) Récolte et séparation des cellules

On utilise un procédé de réalimentation discontinu, c'est-à-dire que lorsqu'on atteint la densité cellulaire désirée, on récolte environ 80 % de la cellule. On complète la cellule restante avec du milieu de culture frais et on cultive jusqu'à la récolte suivante. Un tour de production consiste en un maximum de 10 récoltes successives : 9 récoltes partielles et une récolte globale à la fin de la fermentation. La récolte s'effectue tous les trois à quatre jours.

On transfère le volume de récolte déterminé dans un récipient refroidi. On retire les cellules par centrifugation ou filtration et on les jette. On filtre

011442

en ligne le surnageant de l'étape de centrifugation contenant l'EPO et on le recueille dans un second récipient refroidi. On traite séparément chaque récolte au cours de la purification.

5 Un procédé typique pour la purification de la protéine EPO est décrit dans le document WO 96/35718, de Burg, publié le 14 novembre 1987. Le procédé de purification est expliqué ci-dessous.

a) Chromatographie sur bleu de Sepharose

10 Le bleu de Sepharose (Pharmacia) consiste en perles de Sepharose à la surface desquelles le colorant bleu Cibacron est lié de façon covalente. Etant donné que l'EPO se lie plus fortement au bleu de Sepharose que la plupart des impuretés non protéiques, certaines
15 impuretés protéiques et le PVA, on peut enrichir le PVO dans cette étape. On procède à l'élution de la colonne de Sepharose bleu en augmentant la concentration de sel ainsi que le pH.

On remplit la colonne avec de 80 à 100 litres de
20 bleu de Sepharose, on la régénère avec NaOH et on l'équilibre avec un tampon d'équilibrage (chlorure de sodium/calcium et acétate de sodium). On charge le surnageant du fermenteur acidifié et filtré. Après la
25 fin du chargement, on lave la colonne tout d'abord la colonne avec un tampon semblable au tampon d'équilibrage contenant une concentration plus élevée de chlorure de sodium, et ensuite avec un tampon de base Tris. On élue le produit avec un tampon de base
30 Tris et on le recueille en une seule fraction selon le profil d'élution directeur.

b) Chromatographie sur butyl Toyopearl

Le butyl Toyopearl 650C (Toso Haas) est une
matrice à base de polystyrène à laquelle des résidus
butyle aliphatiques sont couplés de façon covalente.
35 Etant donné que l'EPO se lie plus fortement à ce gel

011442

que la plupart des impuretés et le PVA, il faut l'éluer avec un tampon contenant de l'isopropanol.

5 On remplit la colonne avec de 30 à 40 litres de butyl Toyopearl 650 C, on régénère avec NaOH, on lave avec un tampon de base Tris et on équilibre avec un tampon de base Tris contenant de l'isopropanol.

10 On ajuste l'éluat de bleu de Sepharose à la concentration d'isopropanol dans le tampon d'équilibrage de la colonne et on charge sur la colonne. On lave ensuite la colonne avec un tampon d'équilibrage avec une concentration accrue d'isopropanol. On élue le produit avec un tampon d'élution (tampon de base Tris à haute teneur en isopropanol) et on recueille en une seule fraction
15 selon le profil d'élution directeur.

c) Chromatographie sur Ultrogel d'hydroxyapatite

L'Ultrogel d'hydroxyapatite (Biosepra) consiste en hydroxyapatite qui est incorporée dans une matrice d'agarose pour améliorer ses propriétés mécaniques.
20 L'EPO a une affinité à l'hydroxyapatite et peut donc être élué à de plus faibles concentrations de phosphate que les impuretés protéiques.

On remplit la colonne avec de 30 à 40 litres d'Ultrogel d'hydroxyapatite et on la régénère avec un
25 tampon phosphate de potassium/chlorure de calcium et NaOH suivi par un tampon de base Tris. On l'équilibre alors avec un tampon de base Tris contenant une faible quantité d'isopropanol et de chlorure de sodium.

30 On charge l'EPO contenant l'éluat de la chromatographie sur butyl Toyopearl dans la colonne. Ensuite, on lave la colonne avec un tampon d'équilibrage et un tampon de base Tris sans isopropanol ni chlorure de sodium. On élue le produit avec un tampon de base Tris contenant une faible
35 concentration de phosphate de potassium et on le

011442

recueille en une seule fraction selon le profil d'élution directeur.

d) HPLC à phases inversées sur Vydac C4

Le matériau de RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste
5 en particules de gel de silice dont les surfaces
portent des chaînes alkyle en C₄. La séparation de
l'EPO d'avec les impuretés protéiques se fonde sur des
différences de forces d'interactions hydrophobes. On
procède à l'élution avec un gradient d'acétonitrile
10 dans l'acide trifluoroacétique dilué.

On conduit l'HPLC préparative en utilisant une
colonne d'acier inoxydable (remplie de 2,8 à 3,2 litres
(gel de silice Vydac C4). On acidifie l'éluat
d'Ultrogel d'hydroxyapatite en ajoutant de l'acide
15 trifluoroacétique et on l'introduit dans la colonne de
Vydac C4. Pour le lavage et l'élution, on utilise un
gradient d'acétonitrile dans l'acide trifluoroacétique
dilué. On recueille les fractions et on les neutralise
immédiatement avec un tampon phosphaté. On rassemble
20 les fractions d'EPO qui sont dans les limites de l'IPC.

e) Chromatographie sur DEAE Sepharose

Le matériau DEAE Sepharose (Pharmacia) consiste en
groupes diéthyl aminoéthyle (DEAE) qui sont liés de
façon covalente à la surface de perles de Sepharose. La
25 liaison de l'EPO aux groupes DEAE se fait par la
médiation d'interactions ioniques. L'acétonitrile et
l'acide trifluoroacétique passent à travers la colonne
sans être retenus. Après que ces substances aient été
enlevées par lavage, on retire les traces d'impuretés
30 en lavant la colonne avec un tampon d'acétate à un
faible pH. Ensuite, on lave la colonne avec un tampon
phosphaté neutre et on élue l'EPO avec un tampon de
force ionique croissante.

On remplit la colonne de DEAE Sepharose à
35 écoulement rapide. On ajuste le volume de colonne pour

011442

assurer une charge d'EPO comprise entre 3 et 10 mg/ml d'EPO/ml de gel. On lave la colonne avec de l'eau et un tampon d'équilibrage (phosphate de sodium/potassium). On introduit la fraction rassemblée de l'éluat d'HPLC
5 et on lave la colonne avec un tampon d'équilibrage. On lave ensuite la colonne avec un tampon de lavage (tampon d'acétate de sodium) puis on lave avec un tampon d'équilibrage. Ensuite, on dilue l'EPO de la colonne avec un tampon d'éluat (chlorure de sodium,
10 phosphate de sodium/potassium), et on le recueille en une seule fraction selon le profil d'éluat directeur.

On ajuste l'éluat de la colonne de DEAE Sepharose à la conductivité spécifiée. On filtre de façon stérile la substance médicamenteuse résultante dans des flacons
15 de Teflon et on la conserve à -70°C .

EXEMPLE 2 : Pégylation de l'EPO avec mPEG-SBA

L'EPO purifié selon les produits dépourvus de sérum de l'exemple 1 (EPOsf) est homogène comme on le détermine par des procédés d'analyse et comme on le
20 voit dans le schéma d'isoformes typiques constitué de 8 isoformes. Il a une activité biologique spécifique de 190 000 UI/mg comme on le détermine par le dosage de la souris normocythémique. Le réactif de pégylation utilisé est un méthoxy-PEG-SBA, qui est un composé de
25 formule II dans laquelle R est un méthyle ; x vaut 3 ; m vaut de 650 à 750 (moyenne environ 680, correspondant à un poids moléculaire moyen d'environ 30 kDa).

Réaction de pégylation

A 100 mg d'EPOsf (9,71 ml d'une réserve de 10,3
30 mg/ml d'EPOsf, 5,48 μmole , on ajoute 10 ml de tampon de phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,5, contenant 506 mg de méthoxy-PEG-SBA à 30 kDa (16,5 μmole) (commercialisé par Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Alabama, Etats-U) et on mélange pendant 2 heures à la
35 température ambiante (20 à 23°C). La concentration

011442

finale de protéine est de 5 mg/ml et le rapport protéine:réactif PEG est de 1:3. Au bout de 2 heures, on arrête la réaction en ajustant le pH à 4,5 avec de l'acide acétique glacial et on conserve à -20°C jusqu'à ce que l'ensemble soit prêt pour la purification.

Purification

1. **Mélange conjugué** : On introduit environ 28 ml de SP-SEHAROSE FF (résine échangeuse de cations sulfopropyle) dans une colonne de verre AMICON (2,2 x 7,5 cm) et on équilibre avec un tampon d'acétate 20 mM, pH 4,5 à un débit de 150 ml/heure. On dilue 5 fois avec un tampon d'équilibrage 6 ml du mélange réactionnel contenant 30 mg de protéine et on l'applique dans la colonne. On enlève par lavage les matériaux non adsorbés et on élue de la colonne le mélange PEG-conjugué adsorbé avec NaCl 0,175 M dans le tampon d'équilibrage. On élue l'EPOsf non modifié restant encore dans la colonne avec NaCl 750 mM. On rééquilibre la colonne dans le tampon de départ. On analyse les échantillons par SDS-PAGE et on détermine leur degré de pégylation. On trouve que l'éluat de NaCl 0,175 M contient des espèces monopégyllées ainsi que des espèces dipégyllées et des traces d'espèces tripégyllées, tandis que l'éluat de NaCl 750 mM contient de l'EPOsf non modifié.

2. **EPOsf di-PEG et mono-PEG**: On dilue quatre fois avec le tampon le mélange de conjugués purifiés élués à partir de la colonne dans l'étape suivante et on l'applique à nouveau dans la colonne puis on le lave comme il est dit. On élue séparément de la colonne le di-PEG-EPOsf et le mono-PEG-EPOsf avec NaCl 0,1 M et NaCl 0,175 M, respectivement. On procède à l'élution avec NaCl 750 mM pour éluer tout EPOsf non modifié éventuellement restant.

On peut également diluer cinq fois le mélange réactionnel avec le tampon d'acétate et l'appliquer sur

011442

la colonne de SP-Sepharose (environ 0,5 mg de protéine par ml de gel). On lave la colonne et on élue le mono-PEG-EPOsf, le di-PEG-EPOsf et l'EPOsf non modifié adsorbés comme il est dit dans la section précédente.

5 Résultats

On synthétise le PEG EPOsf en conjuguant chimiquement une molécule de PEG linéaire ayant un poids moléculaire moyen en nombre de 34 kDa. Le PEG-EPOsf dérive de la réaction entre les groupes amino primaires d'EPOsf et le dérivé ester succinimidyle d'un acide PEG butyrique à 30 kDa aboutissant à une liaison amide.

Les résultats sont résumés au tableau 1. Le mélange conjugué purifié se compose de mono- et de di-PEG EPOsf et est dépourvu d'EPOsf non modifié, comme on le détermine par une analyse SDS-PAGE. Le mélange conjugué représente 23,4 mg, soit 78 %, du produit de départ. La séparation par chromatographie échangeuse de cations du mono- d'avec le di-PEG-EPOsf indique que le rapport du mono- au di-PEG dans le mélange conjugué est d'environ 1:1. Après la fin de la réaction, le rapport des composants individuels de mono:di non modifié est de 40:38:20 (%). Le rendement global est presque quantitatif.

25

Tableau 1. Résumé des résultats de la pégylation d'EPOsf

Echantillon	Protéine (mg)	Rendement (%)
Mélange de rxn	30	100
Mono-	12,0	40
di-	11,4	38
Non mod.	6,0	20
Mélange de conjugués	23,4	78

EXEMPLE 3 : Pégylation d'EPO avec mPEG-SPA

On fait réagir une fraction différente de l'EPOsf diffusée dans l'exemple 2 avec 30 kDa de méthoxy-PEG-SPA (Shearwaters Polymers, Inc., Huntsville, Alabama, Etats-Unis). On conduit la réaction avec un rapport protéine:réactif de 1:2, et les techniques de purification sont conformes à l'exemple 2. On produit principalement l'espèce monopéglée.

EXEMPLE 4 : Activité in vivo de l'EPO péglé déterminée par le dosage chez la souris normocythémique

Le dosage chez la souris normocythémique est connu chez le spécialiste (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) et un procédé dans la monographie de l'érythropoïétine du BRP de la Pharmacopée européenne. On dilue les échantillons avec SAB-STP. On administre par voie sous-cutanée à des souris normales en bonne santé âgées de 7 à 15 semaines 0,2 ml de la fraction d'EPO contenant l'EPO non péglé ou l'EPO tri-, di- ou monopéglée de l'exemple 2 ou 3. Pendant une période de 6 jours, on prélève le sang en ponctionnant la veine caudale et on le dilue de manière qu'un μ l de sang soit présent dans 1 ml d'une solution de coloration à l'orange d'acridine à 0,15 μ mole. La durée de coloration est de 3 à 10 minutes. On effectue les décomptes de réticulocytes par microfluorométrie dans un cytomètre à flux par analyse de l'histogramme de fluorescence rouge. On donne les décomptes de réticulocytes en termes de chiffres absolus (pour 30 000 cellules sanguines analysées). Pour les données présentées, chaque groupe consiste en 5 souris par jour, et l'on ne saigne chaque souris qu'une fois.

Dans des expériences séparées, on administre à des souris une seule dose d'EPO non modifié (25 ng d'EPO), le mélange PEG(SBA)-EPO de l'exemple 2 (10 ng de conjugué), les EPO mono- et dipéglés de l'exemple 2

011442

(10 ng de conjugué), le PEG(SPA)-EPO de l'exemple 3 (10 ng de conjugué), et une solution tampon. Ces résultats sont représentés au tableau 2. Ces résultats montrent l'activité supérieure et la demi-vie prolongée de l'espèce EPO pégylée indiquée par des quantités significativement accrues de réticulocytes et par le déplacement du décompte maximum de réticulocytes en utilisant la même dose par souris (10 ng), par comparaison avec une dose de 25 ng pour l'EPO non modifiée.

TABLEAU 2

	EPO (non modifié)	30 kDa de SPA PEG	Mono 30 K SBA	Di 30 K SBA	Mélange conju- gué PEG-EPO SBA	Tampon témoin
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

EXEMPLE 5 : Préparation de mono-PEG-EPO prédominant**Réaction de pégylation**

En commençant avec 100 mg (5,48 μ mole) d'EPOsf dans un tampon de phosphate de potassium 100 mM à pH 5,5 préparé selon l'exemple 1, on ajoute 329 mg (10,96 μ mole) de réactif PEG-SBA à 30 kDa dissous dans 3 ml d'HCl 1 N. On ajoute suffisamment de tampon de phosphate de potassium 100 mM à pH 7,5 pour compléter le volume de la réaction à 20 ml. La concentration finale de protéines est de 5 mg/ml et le rapport protéine:réactif de PEG est de 1:2. On malaxe le mélange réactionnel pendant 2 heures à la température ambiante (20-22°C). Au bout de 2 heures, on arrête la

011442

réaction en ajustant le pH à 4,5 avec de l'acide acétique glacial et on conserve à l'état congelé à -20°C jusqu'à ce qu'elle soit prête pour la purification.

5 **Purification**

On dilue le mélange réactionnel de l'étape précédente à 1:5 avec de l'acétate de sodium 10 mM, pH 7,5, et on l'applique à 300 ml de SP-Sepharose FF (résine échangeuse de cations sulfopropyle) versé dans
10 une colonne de 4,2 x 19 cm. On équilibre au préalable la colonne avec le même tampon. On suit les effluents de la colonne à 200 nm avec un moniteur Gilson UV et on enregistre avec un appareil Kipp et Zonen. On lave la colonne avec 300 ml ou un volume de lit de tampon
15 d'équilibrage pour enlever l'excès de réactifs, de sous-produits de réaction et de PEG-EPO oligomères. Ensuite, on lave avec 2 volumes de NaCl 100 mM pour retirer le di-PEG-EPO. On élue alors le mono-PEG-EPO avec 200 ml de NaCl. Au cours de l'élution du mono-PEG-
20 EPO, on jette les 50 premiers ml du pic protéique et on recueille le mono-PEG-EPO sous la forme d'une fraction de 150 ml. On élue l'EPOsf non modifié restant sur la colonne avec NaCl 750 mM. Tous les tampons d'élution sont préparés dans le tampon d'équilibrage. On analyse
25 tous les échantillons élus par SDS-PAGE et par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) haute performance. On concentre alors la masse de mono-PEG EPO obtenue à partir de la fraction de 150 ml, qui n'a pas d'EPOsf non modifié détectable, à environ 4,5 à 7,5
30 mg/ml et on effectue une diafiltration dans le tampon de stockage, phosphate de potassium 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. On effectue une concentration/diafiltration avec un système Millipore Labscale™ TFF équipé d'une membrane Millipore Pellicon XL Biomax 50 d'un seuil de
35 50 kDa à la température ambiante. On filtre de façon

011442

stérile le mono-PEG-EPO concentré et on le concentre congelé à -20°C .

On pégyle environ 75 % d'EPOsf. Après purification, le rendement total est d'environ 30 % de mono-PEG-EPO sans EPOsf non modifié détectable, et d'environ 25 % de di-PEG-EPO. Les oligomères et l'EPOsf non pégylé représentent la protéine restante. La masse de mono-PEG-EPO obtenue à partir de la fraction de 150 ml contient environ 90 % de mono-PEG-EPO et environ 10 % de di-PEG-EPO.

011442

LISTES DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES

(i) TITULAIRE :

- 5 (A) NOM : F. Hoffmann-La Roche AG
 (B) RUE : 124 Grenzacherstrasse
 (C) VILLE : Bâle
 (E) PAYS : Suisse
 (F) CODE POSTAL (ZIP) : CH-4070
 10 (G) TELEPHONE : (61) 688 11 11
 (H) TELEFAX : (61) 688 13 95
 (I) TELEX : 962 292 hlr ch

(ii) TITRE DE L'INVENTION : Conjugés d'érythropoïétine

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 3

15 (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR :

- (A) TYPE DE SUPPORT : Disquette
 (B) ORDINATEUR : Compatible IBM PC
 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION : WORD
 (D) LOGICIEL : PatentIn Release 2.0

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<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

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

011442

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

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

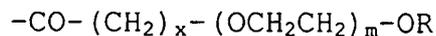
<400> 2
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp
 50 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 Arg
 165

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

<400> 3
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 20 25

REVENDEICATIONS

5 1. Conjugué, ledit conjugué comprenant une
glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un
groupe amino libre et ayant l'activité biologique in
vivo consistant à déclencher, sous l'action des
10 cellules de moelle osseuse, l'augmentation de la
production de réticulocytes et d'érythrocytes, et
choisie dans le groupe constitué par l'érythropoïétine
humaine et ses analogues qui ont la séquence de
l'érythropoïétine humaine modifiée par addition de 1 à
15 moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine
étant liée de façon covalente à "n" groupes
poly(éthylène glycol) de formule



20

le -CO de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant
une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où
R est un alkyle inférieur ;

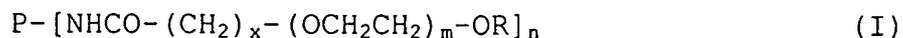
x vaut 2 ou 3 ;

25 m vaut d'environ 450 à environ 900 ;

n vaut de 1 à 3 ; et

n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire
du conjugué diminué de celui de la glycoprotéine
érythropoïétine soit compris entre 20 kD et 100 kD.

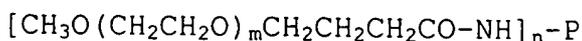
30 2. Conjugué de la revendication 1 de formule :



35 dans laquelle x, m, n et R sont tels que définis dans
la revendication 1 et P est le résidu d'une

011442

- glycoprotéine sans le ou les groupes n amino qui forment une ou plusieurs liaison(s) amide avec le ou les groupe(s) polyéthylène glycol.
3. Conjugué de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel R est un méthyle.
- 5 4. Conjugué de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel m vaut d'environ 650 à environ 750.
5. Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel n vaut 1.
- 10 6. Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel R est un méthyle, m vaut d'environ 650 à environ 750 et n vaut 1.
7. Conjugué de l'une quelconque des revendications précédentes ayant la formule
- 15



- dans laquelle m vaut de 650 à 750, n vaut 1 et P est tel que défini dans la revendication 1.
- 20 8. Conjugué de l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la glycoprotéine est une érythropoïétine humaine.
9. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel la glycoprotéine d'érythropoïétine humaine est exprimée par activation de gènes endogènes.
- 25 10. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel la glycoprotéine a la séquence SEQ ID NO:1.
11. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la glycoprotéine a la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par addition de 1 à 6 sites de glycosylation.
- 30 12. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel la glycoprotéine a la séquence
- 35

011442

d'érythropoïétine humaine modifiée par une modification choisie dans un groupe comprenant :

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

13. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel la glycoprotéine a la séquence
 25 comprenant la séquence d'érythropoïétine humaine et une seconde séquence à la terminaison carboxy de la séquence d'érythropoïétine humaine, dans laquelle la seconde séquence contient au moins un site de glycosylation.

14. Conjugué de la revendication 13, dans lequel les
 30 secondes séquences comprennent une séquence dérivée de la séquence carboxy terminale de gonadotropine chorionique humaine.

011442

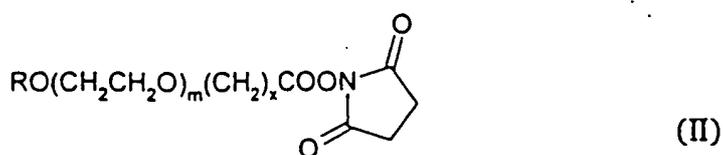
15. Conjugué de la revendication 13, dans lequel la glycoprotéine a la séquence choisie dans le groupe comprenant :
- (a) La séquence d'érythropoïétine humaine et la séquence SEQ ID NO:3 à la terminaison carboxy de la séquence d'érythropoïétine humaine ;
- (b) la séquence de (a) modifiée par Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ ; et
- (c) la séquence en (a) modifiée par Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.
16. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel la glycoprotéine a la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par une transposition d'au moins un site de glycosylation.
17. Conjugué de la revendication 16, dans lequel le réarrangement comprend une délétion de l'un quelconque des sites de glycosylation à liaison N dans l'érythropoïétine humaine et l'addition d'un site de glycosylation liés à l'azote en position 88 de la séquence d'érythropoïétine humaine.
18. Conjugué de la revendication 17, dans lequel la glycoprotéine a la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par une modification choisie dans le groupe comprenant :
- Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ ;
Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ ; et
Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.
19. Composition comprenant des conjugués, chacun desdits conjugués comprenant une glycoprotéine d'érythropoïétine ayant au moins un groupe amino libre et ayant l'activité biologique in vivo consistant à faire déclencher par les cellules de moelle osseuse une augmentation de la production de réticulocytes et d'érythrocytes, et choisis dans le groupe constitué par

- l'érythropoïétine humaine et ses analogues qui ont la séquence de l'érythropoïétine humaine modifiée par l'addition de 1 à 6 sites de glycosylation ou une transposition d'au moins un site de glycosylation ; ladite glycoprotéine étant liée de façon covalente à "n" groupes poly(éthylène glycol) de formule $\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$, le $-\text{CO}$ (c'est-à-dire carbonyle) de chaque groupe poly(éthylène glycol) formant une liaison amide avec l'un desdits groupes amino ; où R est un alkyle inférieur ; x vaut 2 ou 3 ; m vaut environ 450 à environ 900 ; n vaut de 1 à 3 et n et m sont choisis de manière que le poids moléculaire de chaque conjugué diminué de celui de la glycoprotéine érythropoïétine soit compris entre 20 kDaltons et 100 kDaltons ; le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est d'au moins 90 %.
20. Composition comprenant des conjugués tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 18, dans laquelle le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est d'au moins 90 %.
21. Composition selon les revendications 19 ou 20 dans laquelle le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est d'au moins 92 %.
22. Composition de la revendication 21, dans laquelle le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est d'au moins 96 %.
23. Composition de la revendication 19 ou 20, dans laquelle le pourcentage de conjugués dans lesquels n vaut 1 est compris entre 90 % et 96 %.
24. Composition pharmaceutique comprenant un conjugué ou une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 et un excipient pharmaceutiquement acceptable.
25. Utilisation d'un conjugué ou d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 23, pour

011442

La préparation de médicaments pour le traitement ou la prophylaxie des maladies liées à une anémie chez les malades souffrant d'insuffisance rénale chronique (CRF), du SIDA et pour le traitement des cancéreux en cours de chimiothérapie.

- 5 26. Procédé de préparation de composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 qui comprend la condensation du composé de formule II



- 10 avec une glycoprotéine d'érythropoïétine et dans laquelle R, m et x sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.
27. Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, préparés par le procédé de la revendication 27.
- 15 28. Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 pour le traitement des maladies associées à une anémie pour les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (CRF), du SIDA, et de cancers traités par chimiothérapie.
29. Nouveaux composés, procédés et méthodes utilisés ainsi qu'utilisation de tels composé substantiellement décrits ci-dessus.