



## Polietilén-glikollal képezett eritropoietin konjugátumok

### K I V O N A T

A találmány tárgyát az EPO PEG-származékainak új csoportja képezi. A találmány szerinti fiziológiailag aktív PEG-EPO konjugátumok olyan eritropoietin glikoproteint tartalmaznak, melynek legalább egy szabad aminocsoportja van és amely rendelkezik a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének növelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással és amely a következők bármelyike: humán eritropoietin és olyan analógjai, melyek primer szerkezete megegyezik az 1-6 glikozilációs hely hozzáadásával vagy legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított humán eritropoietin szerkezetével; a glikoprotein kovalensen hozzá van kötve 1-3 kis szénatomszámú alkoxi poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol mindegyik poli(etilén-glikol) csoport a glikoproteinhez kovalensen kötődik egy speciális szerkezetű linkeren keresztül. Az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 kilodaltontól mintegy 40 kilodaltonig változik, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 kilodaltontól mintegy 175 kilodaltonig változik.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti konjugátumok alkalmazása, valamint az azokat tartalmazó gyógyászati készítmények is.



P0201971

P0201971

**Polietilén-glikollal képezett eritropoietin  
konjugátumok**

A találmány tárgyát az EPO PEG-származékainak új csoportja képezi. A találmány szerinti fiziológiailag aktív PEG-EPO konjugátumok olyan eritropoietin glikoproteint tartalmaznak, melynek legalább egy szabad aminocsoportja van és amely rendelkezik a csontvelő sejtek retikulocita és vörsvértest termelésének növelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással és amely a következők bármelyike: humán eritropoietin és olyan analógjai, melyek primer szerkezete megegyezik az 1-6 glikozilációs hely hozzáadásával vagy legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított humán eritropoietin szerkezetével; a glikoprotein kovalensen hozzá van kötve 1-3 kis szénatomszámú alkoxi poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol mindegyik poli(etilén-glikol) csoport a glikoproteinhez kovalensen kötődik egy speciális szerkezetű linkerrel keresztül. Az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 kilodaltontól mintegy 40 kilodaltonig változik, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 kilodaltontól mintegy 175 kilodaltonig változik.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti konjugátumok alkalmazása, valamint az azokat tartalmazó gyógyászati készítmények is.



Az eritropoiezis a vörösvértetek termelésének folyamata, amely a sejtek szétesésének ellensúlyozására szolgál. Az eritropoiezis egy szabályozott fiziológiai mechanizmus, amely lehetővé teszi kellő számú vörösvértest rendelkezésre állását a szövetek megfelelő mennyiségű oxigénnel való ellátására. A természetes körülmények között előforduló humán eritropoietin (hEPO) egy 165 aminosavat tartalmazó glikoprotein, amely a vesében termelődik és ez az a humorális plazma faktor, amely serkenti a vörösvértetek termelődését [Carnot és Deflandre: C.R. Acad. Sci. 143 432 (1906); Erslev: Blood 8 349 (1953); Reissmann: Blood 5 372 (1950); Jacobson és mtsai.: Nature 179 6331 (1957)]. A humán EPO stimulálja az elkötelezett eritroid progenitor sejtek osztódását és differenciálódását a csontvelőben. A humán EPO biológiai aktivitását az eritroid prekurzorokon található receptorokhoz kötődve fejti ki [Krantz: Blood 77 419 (1991)]. A természetes körülmények között előforduló humán eritropoietin egy savas glikoprotein, amely alacsony koncentrációkban található a plazmában az öregedésük során elvesztett vörösvértetek pótlásának serkentésére.

Az eritropoietint már előállították bioszintetikus módszerekkel rekombináns DNS technológiát alkalmazva [Egrie és mtsai.: Immunobiol. 72 213 (1986)] és ez a kínai hörcsög petefészek szövet sejtjeibe (CHO sejtek) beillesztett és ott expresszált klónozott humán EPO gén terméke. A természetes körülmények között előforduló humán EPO először egy 166 aminosavat tartalmazó polipeptid láncba transzlálódik, amely arginint tartalmaz a 166. pozícióban. Egy poszt-



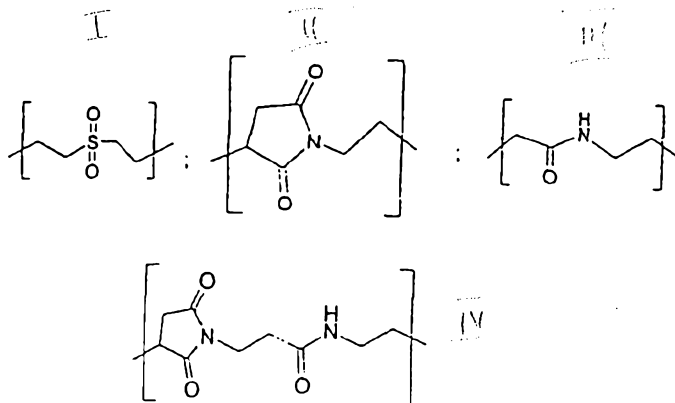
transzlációs módosítás során a 166. arginint karboxipeptidáz hasítja le. A humán EPO (165 aminosav) primer szerkezetét az 1. ábrában mutatjuk be. A humán EPO (166 aminosav) primer szerkezetét a 2. ábrában mutatjuk be. Két diszulfid híd található a  $^7\text{Cys}-^{161}\text{Cys}$  és a  $^{29}\text{Cys}-^{33}\text{Cys}$  aminosavak között. A humán EPO polipeptid lánc molekulatömege a cukor részegységek nélkül 18.236 Da. A teljes EPO molekulában a molekulatömeg mintegy 40 százalékát teszik ki a szénhidrát csoportok [Sasaki és mtsai.: J. Biol. Chem. 262 12059 (1987)].

Mivel az eritropoietin létfontosságú a vörösvértetek kialakulása során, a hormon jól alkalmazható olyan vér rendellenességek kezelésére, amelyekre a vörösvértetek alacsony szintű vagy hibás termelődése jellemző. Klinikailag az EPO-t például anémia kezelésére alkalmazzák krónikus vese elégtelenségben (CRF) szenvedő pácienseken [Eschbach és mtsai.: NEJM 316 73 (1987); Eschbach és mtsai.: Ann. Intern. Med. 111 992 (1989); Egrie és mtsai.: Kidney Intl. 33 262 (1988); Lim és mtsai.: Ann. Intern. Med. 110 108 (1989)], valamint AIDS esetén és kemoterápián áteső rák betegek kezelésében [Danna és mtsai., In: Erythropoietin in Clinical Applications - An International Perspective, szerk: Garnick, 301-324. old., Marcel Dekker, New York, (1990)]. Azonban a jelenleg hozzáférhető terápiás fehérje készítmények - mint például az EPO - biológiai rendelkezésre állása korlátozott ezek rövid plazma fél-életideje miatt és a proteázok lebontó hatása következtében. Ezek a hiányosságok megakadályozzák, hogy az ilyen készítmények elér-



jék maximális klinikai potenciájukat.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát EPO PEG-származékainak új csoportja képezi. A találmány szerinti fiziológiailag aktív PEG-EPO konjugátumok olyan eritropoietin glikoproteint tartalmaznak, amelynek legalább egy szabad aminosocsoportja van és amely rendelkezik a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének növelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással és amely a következők bármelyike lehet: humán eritropoietin és analógjai, amelyek primer szerkezete megegyezik a humán eritropoietin szerkezetével, 1-6 glikozilációs hely hozzáadásával módosítva; ez a glikoprotein kovalensen kötődik egy-három kis szénatomszámú alkoxi poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol mindegyik poli(etilén-glikol) csoport a glikoproteinhez kovalensen kötődik egy linkeren keresztül, amely linker képlete a következő:  $-C(O)-X-S-Y-$ ; ahol a linker C(O) csoportja amid kötést alakít ki a fentebb említett amino csoportok egyikével, és ahol az X  $-(CH_2)_k$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$  részletet jelöl, amelyben a k értéke 1-10-ig terjedhet, az Y pedig az I-IV. képlettel jellemzett molekularészletek bármelyike lehet.





Az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 kilodaltontól mintegy 40 kilodaltonig változik, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 kilodaltontól mintegy 175 kilodaltonig változik. A találmány tárgyát képezik még továbbá olyan készítmények, amelyek a találmány szerinti konjugátumokat tartalmazzák és amelyekben ezeknek a konjugátumoknak a százalékos mennyisége olyan készítményben ahol n az 1, legalább kilencven százalék.

A módosíthatlan EPO-val (azaz olyan EPO-val, amelyhez nincs PEG hozzákapcsolva), és a hagyományos PEG-EPO konjugátumokkal összehasonlítva a találmány szerinti konjugátumok megnövekedett keringési féléletidővel és a plazmában fennmaradási idővel rendelkeznek, csökkent a kiürülésük és megnövekedett *in vivo* klinikai aktivitást mutatnak. A találmány szerinti konjugátumok alkalmazási területe megegyezik az EPO alkalmazási területével. Közelebbről meghatározva, a találmány szerinti konjugátumok jól alkalmazhatóak páciensek kezelésére a csontvelőben az elkötelezett eritroid progenitor sejtek osztódásának és differenciálódásának stimulálásán keresztül ugyanúgy, mint ahogy az EPO-t alkalmazzuk páciensek kezelésére.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás is a vérszegénység kezelésére emberekből. A találmány tárgyát képezi eljárás olyan eritropoietin glikoprotein termékek előállítására, amely során kovalensen reagáltatjuk eritropoietin fehérje lizin aminosavának az  $\epsilon$ -aminocsoportját egy két-funkciós reagenssel, így egy amid kötést tartalmazó köztes



terméket kialakítva. A kétfunkciós reagens egy reagáló csoportot és egy védett tiol csoportot tartalmaz. Az amidkapcsolt köztes terméket ezután kovalens módon reagáltatjuk aktivált polietilén-glikol származékkal, ezzel kialakítva a találmány szerinti eritropoietin glikoprotein terméket.

Az 1. ábra a humán EPO primer szerkezetét mutatja be (165 aminosav).

A 2. ábra a humán EPO primer szerkezetét mutatja be (166 aminosav).

A 3. ábra a PEG-gel kapcsolt EPO *in vivo* aktivitást mutatja be, amelyet normocitemiás egér vizsgálati eljárás segítségével határoztunk meg.

#### Meghatározások:

Az alább következő kifejezések alatt a leírás során az itt leírtakat értjük:

Az "eritropoietin fehérje", "eritropoietin", "EPO" vagy "eritropoietin glikoprotein" kifejezések alatt olyan glikoproteint értünk, amely az 1. ábrán (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) vagy a 2. ábrán (2. azonosítási szám szerinti szekvencia) bemutatott szekvenciával rendelkezik, vagy olyan fehérjét illetve polipeptidet értünk, amely ezekkel lényegében homológ és amelynek biológiai tulajdonságai a vörösvértest termelés stimulálásával és a csontvelőben az elkötelezett eritroid progenitor sejtek osztódásának és differenciálódásának stimulálásával összefüggésben vannak. A leírás szerint az EPO-fehérje kifejezés magába foglal olyan fehérjéket, amelyeket szándékosan módosítottunk - például hely specifikus mutagenezissel - vagy



véletlenül módosultak, például mutációk következtében. Ezek a kifejezések szintén magukba foglalják az 1-6 további glikozilációs hellyel rendelkező analógokat, a fehérje karboxi végén legalább egy további aminosavat tartalmazó analógokat, ahol a további aminosav(aminosavak) legalább egy glikozilációs helyet tartalmaznak, illetve magukban foglalnak olyan analógokat, amelyek aminosav szekvenciájában tartalmazzák legalább egy glikozilációs hely átrendeződését, mint például a 640619 lajstromszámú európai szabadalmi bejelentésben közzétett analógokat. Ezek a kifejezések magukban foglalják mind a természetes úton, mind a rekombináns módon előállított humán eritropoietint.

A "lényegében homológ" kifejezés alatt azt értjük, hogy az adott tárgyalt szekvencia - mint például egy mutáns szekvencia - egy referencia szekvenciától egy vagy több szubsztitúcióban, delécióban vagy addícióban tér el, amelyek összhatása nem eredményezi a referencia és a tárgyalt szekvencia hátrányos funkcionális különbözőségét. A találmány szerint a nagyobb, mint 95% homológiát mutató, egyenértékű biológiai tulajdonságokkal rendelkező és egyenértékű expressziós jellemzőkkel rendelkező szekvenciákat tekinthetjük lényegében homológoknak. A homológia meghatározása szempontjából az érett szekvencia lerövidítését figyelmen kívül hagyjuk. A kisebb mértékű homológiát mutató, összehasonlítható bioaktivitású és egyenértékű expressziós jellemzőkkel rendelkező szekvenciákat lényegében egyenértékűnek tekinthetjük.



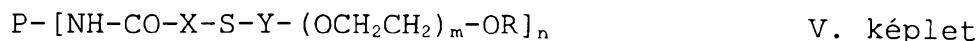
Az "EPO-fehérje fragmens" kifejezés alatt olyan fehérjét vagy polipeptidet értünk, amely EPO-fehérje részének vagy fragmensének aminosav szekvenciájával rendelkezik és rendelkezik az EPO biológiai aktivitásával. A fragmens kifejezés magába foglal fehérjéket vagy polipeptideket, amelyeket az EPO-fehérje proteolitikus lebontásával állítottunk elő, vagy amelyeket a technika állása szerint jól ismert eljárások segítségével kémiai szintézissel állítottunk elő. EPO-fehérje vagy annak fragmense biológiailag aktív, ha a fehérje vagy fragmens emberbe való beadása a vörösvértestek termelésének stimulálását és a csontvelőben az elkötelezett eritroid progenitor sejtek osztódásának és differenciálódásának stimulálását eredményezi. Az EPO-fehérje ilyen biológiai aktivitásának meghatározása elvégezhető hagyományos, a technika állása szerint jól ismert vizsgálatok segítségével, amelyeket emlősök egy vagy több fajában alkalmaztak ilyen célokra. Egy megfelelő tesztet, amely alkalmazható az ilyen biológiai aktivitás kimutatására, ismertetünk az alábbiakban.

A "terápiásan hatékony mennyiség" kifejezés alatt olyan mennyiségű eritropoietin glikoprotein terméket értünk, amely szükséges a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének megnövelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitáshoz. Az eritropoietin glikoprotein termék pontos mennyisége a szakember ismeretei szerint kiválasztható, de a következő tényezőktől függ: a kezelendő pontos körülményektől, a kezelendő páciens állapotától és ugyanúgy a készítmény más összetevőitől is. Az eritropoietin gliko-



protein termékeket tartalmazó gyógyászati készítmények különböző módokon történő beadáshoz megfelelő hatékony erősségben formulázhatók vérrel kapcsolatos rendellenességekben szenvedő emberi páciensnek, ahol a problémákat az alacsony vagy hibás vörösvértest termelés jellemzi. Az eritropoietin glikoprotein termék átlagos terápiásan hatékony mennyiségei változóak lehetnek, és közelebbről meghatározva a szakképzett orvos javaslatai és felírása alapján határozhatóak meg.

A találmány tárgyát eritropoietin glikoprotein termékek képezik, amelyek rendelkeznek a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének megnövelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással, ezeket az alábbi V. képlettel foglalhatjuk össze:



ahol X és Y a fentebb meghatározott molekularészeket jelenti, m értéke 450-900 között lehet, n értéke 1-3 között lehet, R kis szénatomszámú alkil csoportot jelöl és P eritropoietin glikoproteint jelöl az aminocsoport vagy aminocsoportok nélkül amelyek X-szel amidkötést alkotnak. Amit ezt alább részletesen ismertetjük, az EPO előállítása és tisztítása a technika állása szerint jól ismert. EPO rövidítés alatt természetes eredetű vagy rekombináns fehérjét értünk, előnyösen humán fehérjét, amelyet bármely hagyományos forrásból szereztünk be, mint például szövetek, fehérje szintézis, természetes eredetű vagy rekombináns sejt te-



nyészet. A találmány tárgyát képezi bármely olyan fehérje amely az EPO aktivitásával rendelkezik, mint például muteinek vagy másképp módosított fehérjék. Rekombináns EPO előállítható CHO, BHK vagy HeLa sejtvonalak alkalmazásával történő expresszióval, rekombináns DNS technológiával vagy endogén gén aktiválással, azaz például az eritropoietin glikoproteint endogén gén aktiválással expresszálhatjuk. Az eritropoietin glikoprotein termékek előállítására előnyösen alkalmazható EPO típusok a humán EPO típusok. Még előnyösebben az EPO típusok azok a humán EPO-k, amelyek az 1. ábrán (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) vagy a 2. ábrán (2. azonosítási szám szerinti szekvencia) bemutatott aminosav szekvenciával rendelkeznek, legelőnyösebbek azok a humán EPO-k, amelyek az 1. ábrán (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) bemutatott aminosav szekvenciával rendelkeznek.

A humán eritropoietin fehérje ugyanakkor módosítható úgy is, hogy legalább egy további glikozilációs helyet tartalmazzon, például 1-6 további glikozilációs helyet, mint például az alábbi, nem korlátozó értelemben bemutatott aminosav szekvenciák. Az alábbi megjegyzés azt jelzi, hogy az 1. ábrában ismertetett szekvenciát módosítottuk úgy, hogy a felső indexben megadott számozott pozícióban található természetes eredetű aminosavat helyettesítettük a felső indexben megadott számtól balra álló aminosavval.

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup> 1. ábra;

Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup> 1. ábra;

Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup> 1. ábra;



Asn<sup>69</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup> 1. ábra;  
Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup> 1. ábra;  
Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup> 1. ábra;  
Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup> 1. ábra;  
Thr<sup>125</sup> 1. ábra; és  
Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup> 1. ábra;

A humán eritropoietin fehérje lehet még olyan analóg is, amely legalább egy további aminosavval rendelkezik a glikoprotein karboxi terminálisán, ahol a további aminosav legalább egy glikozilációs helyet tartalmaz; azaz a glikoprotein szekvenciája tartalmazza a humán eritropoietin szekvenciáját és egy második szekvenciát a humán eritropoietin szekvencia karboxi terminálisán, ahol a második szekvencia legalább egy glikozilációs helyet tartalmaz.

A további aminosav tartalmazhat a humán "chorionic" gonadotropin karboxi terminális végéről származó peptid fragmenst is. Előnyösen a glikoprotein analóg a következők bármelyike lehet: (a) karboxi terminálisról kiinduló humán

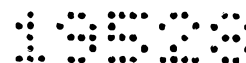


eritropoietin, amelynek szekvenciája a következő: Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (3. azonosítási szám szerinti szekvencia); (b) az (a) pontban ismertetett szekvencia analógja, amely továbbá tartalmazza a Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO-fehérjét; és (c) az (a) pontban ismertetett szekvencia analógja, amely továbbá tartalmazza az Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO-fehérjét.

A humán eritropoietin fehérje lehet még továbbá olyan analóg is, amely szekvenciájában legalább egy glikozilációs hely átrendeződését tartalmazza. Az átrendeződés magába foglalhatja bármely N-kapcsolt szénhidrát kötőhely delécióját a humán eritropoietinből és egy N-kapcsolt szénhidrát kötőhely addícióját a humán eritropoietin aminosav szekvenciájának 88. pozíciójában. Előnyösen a glikoprotein analóg a következők bármelyike lehet: 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 és Gln<sup>83</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO.

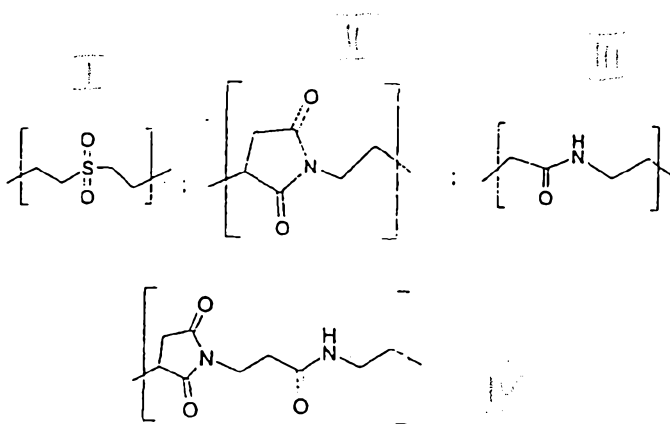
További glikozilációs helyekkel rendelkező eritropoietin analógokat ismertettek Elliot 640619 lajstromszámú, 1995 március 1-én leközlött európai szabadalmi bejelentésében, amely teljes egészében a kitanítás részének tekintendő.

Az V. általános képletben R bármely kis szénatomszámú alkilcsoport lehet, amely alatt 1-6 szénatomot tartalmazó lineáris vagy elágazó alkil csoportot értünk, mint például metil, etil, izopropil, stb. csoportokat. Előnyösen alkalmazható alkil csoport a metil csoport.

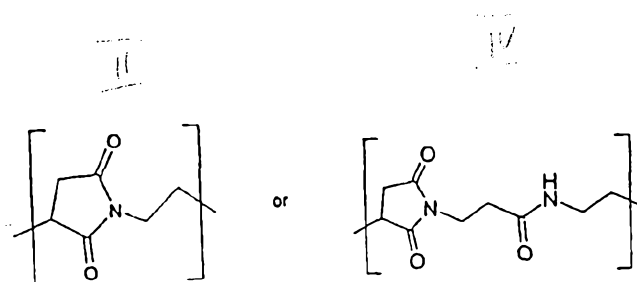


Az V. általános képletben az X  $-(CH_2)_k-$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$  molekularészlet lehet, ahol k értéke 1 és mintegy 10 között változhat. Előnyösen k értéke 1 és mintegy 4 között változik, előnyösebben k értéke 1 vagy 2 lehet. Legelőnyösebben az X  $-(CH_2)-$  csoportot jelöl.

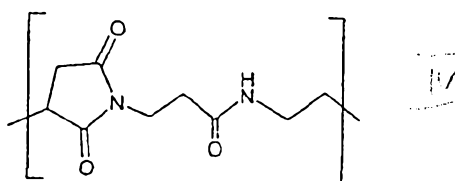
Az V. általános képletben az Y az I-IV. képletekkel jellemzett csoportok bármelyike lehet.



Előnyösen Y a II. és IV. képletekkel jellemzett csoportok bármelyike,



legelőnyösebben Y a IV. képlettel jellemzett csoport.



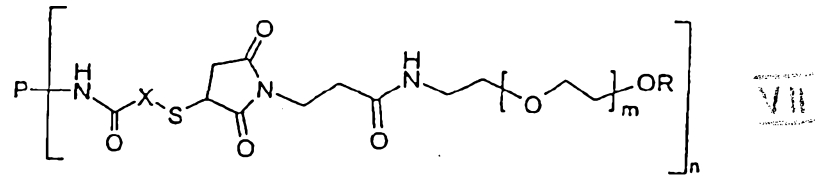
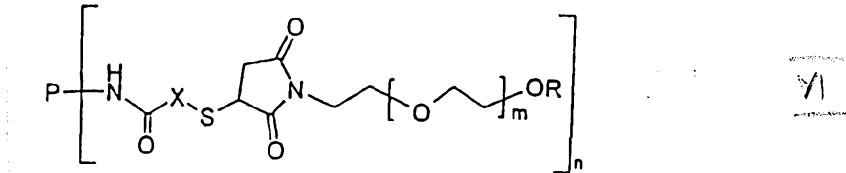


Az V. képletben az  $m$  számot úgy választjuk meg, hogy az eredményül kapott V. képletben feltüntetett konjugátumnak a módosíthatlan EPO-val összehasonlítható fiziológiai aktivitása legyen, amely aktivitás jelentheti a módosíthatlan EPO megfelelő aktivitásának azonos mértékét, annál többet, vagy annak részét. Az  $m$  szám az etilén-oxid csoportok számát jelenti a PEG egységben. Egyetlen  $-(OCH_2CH_2)-$  PEG alegység molekulatömege mintegy 44 dalton. Ebből következik, hogy a konjugátum molekulatömege (nem számítva bele az EPO molekulatömegét) az  $m$  számtól függ. A molekulatömegnél az egy adott szám „mintegy” értéke kifejezés alatt azt értjük, hogy az érték a számhoz képest reális tartományon belül van, ahogy azt hagyományos analitikai eljárásokkal meghatároztuk. Az  $m$  szám egész szám, amely mintegy 450 és mintegy 900 tartományba esik (ez megfelel egy 20 és 40 kDa közötti tartományt átfogó molekulatömegnek), előnyösen az  $m$  szám értéke mintegy 550 és mintegy 800 közé esik (mintegy 24-35 kDa) és legelőnyösebben az  $m$  szám értéke mintegy 650 és mintegy 700 közé esik (mintegy 29 és mintegy 31 kDa közötti molekulatömeg tartomány).

Az V. képletben az  $n$  szám egy eritropoietin fehérje azon lizin aminosavainak számát jelenti, amelyek  $\epsilon$ -aminocsoportjai amidkötéssel kovalens kötéssel keresztül kapcsolódnak egy PEG egységhez. A találmány szerinti konjugátum EPO molekulánként egy, kettő vagy három PEG egységet tartalmazhat. Az  $n$  szám egész szám, amelynek értéke 1 és 3 közé esik, előnyösen  $n$  értéke 1 vagy 2, és előnyösebben  $n$  értéke 1.

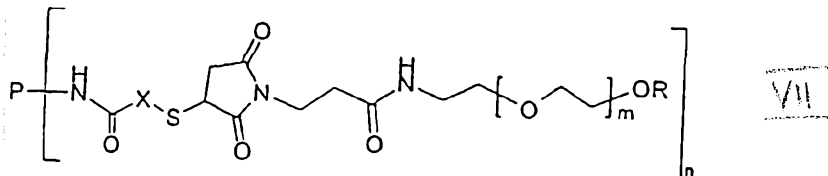


Előnyösen alkalmazható eritropoietin glikoprotein termékek lehetnek a VI. és VII. képletek által reprezentált molekulák,



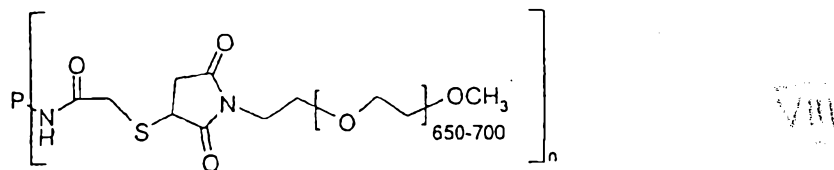
ahol P, R, X, m és n értékei a fentebb meghatározott értékek lehetnek.

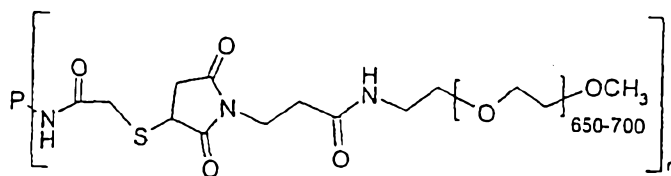
A legelőnyösebben alkalmazható eritropoietin glikoprotein termékek a VII. képlet által reprezentált molekulák,



ahol P, R, X, m és n értékei a fentebb meghatározott értékek lehetnek.

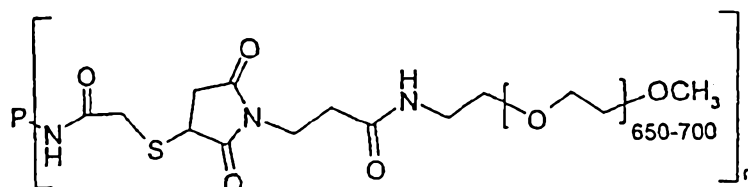
További előnyösen alkalmazható eritropoietin glikoprotein termékek lehetnek a VIII. és IX. képletek által reprezentált molekulák,





ahol P és n értékei a fentebb meghatározott értékek lehetnek.

Előnyösebben alkalmazható eritropoietin glikoprotein termékek lehetnek a IX. képlet által reprezentált molekulák,



ahol P és n értékei a fentebb meghatározott értékek lehetnek.

Előnyösen alkalmazható vegyületeknek tekinthetők azok, amelyekben X a  $-(CH_2)_k-$  csoportot reprezentálja, közelebből meghatározva azok, amelyek esetében k értéke az 1-4 tartományba esik, legelőnyösebben alkalmazható vegyületek azok, ahol az X csoport  $-CH_2-$  csoportot reprezentál.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan fentiek szerinti konjugátumok, amelyeknél m egy 550-800 közötti tartományba eső egész szám, előnyösen m egy 650-700 közötti tartományba eső egész szám.

A találmány szerinti előnyösen alkalmazható vegyületeknek tekinthetők azok, amelyek esetében n értéke 1 és/vagy R metil csoportot képvisel.



Továbbá a találmány tárgyát képezik a fentiek szerinti vegyületek, amelyekben az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 24 kilodaltontól mintegy 35 kilodaltonig terjed, még előnyösebben mintegy 30 kilodaltonig terjed.

Továbbá, a találmány tárgyát képezik olyan vegyületek amelyekben a glikoproteint kovalensen kapcsoltuk egy vagy két kis szénatomszámú alkoxi csoporttal lezárt poli(etilén-glikol) részegységhez, még előnyösebben egy kis szénatomszámú alkoxi csoporttal lezárt poli(etilén-glikol) részegységhez.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva a poli(etilén-glikol) részegységeket metoxi csoporttal zárjuk le.

A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint eljárva olyan találmány szerinti fentebb ismertetett vegyületeket hozunk létre, amelyekben az X -CH<sub>2</sub>- csoportot jelöl, m egy 650-700 közé eső egész szám, n értéke 1, R metil csoportot jelöl és az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 30 kilodalton.

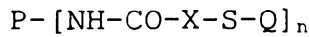
A találmány egy további megvalósítási módja szerint eljárva eljárást dolgozunk ki vérszegénység kezelésére emberekben, amely eljárás során az V. képlet szerinti eritropoietin glikoprotein termék terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be a páciensnek.

A találmány egy még további megvalósítási módja szerint eljárva módszert dolgozunk ki a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének növekedését kiváltó



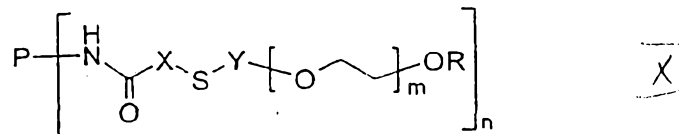
*in vivo* biológiai aktivitással rendelkező eritropoietin glikoprotein termék előállítására, amely eljárás a következő lépéseket foglalja magába:

(a) a  $P-[NH_2]_n$  képlettel reprezentált eritropoietin fehérje lizin aminosavának  $\epsilon$ -amino csoportjával kovalensen reagáltatunk egy kétfunkciós reagenst, amelyet a  $Z-CO-X-S-Q$  képlet reprezentál, hogy így az alábbi képlettel jellemezhető amidkötést tartalmazó köztes terméket hozzuk létre:



ahol P az amidkötést kialakító aminocsoport nélküli eritropoietin fehérje, n értéke 1-3 közötti egész szám, Z egy reaktív csoportok képvisel, mint például karboxil-NHS észter, X  $-(CH_2)_k-$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$  csoportot jelöl, ahol k értéke 1 és mintegy 10 közé eső egész szám és Q védőcsoportot jelent, amilyen például egy alkanoil csoport, mint például acetil.

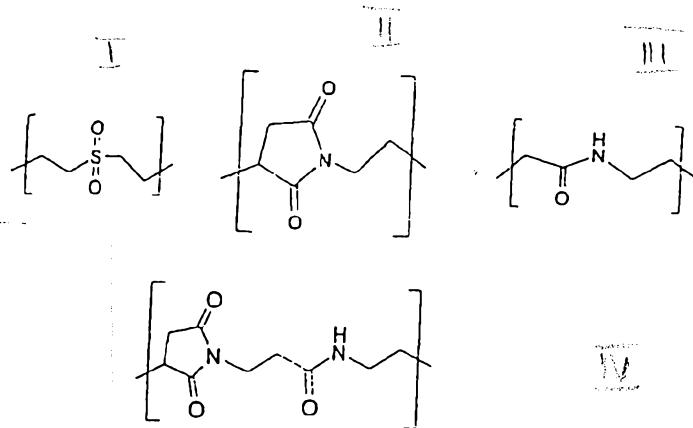
(b) az (a) lépésből származó, amidkötést tartalmazó köztes terméket kovalensen reagáltatjuk a  $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$  képlettel reprezentált aktivált polietilén-glikol származékkal, hogy a X. képlettel jellemezhető eritropoietin glikoprotein terméket hozzunk létre,



amely képletben W az Y csoport szulfhidril reaktív alakja, m értéke egy mintegy 450 és mintegy 900 közötti tartományba eső egész szám, R kis szénatomszámú alkil csoportot jelöl és Y az I-IV. képletekkel jellemezhető csoport



tok bármelyike lehet.

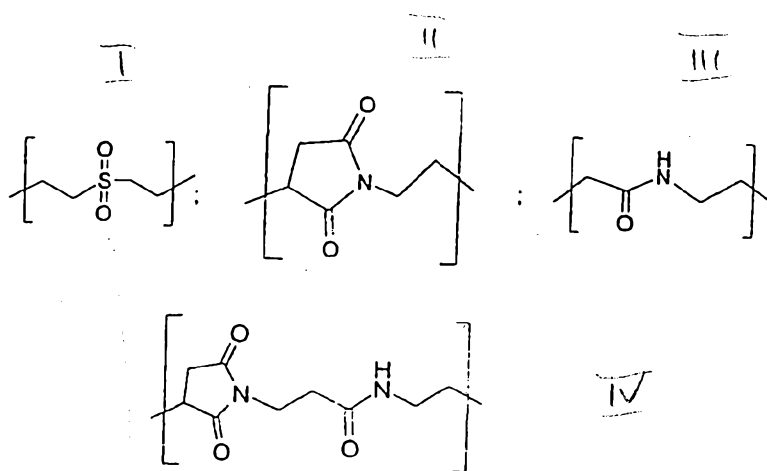


A találmány ezen megvalósítási módja szerint eljárva kétfunkciós reagensként előnyösen N-szukcinimidil-S-acetil-tiopropionátot vagy N-szukcinimidil-S-acetil-tioacetátot alkalmazunk, Z előnyösen N-hidroxi-szukcinimid és a W-[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>-OR aktivált polietilén-glikol származék előnyösen az alábbiak bármelyike lehet: jódacetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinil-szulfon és metoxi-PEG-maleimid.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint eljárva olyan konjugátumokat tartalmazó készítményt alkalmazunk, amelyben mindegyik konjugátum tartalmaz legalább egy szabad amino csoporttal rendelkező eritropoietin glikoproteint, amely rendelkezik a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének megnövelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással és amely a következők bármelyike lehet: humán eritropoietin és analógjai, amelyek a humán eritropoietin 1-6 glikozilációs hely addíciójával vagy legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított primer struktúrájával rendelkeznek; amely glikoprotein kovalensen kapcsolódik egy-három kis szénatomszámú alkoxi-poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol mindegyik poli(etilén-

glikol) csoport kovalensen kötődik a glikoproteinhez egy -C(O)-X-S-Y- képlettel jellemezhető linkeren keresztül, amelyben a linker C(O) csoportja amid kötést alakít ki az egyik említett amino csoporttal;

X csoport  $-(CH_2)_k-$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$  csoportot jelöl, amelyekben k értéke 1-10 között lehet és Y az I-IV. képlettel jellemezhető molekularészletek bármelyike lehet;



az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 kilodaltontól mintegy 40 kilodaltonig változik, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 kilodaltontól mintegy 175 kilodaltonig változik; és a készítményben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben n értéke 1, legalább kilencven százalék. Előnyösen a készítmény a fentiek szerint meghatározott konjugátumokat tartalmazza, ahol azon konjugátumok százalékos mennyisége, amelyekben n értéke 1, legalább kilencven százalék; még előnyösebben azon konjugátumok százalékos mennyisége, amelyekben n értéke 1, legalább kilencvenkét százalék, még mindig előnyösebben azon konjugátumok százalékos mennyisége, amelyekben n értéke 1, legalább kilencvenhat százalék



és legelőnyösebben azon konjugátumok százalékos mennyisége, amelyekben  $n$  értéke 1, kilencven százaléktól kilencvenhat százalékgig terjedhet.

Továbbá, a találmány tárgyát képezi gyógyászati készítmény amely a fentiek szerint meghatározott konjugátumot vagy készítményt és egy gyógyászatilag elfogadható excipienst tartalmaz, továbbá a találmány tárgyát képezi a fentiek szerint meghatározott konjugátum vagy készítmény alkalmazása gyógyhatású anyagok előállítására vérszegénységgel kapcsolatos betegségek kezelésére vagy profilaxisára krónikus veseelégtelenségben (CRF), AIDS-ben szenvedő páciensekben, valamint a kemoterápián áteső rákos betegek kezelésére. Továbbá a találmány tárgyát képezi egy eljárás vérszegénységgel kapcsolatos rendellenességek profilaktikus és/vagy gyógyító kezelésére krónikus veseelégtelenségben (CRF) és AIDS-ben szenvedő páciensek, valamint kemoterápián áteső rákos betegek esetében, amely eljárás során a páciensnek a fentiekben meghatározott készítményt beadjuk.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás is a fentiek szerint meghatározott konjugátumok vagy készítmények előállítására, amely eljárás során tiol-csoportokat kovalensen kapcsolunk eritropoietin glikoproteinhez és az eredményül kapott aktivált eritropoietin glikoproteint poli(etilén-glikol) (PEG) származékkal kapcsoljuk össze. Továbbá a találmány tárgyát képezik a fentiek szerint meghatározott konjugátumok és készítmények, amelyeket bármely fentebb ismertetett eljárással állítunk elő, és továbbá a találmány tárgyát képezi a fentiek szerint meghatározott konjugátumok



és készítmények alkalmazása vérszegénységgel kapcsolatos betegségek kezelésére krónikus veseelégtelenségben (CRF) és AIDS-ben szenvedő páciensekben, valamint kemoterápián áteső rákos betegek esetében.

Módszerek EPO fehérjék expressziójára:

Az eritropoietin (EPO) egy humán glikoprotein, amely az eritrociták kialakulását stimulálja. Előállítását és terápiás alkalmazását részletesen leírták a következő publikációkban: 5,547,933 és 5,621,080 lajstromszámú US szabadalmak; EP-B 0 148 605 lajstromszámú európai szabadalom; Huang és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2708 (1984); EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 és EP-B 0 411 678 lajstromszámú európai szabadalmak; valamint Lai és mtsai.: J. Biol. Chem 261 3116 (1986); Sasaki és mtsai.: J. Biol. Chem. 262 12059 (1987). Terápiás alkalmazásra az eritropoietin előállítható rekombináns módon [EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 lajstromszámú európai szabadalmak, Egrie és mtsai.: Immunobiol. 72 213 (1986)]. Fehérjék - beleértve az EPO-fehérjét is - expressziója endogén gén aktiválással a technika állása szerint jól ismert, ismertették például a következő publikációkban: 5,733,761, 5,641,670, 5,733,746 lajstromszámú US szabadalmakban és a WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 és WO 91/09955 lajstromszámú nemzetközi szabadalmi bejelentésekben, ezen publikációk tartalma teljes egészében a kitanítás részének tekintendő.

Az eritropoietin szérumentes táptalajban történő expressziójára és előállítására szolgáló eljárásokat ismer-



tettek például a következő publikációkban: Burg: WO 96/35718 lajstromszámú nemzetközi szabadalomban; nyilvánosságra hozva 1996. november 14-én, valamint Koch: 513 738 lajstromszámú európai szabadalmi bejelentésben, nyilvánosságra hozva 1992. június 12-én.

Módszerek humán EPO fehérjék tisztítására:

A fenti referenciákban hivatkozott módszereken kívül ismert, hogy EPO gént tartalmazó rekombináns CHO sejtek szérummentes fermentációja is megvalósítható. Ilyen eljárásokat ismertetnek például a következő publikációk: EP-A 0 513 738 és EP-A 0 267 678 lajstromszámú európai szabadalmak; illetve általános formában a következők: Kawamoto és mtsai.: Analytical Biochem. 130 445 (1983); EP-A 0 248 656 lajstromszámú európai szabadalom; Kowar és Franek: Methods in Enzymology 421 277 (1986); Bavister: Expcology 271 45 (1981); EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635 és WO 88/00967 lajstromszámú szabadalmi dokumentumok.

Az EP-A 0 267 678 lajstromszámú szabadalomban ismertették a szérummentes tenyészetben előállított EPO dialízis utáni tisztítására szolgáló S-Sepharose-on végzett ioncserés kromatográfiáját, C<sub>8</sub> oszlopon végrehajtott preparatív fordított fázisú HPLC-t és gélszűréses kromatográfiát. Ebben az összefüggésben a gélszűréses kromatográfiás lépés helyettesíthető Fast Flow S-Sepharose oszlopon végzett ioncserés kromatográfiával. Javasolható továbbá az is, hogy Blue Trisacryl oszlopon végzett festék kromatográfiát végezzünk az ioncserés kromatográfia előtt.



Rekombináns EPO tisztítására szolgáló eljárást ismertettek Nobuo és munkatársai [Nobuo és mtsai.: J. Biochem. 107 352 (1990)]. Ezen eljárás során az EPO-fehérjét a tisztítási lépés előtt a következőket tartalmazó oldattal kezeljük: Tween<sup>®</sup> 20, fenil-metil-szulfonil fluorid, etil-maleimid, pepsztatin A, réz-szulfát és oxámsav.

Több referencia, mint például a Burg: WO 96/35718 lajstromszámú nemzetközi szabadalom; nyilvánosságra hozva 1996. november 14-én, eljárást ismertet az eritropoietin előállítására szérumentes fermentációs eljárással (EPOsf). Az alább következőkben példaképpen ismertetünk egy EPO előállítására szolgáló eljárást a PEG-gel végzett kapcsolás kiinduló anyagának a létrehozására.

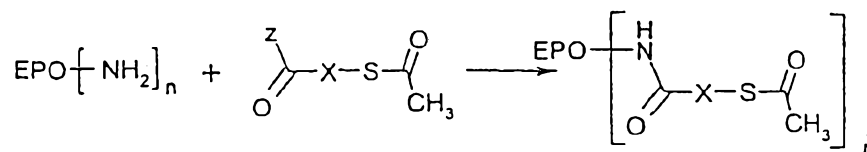
Biológiai vizsgálati módszer EPO és EPO konjugátumok specifikus aktivitásának meghatározására:

A találmány szerinti EPO vagy EPO-konjugátumok specifikus aktivitása meghatározható számos, a technika állása szerint jól ismert eljárás segítségével. A találmány szerinti tisztított EPO-fehérjék biológiai aktivitása olyan, hogy humán páciensekben az EPO-fehérje injekcióval történő bejuttatása megnöveli a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelését a nem-injektált vagy kontroll csoporthoz képest. A találmány szerint előállított és tisztított EPO-fehérjék vagy fragmenseik biológiai aktivitása a következő publikációban ismertetett eljárásokkal tesztelhető: Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

Az EPO-fehérje aktivitásának meghatározására egy másik biológiai vizsgálati eljárást, a normocitémias egér vizsgálati eljárást ismertetjük a 4. példában.

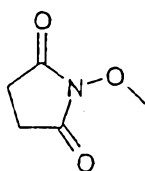
Eljárások PEG-gel kapcsolt EPO előállítására:

Az V. képlettel jellemzett eritropoietin glikoprotein termékek előállítására szolgáló eljárások magukban foglalják tiol csoportok kovalens kötését az EPO-fehérjéhez (aktiválás) és az eredményül kapott aktivált EPO-fehérje összekapcsolását poli(etilén-glikol) (PEG) származékkal. A találmány szerint eljárva a PEG-gel kapcsolt EPO előállításában az első lépés a tiol csoportok kovalens kötése az EPO NH<sub>2</sub> csoportjaihoz. Az EPO illetően aktiválását kétfunkciós reagensekkel végezzük, amelyek védett tiol csoportot és egy további reaktív csoportot hordoznak, mint például aktív észtereket (például szukcinimidil-észtert), anhidrideket, szulfonsavak észtereit, karbonsavak és szulfonsavak halogénidjeit, sorrendben megfeleltetve. A tiol csoportot a technika állása szerint jól ismert csoportokkal védjük, például acetil csoportokkal. Ezek a kétfunkciós reagensek amidkötést kialakítva reagálni képesek a lizin aminosavak ε-aminocsoportjaival. A reakció első lépése az alábbi ábrán látható reakcióegyenlettel írható le:

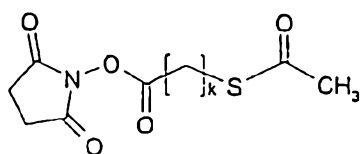


A reakcióegyenletben az EPO, n és X jelölések a fentebb leírtak szerint értelmezendők; Z egy, a technika állá-

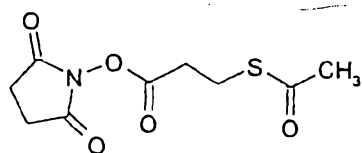
sa szerint ismert reaktív csoportot jelöl, például N-hidroxi-szukcinimid (NHS) szubsztituens lehet, amelynek szerkezete a XI. képlettel jellemezhető:



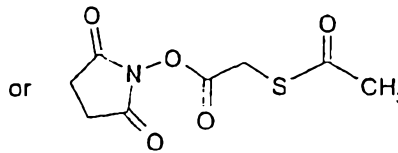
A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint eljárva az ε-amino lizin csoportok aktiválását szukcinimidil részegységet tartalmazó kétfunkciós reagensekkel végzett reakcióval hozzuk létre. A kétfunkciós reagens különböző távtartó szekvenciákat hordozhat, például  $-(CH_2)_k-$  vagy  $-CH_2-(O-CH_2-CH_2-)_k-$  részegységek, ahol k értéke 1 és mintegy 10 között lehet, előnyösen 1 és mintegy 10 között lehet, még előnyösebben k értéke 1 vagy 2 lehet, és legelőnyösebben k értéke 1. Ilyen reagensekre például szolgálhatnak a következők: N-szukcinimidil-S-acetil-tiopropionát (SATP; XIII. képlet) és N-szukcinimidil-S-acetil-tioacetát (SATA; XIV. képlet)



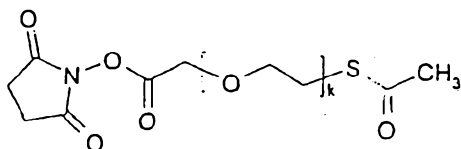
Acetylthioalkyl-carboxylic-NHS-ester, like



SATP



SATA



2-(Acetylthio)-(ethoxy)<sub>k</sub>-acetic acid-NHS-ester



az ábrán  $k$  értéke a fentebb meghatározott érték lehet.

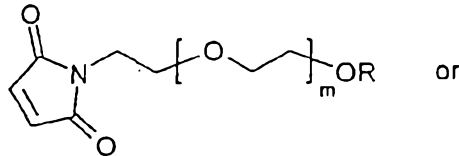
A technika állása szerint jól ismert a kétfunkciós reagensek előállítására. A 2-(acetyl-thio)-(ethoxy)<sub>x</sub>-acetic acid-NHS-esters precursors a DE-3924705 patent number szabadalmában ismertették, míg az acetyl-thio compound derivatizationát March ismertette [March: Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. oldalak]. A SATA kereskedelemben beszerezhető (Molecular Probes, Eugene, OR, Egyesült Államok valamint Pierce, Rockford, IL).

Az EPO-molekulához hozzáadandó thiol csoportok számát a reakciókörülmények módosításával állíthatjuk be, azaz például a fehérje (EPO) koncentráció és a fehérje/kétfunkciós reagens arány módosításával. Előnyösen az EPO-fehérjét EPO-molekulánként 1-5 thiol csoport kovalens összekapcsolásával aktiváljuk, előnyösebben EPO-molekulánként 1,5-3 thiol csoport összekapcsolásával. Ezek a tartományok a thiol csoportok statisztikus eloszlását tükrözik a teljes EPO-fehérje populációban.

A reakciót elvégezhetjük például vizes alapú puffer oldatban, 6,5-8,0 pH tartományban, mint például a következő oldatban: 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7,3. A kétfunkciós reagent DMSO oldatban adhatjuk hozzá. A reakció lezajlása után, előnyösen 30 perc elteltével, a reakciót lizin hozzáadásával leállítjuk. A felesleges kétfunkciós reagent a technika állása szerint jól ismert eljárásokkal választhatjuk el, például dialízissel vagy oszlopon történő szűréssel. Az EPO-fehérjéhez összekapcsolódott thiol csoportok átlagos számát meghatározhatjuk például fotometrikus

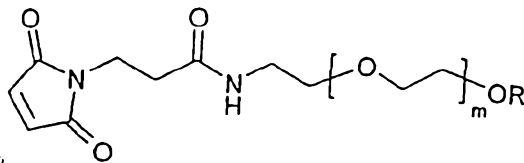


Legelőnyösebb módon eljárva a PEG típusokat maleimiddel aktiváljuk (alkoxi-PEG-maleimid) olyanok alkalmazásával, mint például a metoxi-PEG-maleimid (MW:30000, Shearwater Polymers, Inc.). Az alkoxi-PEG-maleimid szerkezete a XVIII. képlettel:



XVIII

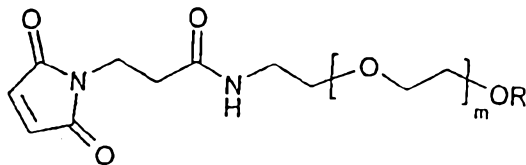
vagy a XIX. képlettel jellemezhető:



XIX

ahol R és m a fentiek szerint meghatározott molekularészleteket illetve értékeket jelöl.

A legelőnyösebben alkalmazható származék a XIX. képlettel jellemezhető:



XIX

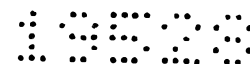
ahol R és m a fentiek szerint meghatározott molekularészleteket illetve értékeket jelöl.

Az alkoxi-PEG-maleimiddel végzett kapcsolási reakció a tiol védőcsoport *in situ* hasítása után történik vizes alapú puffer oldatban, mint például a következő oldatban: 10 mM kálium-foszfát, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6,2. A védőcso-



port lehasítása elvégezhető például hidroxilaminnal 25 °C-on DMSO-ban, pH 6,2, a reakció ideje mintegy 90 perc. A PEG módosításához az aktivált EPO/alkoxi-PEG-maleimid molaránya mintegy 1:3 és mintegy 1:6 között kell legyen, előnyösen az arány 1:4-hez. A reakciót leállíthatjuk cisztein hozzáadásával és a visszamaradó tiol (-SH) csoportok N-metil-maleimiddel vagy más, diszulfid kötések kialakítására képes vegyülettel történő reagáltatásával. Mivel a maradék aktív tiol csoportok például N-metil-maleimiddel vagy más megfelelő védőcsoporttal reagálni képesek, a találmány szerinti konjugátumokban az EPO glikoproteinek tartalmazhatnak ilyen védőcsoportokat. Általánosságban az itt ismertetett eljárás segítségével molekulák keveréke állítható elő, amelyben változó számú, különböző számú védőcsoporttal védett tiol csoport található attól függően, hogy a glikoproteinen hány aktivált tiol csoport nem konjugálódott a PEG-maleimiddel.

Míg az N-metil-maleimid ugyanolyan típusú kovalens kötést alakít ki amikor a PEG-gel kapcsolt fehérjén a visszamaradó tiol csoportok blokkolására alkalmazzuk, a diszulfid vegyületek intermolekuláris szulfid/diszulfid kicserélődési reakcióval a blokkoló reagens diszulfid hidas kapcsolódásához vezetnek. Az előnyösen alkalmazható blokkoló reagensek az ilyen típusú blokkolási reakcióhoz a következők lehetnek: oxidált glutation (GSSG), cisztein és ciszteamin. Míg cisztein alkalmazásával nem juttatunk be további nettó töltést a PEG-gel kapcsolt fehérjébe, a GSSG vagy ciszteamin blokkoló reagensek alkalmazása további negatív vagy pozitív töltés bejuttatását jelenti.



Az V. általános képlettel jellemzett vegyületek további tisztítása - beleértve a mono-, di- és tri-PEG-gel kapcsolt EPO típusok elválasztását - elvégezhető a technika állása szerint ismert eljárások alkalmazásával, mint például oszlop kromatográfia segítségével.

Gyógyászati készítmények:

A találmány szerint előállított eritropoietin glikoprotein termékek elkészíthetők injekcióban alkalmazható gyógyászati készítményként gyógyászatilag elfogadható hordozóval vagy vehikulummal a technika állása szerint ismert eljárások segítségével. Például megfelelő készítményeket ismertettek a következő publikációkban: a WO 97/09996, WO 97/40850, WO 98/58660 és WO 99/07401 lajstromszámú szabadalmakban. A találmány szerinti termékek előállítása során előnyösen alkalmazható gyógyászatilag elfogadható hordozók közé tartoznak a következők: humán szérum albumin, humán plazma fehérjék, stb. A találmány szerinti vegyületek formulázhatók például 10 mM koncentrációjú nátrium/kálium-foszfát pufferben (pH 7), amely ionerősséget biztosító ágenst, például 132 mM nátrium-kloridot tartalmaz. Kivánt esetben a gyógyászati készítmény tartalmazhat tartósítószeret is. A gyógyászati készítmény különböző mennyiségű eritropoietint tartalmazhat, például 10-1000 µg/ml koncentrációjú, azaz 50 µg vagy 400 µg eritropoietint.

Vér rendellenességek kezelése, amelyekre alacsony szintű vagy hibás vörösvértest termelés jellemző:

A találmány szerinti eritropoietin glikoprotein termékek beadása emberekben vörösvértest termelést eredményez.

Ebből következően az eritropoietin glikoprotein termékek beadása pótolja az EPO-fehérjét, amely fontos a vörösvértestek termeléséhez. Az eritropoietin glikoprotein termékeket tartalmazó gyógyászati készítmények előállíthatóak olyan erősség mellett, amely hatékony egy emberi páciensbe bevételhez, különböző beadási formák számára, amely páciens olyan vér rendellenességekben szenved, amelyeket alacsony vagy hibás vörösvérttest termelés jellemez, akár önálló jelenségként, akár állapot vagy betegség részeként. A gyógyászati készítmények beadhatóak injekció útján, mint például szubkután vagy intravénás injekció útján. Az eritropoietin glikoprotein termékek átlagos mennyisége változó lehet és elsősorban a szakképzett orvos javaslatai és előírásai alapján kerül meghatározásra. A konjugátum pontos mennyisége preferencia kérdése, amely függ olyan körülményektől mint például a kezelendő állapot pontos típusa, a kezelendő páciens állapota és a készítményben megtalálható más összetevők. Például testsúly kilogrammonként 0,01-10  $\mu\text{g}$  mennyiséget, előnyösen testsúly kilogrammonként 0,1-1  $\mu\text{g}$  mennyiséget adhatunk be például hetenként egyszer.

A szabadalmi leírás során számos publikációra hivatkoztunk. Az ezen publikációkban leközöltek teljes egészükben a kitanítás részének tekintendők annak érdekében, hogy szélesebb körben ismertessük a technika állását.

A találmányi leírást az alábbiakban a következő példák segítségével részleteiben is ismertetjük, ezeken keresztül - nem korlátozó értelemben - a találmány szerinti vegyületek és készítmények előállítását mutatjuk be.



*1. példa*

**Humán EPO fermentálása és tisztítása**

(a) Oltóanyag elkészítése és fermentáció:

A Working Cell Bank-ból egy ampulla mennyiségű EPO-termelő CHO sejtvonalat (alkalmazható az ATCC CRL8695, amely ismertetésre került az EP 411678 lajstromszámú európai szabadalomban (Genetics Institute)) emelünk ki a folyékony nitrogén tároló edény gáz fázisából. A sejteket üveg rázópalackokba visszük át és hidrogén-karbonáttal pufferolt táptalajban, nagy nedvességtartalmú CO<sub>2</sub> inkubátorban tenyészttjük. Az oltóanyag elkészítéséhez és fermentációhoz alkalmazható tipikus szérumentes táptalajt ismertettek Koch: 513738 azonosítószámú európai szabadalmi bejelentésében (publikálásra került 1992. június 12-én) illetve Burg: WO 96/35718 lajstromszámú szabadalmában (publikálásra került 1996. november 14-én), amelyek például táptalajként DMEM/F12-t (például JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, Egyesült Államok, katalógusszám: 57-736) alkalmaznak valamint tartalmazzák még a következőket: nátrium-hidrogén-karbonát, L+ glutamin, D+ glükóz, rekombináns inzulin, nátrium-szelenit, diamino-bután, hidrokortizon, vas(II)-szulfát, aszparagin, aszparaginsav, szerin és egy stabilizátort emlős sejtek számára, mint például poli-vinil-alkohol, metil-cellulóz, polidextrán, polietilén-glikol, Pluoronic F68, plazma expander poligelín (HEMACCEL®) vagy polivinil-pirrolidon (WO 96/35718 azonosítószámú szabadalmi bejelentés).



A tenyészeteket mikroszkóp segítségével ellenőrizzük a szennyező organizmusok távollétére és meghatározzuk a sejt koncentrációkat. Ezeket a tesztek mindegyik szétosztási lépésnél megismételjük.

Az iniciális növekedési periódus után a sejttenyészetet friss táptalajjal a kezdeti sejt koncentrációra felhígítjuk és újabb növekedési ciklusnak vetjük alá. Ezt az eljárást addig ismételjük, ameddig üveg rázópalackként mintegy 2 l tenyészet térfogatot érünk el. Mintegy 12 duplázódás után 1-5 liter ilyen tenyészet áll rendelkezésre, amelyet ezután oltóanyagként használunk fel a 10 l-es oltóanyag fermentorban.

3-5 nap eltelte után a 10 l-es fermentorban létrejött tenyészet oltóanyagként alkalmazható a 100 l-es oltóanyag fermentorban.

További 3-5 nap tenyésztés után a 100 l-es fermentorban létrejött tenyészet oltóanyagként alkalmazható az 1000 l-es termelő fermentorban.

(b) Begyűjtés és a sejtek elválasztása:

Egy sarzsonként történő visszaforgatási eljárást alkalmazunk, azaz amikor elérjük a kívánt sejt koncentrációt, a tenyészet mintegy 80 százalékát gyűjtjük be. A visszamaradó tenyészetet friss tenyész táptalajjal kiegészítjük, és a következő begyűjtésig tenyésztjük. Egy termelési folyamat maximum 10 egymást követő begyűjtést tartalmaz, 9 részleges begyűjtést és 1 teljes begyűjtést a fermentáció legvégén. A begyűjtést 3-4 naponként végezzük.



A meghatározott térfogatú gyűjtött mennyiséget hűtött edénybe visszük át. A sejteket centrifugálással vagy szűréssel távolítjuk el és eldobjuk. A centrifugálási lépésben kapott EPO-t tartalmazó felülúszót a folyamat során szűrjük és egy második hűtött edényben összegyűjtjük. Mindegyik begyűjtést külön dolgozzuk fel a tisztítás során.

Az EPO fehérje tisztítására egy tipikus eljárást közöltek le a következő szabadalomban: Burg: WO 96/35718 lajstromszámú szabadalom, publikálásra került 1996. november 14-én. A tisztítás folyamatát az alábbiakban példaként ismertetjük:

(a) Blue Sepharose kromatográfia:

A Blue Sepharose (Pharmacia) Sepharose gyöngyökből áll, amelyek felületére Cibacron Blue festéket kötöttek kovalens módon. Mivel az EPO fehérje erősebben kötődik a Blue Sepharose-hoz mint a legtöbb nem fehérje jellegű szennyeződés, néhány fehérje jellegű szennyeződés és a PVA, EPO dúsítható fel ezzel a lépéssel. A Blue Sepharose oszlop elúcióját úgy végezzük, hogy a pH értéket és a só koncentrációt is megnöveljük.

Az oszlopot 80-100 l Blue Sepharose-zal töltjük fel, amelyet NaOH-dal regenerálunk és ekvilibráló pufferrel (nátrium/kalcium-klorid és nátrium-acetát) hozunk egyensúlyba. Az oszlopra felvisszük a megsavanyított és szűrt fermentor felülúszót. A felvitel befejezése után az oszlopot először az ekvilibráló pufferhez hasonló, magasabb nátrium-klorid koncentrációjú pufferrel mossuk, majd ezt követően Tris-alapú pufferrel mossuk. A terméket Tris-alapú



pufferrel eluáljuk és egyetlen frakcióban gyűjtjük a mintaként szolgáló elúciós profil alapján.

(b) Butil-Toyopearl kromatográfia:

A Butil-Toyopearl 650 C (TosoHaas) egy polisztirol alapú mátrix, amelyhez kovalensen alifás butil-csoportokat kötöttek. Mivel az EPO-fehérje erősebben kötődik ehhez a gélhez mint a szennyeződések többsége és a PVA, izopropanolt tartalmazó pufferrel kell eluálni.

Az oszlopot 30-40 l Butil-Toyopearl 650 C géllal töltjük meg, NaOH-dal regeneráljuk, Tris-alapú pufferrel mossuk és izopropanolt tartalmazó Tris-alapú pufferrel ekvilibrálnuk.

A Blue Sepharose eluátumot az oszlop ekvilibrááló pufferben fennálló izopropanol koncentrációhoz beállítjuk, majd felvisszük az oszlopra. Ezután az oszlopot az ekvilibrááló pufferrel mossuk növekvő izopropanol koncentráció mellett. A terméket az elúciós pufferrel (Tris-alapú puffer magas izopropanol tartalommal) eluáljuk és egyetlen frakcióba gyűjtjük a mintaként szolgáló elúciós profil alapján.

(c) Hidroxiapatit Ultrogel kromatográfia:

A hidroxiapatit Ultrogel (Biosepra) a mechanikai tulajdonságok javítására agaróz mátrixba beépített hidroxiapatitból áll. Az EPO-fehérje alacsony affinitást mutat a hidroxiapatittal szemben, ezért tehát alacsonyabb foszfát koncentrációknál eluálódik mint a fehérje szennyeződések.

Az oszlopot 30-40 l hidroxiapatit Ultrogel-lel feltöltjük, majd kálium-foszfát/kalcium-klorid pufferrel és nátrium-hidroxiddal regeneráljuk majd ezt követően Tris-



alapú pufferrel mossuk. Ezután kis mennyiségű izopropanolt és nátrium-kloridot tartalmazó Tris-alapú pufferrel ekvilibráljuk.

A Butil-Toyopearl kromatográfia EPO-fehérjét tartalmazó eluátumát visszük fel az oszlopra. Ezután az oszlopot az ekvilibráló pufferrel és izopropanolt valamint nátrium-kloridot nem tartalmazó Tris-alapú pufferrel mossuk. A terméket alacsony koncentrációban kálium-foszfátot tartalmazó Tris-alapú pufferrel eluáljuk és egyetlen frakcióban gyűjtjük össze a mintaként szolgáló elúciós grafikon alapján.

(d) Fordított fázisú HPLC Vydac C4 oszlopon:

A Vydac C4 (Vydac) RP-HPLC anyag szilikagél részecskékből áll, amelyek felszínén C4-alkil láncok helyezkednek el. Az EPO elválasztása a fehérje jellegű szennyeződésektől a hidrofób kölcsönhatások erősségének különbségein alapul. Az elúciót hígított trifluor-ecetsav jelenlétében acetonitril gradienssel végezzük.

A preparatív HPLC-t rozsdamentes acél oszlop (amelyet 2,8-3,2 l Vydac C4 szilikagéllal töltöttünk fel) alkalmazásával végezzük. A hidroxipatit Ultrogel eluátumot trifluor-ecetsav hozzáadásával megsavanyítjuk és felvisszük a Vydac C4 oszlopra. Mosásra és elúcióra acetonitril gradient alkalmazunk hígított trifluor-ecetsavban. A frakciókat begyűjtjük és rögtön semlegesítjük foszfát pufferrel. Az IPC határokon belül eső EPO frakciókat összeöntjük.

(e) DEAE-Sepharose kromatográfia:

A DEAE-Sepharose (Pharmacia) anyag dietil-aminoetil (DEAE)-csoportokat tartalmaz, amelyeket kovalensen



Sepharose gyöngyök felszínére kötöttek. Az EPO kötődését a DEAE csoportokhoz ionos kölcsönhatások biztosítják. Az acetónitril és a trifluor-ecetsav az oszlopon visszatartás nélkül halad át. Miután ezeket az anyagokat lemostuk, a nyomszennyeződések az oszlop alacsony pH értéknél, acetát pufferrel történő mosásával távolítjuk el. Ezután az oszlopot semleges foszfát-pufferrel mossuk és az EPO-t növekvő ionerősségű pufferrel eluáljuk.

Az oszlopot DEAE Sepharose Fast Flow mátrixszal töltjük meg. Az oszlop térfogatát úgy állítjuk be, hogy az EPO mennyisége a 3-10 mg EPO/ml gél tartományban legyen. Az oszlopot vízzel és ekvibráló pufferrel (nátrium/kálium-foszfát) mossuk. A HPLC eluátum összeöntött frakcióit felvisszük és az oszlopot ekvibráló pufferrel mossuk. Ezután az oszlopot a mosó pufferrel (nátrium-acetát puffer) mossuk, amelyet az ekvibráló pufferrel végzett mosás követ. Ezt követően az EPO-t az oszlopról az elúciós pufferrel (nátrium-klorid, nátrium/kálium-foszfát) eluáljuk és egyetlen frakcióban gyűjtjük a mintaként szolgáló elúciós profil alapján.

A DEAE-Sepharose oszlop eluátumát meghatározott vezetőképessegre állítjuk be. Az eredményül kapott gyógyszer hatóanyagot steril Teflon palackokba szűrjük és  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk.

## **2. példa**

### **Tiol csoportok kovalens kapcsolása az EPO-hoz**

Ebben a példában ismertetjük a reakció körülmények meghatározását tiol csoportok EPO-fehérjéhez történő kova-



lens kapcsolásához. A körülmények meghatározásához blokkolt tiol csoportot tartalmazó reagens - itt SATA vagy SATP (10 mg/ml koncentrációban DMSO-ban feloldva) - különböző mennyiségét adtuk az EPO oldathoz - itt 1 ml 5 mg/ml EPO oldathoz, amely még a következőket tartalmazta: 10 mM kálium-foszfát (pH 7,3), 50 mM NaCl. A reakciót mintegy 30 percig kevertettük (25 °C) és 1 M lizin oldat hozzáadásával állítottuk le, 10 mM végső koncentrációig. A SATA és SATP felesleges mennyiségét 10 mM kálium-foszfát, 50 mM NaCl és 2 mM EDTA (pH 6,2), oldatával szemben végzett dialízissel távolítottuk el. Miután a védő acetil csoportot hidroxilaminnal eltávolítottuk, az EPO-fehérjéhez kovalensen kapcsolt tiol csoportok számát fotometrián határoztuk meg ditio-dipiridin segítségével Grasetti és Murray eljárása alapján [Grasetti és Murray: J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119 41 (1967)].

Az EPO molekulánként kovalensen kapcsolt tiol csoportok számának alakulása az alábbi táblázatban látható:

mólarány	tiol csoportok moláris mennyisége/mol EPO
EPO : SATA vagy SATP	
EPO : SATA = 1 : 3	1,5
EPO : SATA = 1 : 5	2,4
EPO : SATA = 1 : 6	3,2
EPO : SATP = 1 : 3	1,3
EPO : SATP = 1 : 4	2,5
EPO : SATP = 1 : 6	3,7



### 3. példa

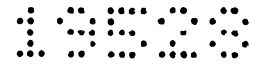
#### Aktivált EPO módosítása metoxi-PEG-maleimiddel

(A) EPO aktiválása:

Az 1. példa szerint előállított 100 mg EPO-t (190.000 IU/mg a normocitémias egér vizsgálati eljárással meghatározva) a 2. példa szerint SATA-val (EPO/SATA molarány = 1:5) aktiváltunk. Az eredményül kapott kovalensen kapcsolt blokkolt tiol csoportokat hordozó EPO-t („aktivált EPO”) az 1. példában leírtak szerint, dialízissel választottuk el a melléktermékektől, mint például az N-hidroxiszukcinimidtől vagy az el nem reagált SATA-tól. Így végül a következő oldatot kaptuk: 4,5 mg/ml aktivált EPO 10 mM kálium-foszfát (pH 6,2), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA oldatában.

(B) Aktivált EPO PEG-gel történő kapcsolása:

380 mg metoxi-PEG-maleimidet - amely a fentebb bemutatott „legelőnyösebb” szerkezettel rendelkezik (MW 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Hunstville, Alabama, Egyesült Államok) - oldottunk 95 mg aktivált EPO-t tartalmazó fenti oldatban (4,5 mg/ml EPO, 10 mM kálium-foszfát (pH 6,2), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA oldatában). Az oldatban az aktivált EPO és metoxi-PEG-maleimid így elért molaránya 1:4 volt. Az előbbi oldathoz 1 M vizes hidroxilamin oldat (pH 6,2) 30 mM végső koncentrációig történő hozzáadásával az aktivált EPO kovalensen kötött, blokkolt tiol csoportjainak a védelmét eltávolítottuk. Az eredményül kapott aktivált EPO a reakció elegyben szabad tiol (-SH) csoportokat tartalmazott. A tiol csoportok védőcsoportjainak eltávolítást közvetlenül követően a most már szabad tiol (-SH) csoportokat tartalmazó ak-



tivált EPO és a metoxi-PEG-maleimid közötti kapcsolási reakció, 90 percig, keverés közben 25 °C-on. A kapcsolási reakciót 0,2 M vizes cisztein oldat hozzáadásával állítottuk le, amit 2 mM végső koncentrációig adagoltunk a reakcióelegyhez. 30 perc után az aktivált EPO felesleges szabad tiol csoportjait, amelyek nem reagáltak a metoxi-PEG-maleimiddal, 5 mM végső koncentrációig DMSO-ban oldott 0,5 M N-metil-maleimid hozzáadásával blokkoltuk. 30 perc után az eredményül kapott, most már PEG-gel kapcsolt EPO típusokat tartalmazó reakcióelegyet 10 mM kálium-foszfáttal (pH 7,5) szemben dializáltuk legalább 15 órán keresztül.

(C) PEG-gel kapcsolt EPO típusok tisztítása:

A PEG-gel kapcsolt EPO típusok reakcióelegytől történő elválasztására a következő tisztítási eljárást alkalmaztuk: 50 ml térfogatú Q-Sepharose Fast Flow oszlopot ekvilibráltunk 10 mM kálium-foszfáttal (pH 7,5). A B-lépésben kapott reakcióelegyet az oszlopra felvittük (átfolyási sebesség: 3 oszlop térfogat óránként). A nem reagált metoxi-PEG-maleimid reagens eltávolítása céljából az oszlopot 5 oszlop térfogat mennyiségű 10 mM kálium-foszfáttal (pH 7,5) mostuk. A PEG-gel kapcsolt EPO típusokat növekvő sótartalmú gradienssel eluáltuk, amely 5 oszlop térfogat mennyiségű A puffert (10 mM kálium-foszfát, pH 7,5) és 5 oszlop térfogat mennyiségű B puffert (10 mM kálium-foszfát, 500 mM NaCl, pH 7,5) tartalmazott, az átfolyási sebesség 3 oszlop térfogat óránként volt. A NaCl gradiens alapján a PEG-gel kapcsolt EPO típusok (tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusok) eluálódtak először, majd ezt a PEG-gel nem kapcsolt



EPO típusok követték. A PEG-gel kapcsolt EPO típusokat (tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusok) tartalmazó eluátum frakciót összeöntöttük és szűrtük (steril szűrés 0,2  $\mu\text{m}$ -es szűrővel).

A tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusok összetételét és tisztaságát Coomassie-festett SDS-PAA géleken [Laemmli: Nature 227 680 (1970)] vizsgáltuk, míg a fehérje koncentrációkat 280 nm hullámhossznál mértük a Beer-Lambert törvényt alkalmazva. Az EPO típusok SDS-PAA elektroforézissel meghatározott látszólagos molekulatömege mintegy 68 kDa (mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusok), mintegy 98 kDa (di-PEG-gel kapcsolt EPO típusok) és mintegy 128 kDa volt (tri-PEG-gel kapcsolt EPO típusok).

A tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusok további szétválasztása kromatográfiával végezhető el, például a méret szerinti szétválasztáson alapuló kromatográfiával (Superdex PG200, Pharmacia).

A tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO típusokat tartalmazó eluátum *in vivo* biológiai aktivitásának meghatározását a 4. példában ismertetett eljárással végeztük.

#### **4. példa**

#### **PEG-gel kapcsolt EPO *in vivo* aktivitása, a normocitémias egér vizsgálati eljárással meghatározva**

A normocitémias egér biológiai vizsgálati eljárás a technika állása szerint ismert [Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio (1997(2))] továbbá erre szolgáló eljárás található Ph. Eur. BRP eritropoietin monográfiájában. A mintákat BSA-PBS oldattal hígítjuk. Normál, egészséges,



7-15 hetes egereknek s.c. 0,2 ml adunk be a 2. példában leírtak szerinti tri-, di- és mono-PEG-gel kapcsolt EPO-t tartalmazó EPO frakcióból. A beadás utáni 72 órát követően 4 napon keresztül vért veszünk a fark véréből és meghígítjük oly módon, hogy 1  $\mu$ l vér legyen 1 ml 0,15  $\mu$ mol akridin-narancs festő oldatban. A festési idő 3-10 perc. A retikulocita számlálásokat mikro-fluorimetriával végezzük átfo-lyásos citométerben a vörös fluoreszcencia hisztogram ana-lízisével. A retikulocita számolásokat abszolút értékben adjuk meg (30.000 analizált vérsejtre számolva). A bemuta-tott adatoknál mindegyik csoport naponta 5 egerből állt, és az egerektől csak egyszer vettünk vért.

A 3. példa szerinti EPO-hoz kapcsolt metoxi-PEG-maleimidet, módosítatlan EPO-t és puffer oldatot adtunk be az egereknek. Az eredményeket a 3. ábrán mutatjuk be. Az eredmények a PEG-gel kapcsolt EPO típusok kiemelkedően jó aktivitását és hosszabb felezési idejét mutatják a jelentősen megnövekedett retikulocita mennyiségekkel és a retikulocita szám maximumának eltolódásával, mikor egeren-ként ugyanakkora dózist alkalmaztunk.



SZEKVENCIALISTA

<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

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

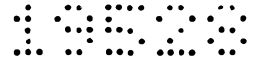
<210> 2

<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

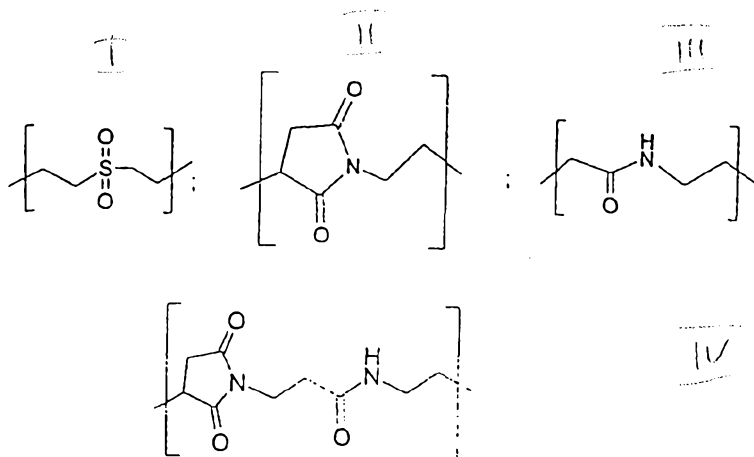
<400> 3

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



### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

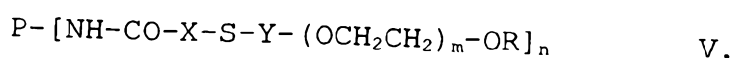
1. Eritropoietin glikoproteint tartalmazó konjugátum, amelyben az eritropoietin glikoprotein legalább egy szabad aminocsoporttal rendelkezik és csontvelő sejtek retikulocita és vörösvérttest termelésének növelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitást mutat és amely a következők bármelyike: humán eritropoietin vagy olyan analógja, melynek primer szerkezete megegyezik az 1-6 glikozilációs hely hozzáadásával vagy legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított humán eritropoietin szerkezetével; a glikoprotein kovalensen hozzá van kötve 1-3 kis szénatomszámú alkoxi poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol mindegyik poli(etilén-glikol) csoport a glikoproteinhez kovalensen kötődik egy linkerén keresztül, amely linker általános képlete a következő:  $-C(O)-X-S-Y-$ ; ahol a linker  $C(O)$  csoportja amid kötést alakít ki az említett amino csoportok egyikével, és ahol X jelentése  $-(CH_2)_k$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ , ahol k értéke 1-től 10-ig terjedhet, Y pedig az I-IV. képlettel jellemzett molekularészeket bármelyikét jelöli:





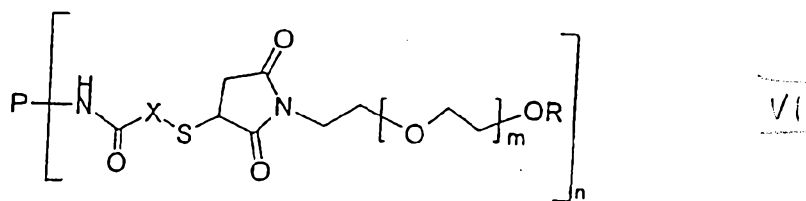
az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 és mintegy 40 kilodalton közötti, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 és mintegy 175 kilodalton közötti.

2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amely a következő, V. általános képlettel jellemezhető:



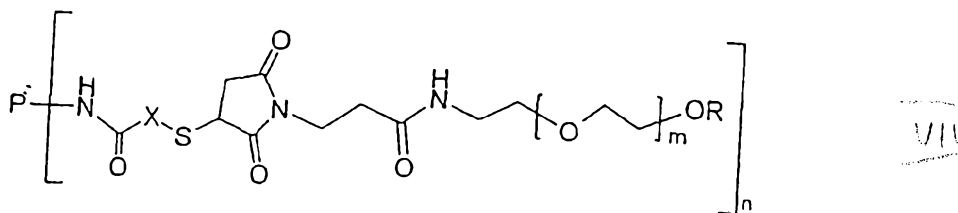
ahol X és Y jelentése az 1. igénypont szerinti, m értéke 450-900 közötti, n értéke 1-3 lehet, R kis szénatom-számú alkilcsoportot, P pedig eritropoietin glikoproteint jelöl, az X részegységgel amidkötést kialakító amino csoport vagy amino csoportok nélkül.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti konjugátum, melynek szerkezete a VI. képlettel jellemezhető:



ahol P, R, X, m és n jelentése a 2. igénypont szerinti.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti konjugátum, melynek szerkezete a VII. képlettel jellemezhető:





ahol P, R, X, m és n jelentése a 2. igénypont szerinti.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol X jelentése  $-(CH_2)_k-$ .

6. Az 5. igénypont szerinti konjugátum, ahol k értéke 1-től 4-ig terjedhet.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol X jelentése  $-CH_2-$ .

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol m értéke egy, az 550-800 közötti tartományba eső egész szám.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol m értéke egy, a 650-700 közötti tartományba eső egész szám.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol n értéke 1.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol R jelentése metil csoport.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 24 és mintegy 35 kilodalton közötti.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 30 kilodalton.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein kovalens módon kapcsolódik egy vagy két kis szénatomszámú alkoxi csoporttal lezárt poli(e-



tilén-glikol) részegységhez.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) részegységeket metoxi csoport zárja le.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol X jelentése  $-CH_2-$ , m értéke egy 650-700 közötti tartományba eső egész szám, n értéke 1, R jelntése metil csoport, és amelyben az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 30 kilodalton.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben az eritropoietin glikoprotein humán eritropoietin.

18. Az 1-17. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben az eritropoietin glikoprotein endogén gén aktiválása útján expresszált eritropoietin.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben az eritropoietin glikoprotein szekvenciája az 1. ábrán (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) vagy a 2. ábrán (2. azonosítási szám szerinti szekvencia) bemutatott szekvencia.

20. A 19. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az eritropoietin glikoprotein szekvenciája az 1. ábrán (1. azonosítási szám szerinti szekvencia) bemutatott szekvencia.

21. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája az 1-6 glikozilációs hely addíciójával módosított humán eritropoietin szekvenciája.



22. Az 1-6., 8. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája az alább felsorolt módosítások bármelyikével módosított humán eritropoietin szekvenciája:

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>; és  
Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

23. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája tartalmazza a humán eritropoietin szekvenciáját és egy második szekvenciát a humán eritropoietin szekvencia karboxi terminálisán, és ahol a második szekvencia legalább egy glikozilációs helyet



tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a második szekvencia a humán chorionic gonadotropin karboxi terminális szekvenciájából származó szekvenciát tartalmaz.

25. A 24. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája az alább következők bármelyike:

(a) a karboxi terminálisról kiinduló humán eritropoietin szekvenciája, amely a következő: 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 (3. azonosítási szám szerinti szekvencia);

(b) az (a) pontban ismertetett szekvencia, amely a Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> aminosavakkal lett módosítva; és

(c) az (a) pontban ismertetett szekvencia, amely az Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> aminosavakkal lett módosítva.

26. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított humán eritropoietin szekvencia.

27. A 25. igénypont szerinti konjugátum, ahol a glikozilációs hely átrendezése a humán eritropoietin N-kapcsolt szénhidrát helyei közül bármelyik delécióját, és egy N-kapcsolt szénhidrát hely hozzáadását jelenti a humán eritropoietin szekvencia 88. pozíciójában.

28. A 14. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a glikoprotein szekvenciája az alábbi módosítások bármelyikével módosított humán eritropoietin szekvencia:



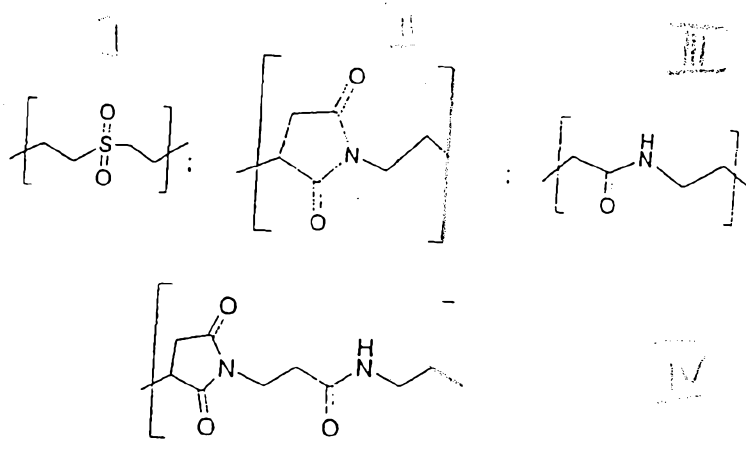
Gln<sup>24</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO;  
Gln<sup>38</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO; és  
Gln<sup>83</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup> EPO.

29. Konjugátumokat tartalmazó készítmény, amelyben mindegyik konjugátum tartalmaz legalább egy szabad amino csoporttal rendelkező eritropoietin glikoproteint, amely rendelkezik a csontvelő sejtek retikulocita és vörösvértest termelésének megnövelését kiváltó *in vivo* biológiai aktivitással és amely a következők bármelyike: humán eritropoietin vagy olyan analógja, amely a humán eritropoietin 1-6 glikozilációs hely addíciójával vagy legalább egy glikozilációs hely átrendezésével módosított primer struktúrájával rendelkeznek; amely glikoprotein kovalensen kapcsolódik 1-3 kis szénatomszámú alkoxi-poli(etilén-glikol) csoporthoz, amelyben mindegyik poli(etilén-glikol) csoport kovalensen kötődik a glikoproteinhez egy -C(O)-X-S-Y- általános képlettel jellemezhető linkeren keresztül, amelyben a linker C(O) csoportja amid kötést alakít ki az egyik említett amino csoporttal; ahol

X jelentése  $-(CH_2)_k-$  vagy  $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ , ahol;

k értéke 1-10 közötti; és

Y az I-IV. képlettel jellemezhető molekularészletek bármelyike:





az egyes poli(etilén-glikol) részegységek átlagos molekulatömege mintegy 20 és mintegy 40 kilodalton közötti, és a konjugátum molekulatömege mintegy 51 és mintegy 175 kilodalton közötti; és a készítményben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben  $n$  értéke 1, legalább kilencven százalék.

30. Készítmény, amely 1-27. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot tartalmaz, és a készítményben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben  $n$  értéke 1, legalább kilencven százalék.

31. A 28. vagy 29. igénypont szerinti készítmény, amelyben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben  $n$  értéke 1, legalább kilencvenkét százalék.

32. A 30. igénypont szerinti készítmény, amelyben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben  $n$  értéke 1, legalább kilencvenhat százalék.

33. A 29. vagy 32. igénypont szerinti készítmény, amelyben azon konjugátumok százalékos mennyisége amelyekben  $n$  értéke 1, kilencven és kilencvenhat százalék közötti.

34. Gyógyászati készítmény, amely 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot vagy készítményt és gyógyászatilag elfogadható excipienst tartalmaz.

35. Az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum vagy készítmény alkalmazása anémiával kapcsolatos betegségek kezelésére vagy megelőzésére, krónikus veseelégtelenségben (CRF), AIDS-ben szenvedő betegek vagy kemoterápián áteső rákos betegek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.



36. Eljárás anémiával kapcsolatos rendellenességek megelőzésére és/vagy terápiás kezelésére krónikus veseelégtelenségben (CRF), AIDS-ben szenvedő betegek számára valamint kemoterápián áteső rákos betegek esetén, *azzal jellemezve*, hogy a páciensnek az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot vagy készítményt beadjuk.

37. Eljárás az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum vagy készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy tiol csoportokat kapcsolunk kovalens módon eritropoietin glikoproteinekhez és az eredményül kapott aktivált eritropoietin glikoproteint poli(etilén-glikol) (PEG) származékhoz kapcsoljuk.

38. Az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum vagy készítmény, amely a 36. igénypont szerinti eljárással lett előállítva.

39. Az 1-33. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum vagy készítmény, anémiával kapcsolatos betegségek kezelésére történő alkalmazásra, krónikus veseelégtelenségben (CRF) vagy AIDS-ben szenvedő betegek vagy kemoterápián áteső rákos betegek esetében.

40. Az új vegyületek, eljárások és módszerek, valamint az ilyen vegyületek alkalmazása az előzőekben leírtakkal lényegében azonos módon.

5975 - *Dr. Pethő Árpád*

A meghatalmazott:

  
**DANUBIA**  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft  
**Dr. Pethő Árpád**  
szabadalmi ügyvivő

*Sh*

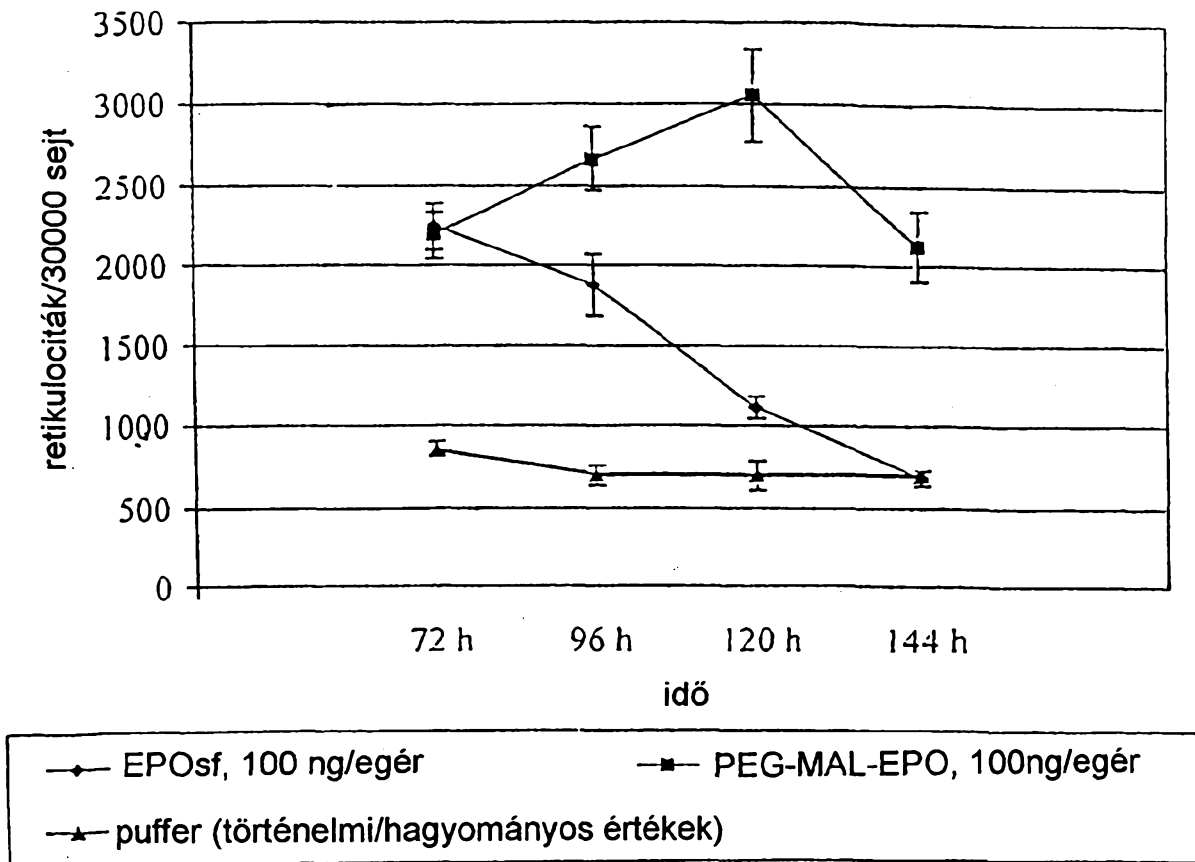
P070097

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>90</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>150</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
Cys Arg Thr Gly Asp<sup>165</sup>

## 1. ábra

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg<sup>10</sup> Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys<sup>20</sup>  
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala<sup>30</sup> Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr<sup>40</sup>  
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala<sup>50</sup> Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala<sup>60</sup>  
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu<sup>70</sup> Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu<sup>80</sup>  
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro<sup>90</sup> Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser<sup>100</sup>  
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg<sup>110</sup> Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser<sup>120</sup>  
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu<sup>130</sup> Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys<sup>140</sup>  
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg<sup>150</sup> Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala<sup>160</sup>  
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg<sup>166</sup>

## 2. ábra



3. ábra