



HU000228492B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 492**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 01 03920**(22) A bejelentés napja: **1999. 10. 18.**(40) A közzététel napja: **2002. 02. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 03. 28.**(51) Int. Cl.: **C12N 15/12** (2006.01)**A61K 38/18** (2006.01)**A61P 7/06** (2006.01)**C07K 145/05** (2006.01)**C12N 5/10** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 99/24435

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0024893

(30) Elsőbbségi adatok:

09/178,292**1998. 10. 23.****US**

(73) Jogosult(ak):

Amgen Inc., Thousand Oaks, Kalifornia (US)

(72) Feltaláló(k):

Brown, Jeffrey K., Camarillo, Kalifornia (US)**Egrie, Joan C., Newbury Park, Kalifornia (US)****Elliott, Steven G., Newbury Park, Kalifornia (US)**

(74) Képviselő:

**ifj. Szentpéteri Ádám, S.B.G. & K. Budapesti
Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest**

(54)

Eljárás és kompozíció vérszegénység kezelésére és megelőzésére

(57) Kivonat

A találmány tárgya az eritropoietin valamely hiperglikozilezett analógja gyógyászati lag hatékony mennyiségének alkalmazása emlősök hematokrit értékének növelésére és fenntartására szolgáló gyógyászati készítmény előállítására ahol az analógot ritkábban adjuk be, mint a rekombináns humán eritropoietin molárisan ekvivalens mennyiségét, hogy hasonló cél hematokrit értéket kapjunk.

Egy analógot kevésbé gyakran is be lehet vezetni, mint egy rekombináns humán eritropoietin molárisan ekvivalens mennyiségét, hogy hasonló cél hematokrit érték alakuljon ki, és így lehessen kezelni a vérszegénységet. Egy másik megoldás szerint valamely hiperglikozilezett analóg kisebb moláris mennyiségét lehet bevezetni, hogy hasonló cél hematokrit érték alakuljon ki, és így lehessen kezelni a vérszegénységet.

A találmány tárgyát képezik továbbá az új, hiperglikozilezett eritropoietin analógok is, az analógokat kódoló DNS szekvenciák, a DNS szekvenciával transzfektált gazdasejtek, az analógokat tartalmazó kompozíciók, valamint eljárás az analógok előállítására.

ELJÁRÁS ÉS KOMPOZÍCIÓ VÉRSZEGÉNYSÉG KEZELÉSÉRE ÉS MEGELŐZÉSÉRE

A találmány megnövekedett hematokrit értékekre vonatkozik emlő-
sőkben eritropoietin hiperglikozilezett analógjainak alkalmazásával.
Pontosabban a találmány egy hiperglikozilezett analóg kevésbé gyakori
adagolására vonatkozik összehasonlítva a rekombináns humán
eritropoietinnel, hogy növelje és fenntartsa a hematokrit értéket és ke-
zelje a vérszegénységet. A találmány továbbá egy hiperglikozilezett
analóg kisebb mennyiségeinek beadására is vonatkozik összehasonlítva
a rekombináns humán eritropoietinnel ekvivalens adagolási sűrűségnél
abból a célból, hogy növelje és fenntartsa a hematokrit értéket és kezelje
a vérszegénységet. A találmány továbbá biztosítja az eritropoietin új,
hiperglikozilezett analógjait.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány hátterét.

Az eritropoietin (EPO) olyan glikoprotein hormon, amely az eritroid
progenitor sejtekéréséhez szükséges eritrocitákban. Ez a vesében ter-
melődik és lényeges a vörösvérsejtek szintjeinek szabályozásában a
vérkeringésben. A veseműködés elvesztése például, amint ez a krónikus
veseelégtelenségben [chronic renal failure (CRF)] látható, tipikusan az
EPO csökkentett termelését eredményezi és egy ezzel együtt járó csök-
kenést a vörösvérsejtekben.

A humán vizelet EPO-t Miyake és munkatársai izolálták [J. Biol.
Chem. 252, 5558 (1977)] aplasztikus vérszegénységben szenvedő bete-
gekből. Az ebből a forrásból kapott tisztított EPO fehérje mennyisége
azonban elégtelen volt gyógyászati alkalmazáshoz. A humán EPO-t kó-
doló gén klónozását és azonosítását, továbbá a rekombináns fehérje
expresszállását Lin leírja a 4,703,008 lajstromszámú amerikai egyesült

államokbeli szabadalomban; ennek leírása referenciaként épül be a jelen bejelentésbe. A rekombináns humán eritropoietin tisztításának eljárását sejtközegből írják le Lai és munkatársai a 4,667,016 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban; ennek leírása referenciaként épül be a jelen bejelentésbe. Az emlős gazdasejtekből való biológiailag aktív EPO termelése ezzel vált először lehetővé gyógyászati alkalmazáshoz elegendő mennyiségben. Ezen kívül a génszekvencia megismerése és a tisztított fehérje megnövekedett hozzáférhetősége elvezetett ezen fehérje hatásmechanizmusának jobb megértéséhez.

Mind a humán vizelet eredetű EPO (lásd Miyake előzőekben idézett munkáját), mind az emlős sejtekben expresszált rekombináns humán EPO tartalmaz három N-kapcsolt és egy O-kapcsolt oligoszacharid láncot, amelyek együtt tartalmazzák a glikoprotein teljes molekulatömegének 40%-át. Az N-kapcsolt glikozilezés a 24., 38., és 83. helynél található aszparagin gyököknél megy végbe, míg az O-kapcsolt glikozilezés a 126. helynél található szerin gyökénél megy végbe [Lai és munkatársai: *J. Biol. Chem.*, 261, 3116 (1986); Broudy és munkatársai: *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 329 (1988)]. Az oligoszacharid láncokról kimutatták, hogy módosulnak terminális szialinsav gyökökkel, N-kapcsolt láncoknál tipikusan maximum négy szialinsav gyökkel lánconként, míg az O-kapcsolt láncoknál maximum két szialinsav gyökkel lánconként. Egy EPO polipeptiden ennél fogva összesen legfeljebb 14 szialinsav helyezkedhet el.

Különböző tanulmányokban kimutatták, hogy az EPO szénhidrát láncok változásai hatással lehetnek a biológiai aktivitásra. Az egyik tanulmányban például az N-kapcsolt vagy O-kapcsolt oligoszacharid láncok eltávolítása egyenként vagy együtt az aszparagin vagy szerin gyökök mutagenézisével, amelyek a glikozilező helyek, erőteljesen csökkenti a megváltozott EPO in vitro aktivitását, amely emlős sejtekben ter-

melődik [Dube és munkatársai: *J. Biol. Chem.* **263**, 17516 (1988)]. DeLorme és munkatársai azonban arról számoltak be [*Biochemistry* **31**, 9871-9876 (1992)], hogy az N-kapcsolt glikozilező helyek eltávolítása az EPO-ban csökkenti az *in vivo*, de nem csökkenti az *in vitro* aktivitást.

A viszonyt az EPO szialinsav tartalma és az *in vivo* aktivitás között úgy írták le, hogy meghatározták az izolált EPO izoformok *in vivo* aktivitását. Arra jöttek rá, hogy a szialinsav tartalom lépésenkénti növekedése EPO molekulánként a megfelelő lépésenkénti növekedést idézi elő az *in vivo* biológiai aktivitásban, ahogyan ezt az izolált EPO izoformok ekvimoláris koncentrációinak azon képességével mérik, hogy növelik a normál egerek hematokrit értékét [Egrie és munkatársai: *Glycoconjugate J.* **10**, 263 (1993)]. Azok az EPO izoformok, amelyeknek nagyobb szialinsav tartalma van, szintén hosszabb szérum félélettartamot mutatnak, de csökkenő affinitást mutatnak az EPO receptorhoz, azt sugallva, hogy a szérum félélettartam fontos determinánsa az *in vivo* biológiai aktivitásnak.

Új glikozilezési helyek bevezetése az EPO polipeptidbe további szénhidrát láncokkal bíró molekulák kialakulását eredményezheti. (Ezzel kapcsolatban lásd a WO 91/05867 és WO 94/09257 számú PCT közzétételi iratokat; mindkettő teljes egészében referenciaként épül be a jelen bejelentésbe.) Leírnak olyan EPO glikozilezési analógokat, amelyek legalább egy további N-kapcsolt szénhidrát láncsal és/vagy legalább egy további O-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak. Egy további N-kapcsolt láncsal bíró glikozilezési analógról meghatározták, hogy hosszabb keringési félélettartama van összehasonlítva a rekombináns humán EPO-val (rHuEPO) (9-14 izoform), és molekulánként 14 szialinsavval bíró rHuEPO egy tisztított izoformjával.

Rekombináns humán eritropoietin (rHuEPO) bevezetése hatékony vörösvérsejt szintek növelésére vérszegény betegekben vesebetegség

végző stádiumánál [Eschbach és munkatársai: *New Eng. J. Med.* **316**, 33-38 (1987)]. Későbbi tanulmányok kimutatták, hogy a kezelés rHuEPO-val helyreigazít sok más állapottal társult vérszegénységet [Fischl és munkatársai: *New Eng. J. Med.* **322**, 1488-1493 (1990); Laupacis: *Lancet* **341**, 1228-1232 (1993)]. Szabályozottan elfogadták az rHuEPO alkalmazását CRF-fel társult vérszegénység kezelésére, a HIV-vel fertőzött betegekben AZT-vel (zidovudin) végzett kezeléssel társuló vérszegénység kezelésére, nem-mieloid rosszindulatú daganatokban szenvedő, kemoterápiás kezelés alatt álló betegekben kialakuló vérszegénység kezelésére és sebészeti beavatkozáson keresztül esett betegekben kialakuló vérszegénység kezelésére, hogy csökkenteni lehessen az igényt allogén vértranszfúzióra. A jelenlegi terápia az összes elfogadott indikációhoz (kivéve a sebészeti indikációt) magában foglal egy kiindulási dózist 50-150 egység/kg között hetenként háromszor [times per week (TIW)], vagy intravénás (IV), vagy szubkután (SC) injekcióval, hogy el lehessen érni egy javasolt cél hematokrit érték tartományt. A sebészeti indikációnál az rHuEPO-t minden nap beadják a sebészeti beavatkozás előtti tizedik naptól, majd a sebészeti beavatkozás napján, és négy nappal ezután (EPO-GEN Package Insert, 12/23/96). A jelenleg ajánlott kiindulási dózisok rHuEPO-nál felemelik a hematokrit értéket a cél tartományba általában mintegy hat-nyolc héten belül. Amikor elérik a cél hematokrit értéket, megállapítanak egy fenntartó dózis menetrendet, amely függ a betegről, de tipikusan háromszor egy héten CRF-fel társuló vérszegénységben szenvedő betegeknek. Az rHuEPO fentebb leírt beadása hatékony és jól tűrhető adagolási rend a vérszegénység kezelésére.

Kíváncos lenne olyan gyógyszer, amely nagyobb hatékonyságú, mint az rHuEPO. Egy ilyen molekula előnye az lenne, hogy azt kevésbé gyakran kell bevezetni és/vagy kisebb dózisokban. A jelenlegi kezelés a



vérszegénységben szenvedő betegeknel EPOGEN háromszori beadását követeli hetenként, és sebészeti beavatkozásra váró betegeknel napi egy beadást követel. Egy kevésbé gyakori adagolási menetrend kényelmesebb lenne mind az orvosnak, mind a betegnek, különösen azoknak a betegeknek, akik nem tudják szabályos időközönként meglátogatni az orvos rendelőjét vagy a klinikát, vagy azoknak a betegeknek, akik maguknak adják be az injekciót. A hatékonyabb molekulának egy másik előnye, hogy kevesebb gyógyszert kell bevezetni a betegbe hematokrit érték jelentős növelésére.

A találmány tárgya ennél fogva hatékonyabb molekulák azonosítása vérszegénység kezelésére, amely lehetővé tesz egy kevésbé gyakori adagolási menetrendet. A találmány további tárgya olyan molekulák szolgáltatása, amelyek növelik és fenntartják a hematokrit értéket olyan szinten, amely legalább hasonló az EPO által biztosított szinthez akkor is, ha kisebb dózisban alkalmazzuk. A találmány tárgyai azok a molekulák is, amelyek kevésbé gyakori adagoláshoz vannak kiválasztva, és legalább olyan jól tűrhetők, mint az rHuEPO, és bizonyos betegekben esetleg jobban is tűrhetők.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmányt.

Arra jöttünk rá, hogy az N47-nek nevezett hiperglikozilezett EPO analóg (Asn30 Thr32 Val87 Asn88 Thr90 EPO) hosszabb szérumbélélettartammal bír, mint a rekombináns humán eritropoietin (rHuEPO), és nagyobb in vivo aktivitással bír, mint amikor azonos dózisban és gyakorisággal vezetjük be, mint az rHuEPO-t. Ezen kívül az analógról kimutatjuk, hogy növeli a hematokrit értékeket egerekben hetenként egyszeri beadásnál, és ez hasonló azzal a hematokrit érték növekedéshez, amelyet az rHuEPO idéz elő hetenként háromszori bevezetésnél. Az egerekbe és emberekbe bevezetett N47 EPO analóg farmakokinetikája hasonló.

A találmány eljárást nyújt hematokrit érték növelésére és fenntartására valamely emlősben; az eljárás abból áll, hogy bevezetjük hiperglikozilezett EPO analóg gyógyászatilag hatékony mennyiségét valamely gyógyászati kompozíció formájában, ahol az analógot kevésbé gyakran vezetjük be, mint az rHuEPO ekvivalens moláris mennyiségét, hogy hasonló cél hematokrit értéket kapjunk. A találmány adagolási gyakorisága abból a célból, hogy elérjük a beteg optimális hematokrit érték tartományát, kevesebb, mint hetenként háromszor. Az adagolási gyakoriság lehet kétszer hetenként, egyszer hetenként, vagy kevesebb, mint egyszer hetenként, például egyszer minden második héten, egyszer havonként vagy egyszer kéthavonként. A beteg cél hematokrit értékének fenntartására szükséges adagolási gyakoriság kevesebb, mint hetenként háromszor. A dózis gyakoriság lehet kétszer hetenként, egyszer hetenként, vagy kevesebb, mint egyszer hetenként, például egyszer minden második héten, egyszer havonként vagy egyszer kéthavonként.

A találmány továbbá eljárást nyújt hematokrit érték növelésére és fenntartására valamely emlősben, amely eljárás abból áll, hogy bevezetjük hiperglikozilezett EPO analóg gyógyászatilag hatékony mennyiségét, ahol az analógot kisebb moláris mennyiségben vezetjük be, mint az rHuEPO-t, hogy hasonló cél hematokrit értéket kapjunk.

A találmány gyógyászati kompozíciókat is szolgáltat, amelyek hiperglikozilezett analógokat tartalmaznak, ahol a kompozíciók alkalmasak hetenként háromszori adagolásnál kisebb gyakoriságú adagoláshoz. A kompozíciók magukban foglalhatnak olyan gyógyászatilag elfogadható adjuvánsokat is, amelyek alkalmasak a hiperglikozilezett EPO analógokkal együtt történő alkalmazáshoz.

A találmányt alkalmazhatjuk bármely körülmény között, amely csökkenést eredményez a vörösvérsejt szintekben, ilyen például a veseműködés gyengülésével vagy elvesztésével (krónikus veseelégtelenség)

társult vérszegénység, mieloszuppresszív terápiával társult vérszegénység, rákkal társult vérszegénység, vírusfertőzéssel társult vérszegénység, krónikus betegségekkel társult vérszegénység, és a sebészeti beavatkozások során történt fölösleges vérvesztés okozta vérszegénység. Az egyik kiviteli módban a kezelés hetenként egyszeri dózissal vagy még kevésbé gyakran alkalmas krónikus veseelégtelenségből kialakult vérszegénységhez.

A találmány szolgáltatja továbbá az EPO új hiperglikozilezett analógjait. Az analógok tartalmaznak legalább egy további szénhidrát láncot az rHuEPO-val összehasonlítva, ahol a legalább egy N-kapcsolt szénhidrát az 52.; 53.; 55.; 86.; és 114. helyek bármelyikén van hozzáadva. Az új hiperglikozilezett analógok tartalmazhatnak két, három vagy négy további szénhidrát láncot, vagy rendelkezhetnek több, mint négy további láncsal.

Az alábbiakban röviden bemutatjuk az ábrákat.

Az 1. ábra mutatja be a humán eritropoietin aminosav szekvenciáját.

A 2. ábra mutatja be az rHuEPO és a CHO sejtekből való, szérummentes tápközegben expresszált hiperglikozilezett EPO analógok Western-foltképezését. Az N53 és N61 analógok megalkotását az 1. példában írjuk le. Az egyes analógokon az N-kapcsolt szénhidrát számát jelöljük.

A 3. ábra összehasonlítja az rHuEPO és az N4, N18, N50 (amely négy N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmaz), N47 (amely öt N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmaz) és N53 (amely hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmaz) aktivitását az exhipoxiás, policitémiás egér biológiai vizsgálatban. A kísérleti munkamenetek a 3. példában vannak leírva. Minden pont öt állat válaszainak átlagát képviseli. Az N4, N18 és N47 analógokat a korábbiakban a WO 94/09257 számú PCT közzétételi iratban írták le.

A 4. ábra összehasonlítja az rHuEPO és az N47 EPO analóg félélettartamát normál patkányoknak beadva intravénás injekcióval (IV). A kísérleti munkameneteket a 4. példában írjuk le. Az eredmények az egyes csoportok átlagát képviselik ($\pm$ SD, vagyis standard eltérés).

Az 5. ábra összehasonlítja az rHuEPO és az N47 EPO analóg szérum félélettartamát Beagle kutyáknak beadva intravénás injekcióval (IV). A kísérleti munkameneteket a 4. példában írjuk le. Az eredmények az egyes csoportok átlagát képviselik ($\pm$ SD, vagyis standard eltérés).

A 6. ábra hematokrit érték növekedését mutatja be rHuEPO vagy N47 EPO analóg különböző dózisaira adott válaszbán, intraperitoneális injekcióval (IP) beadva hetenként háromszor (TIW) hat héten át. A kísérleti munkameneteket az 5. példában írjuk le. Az eredmények a hematokrit érték változásának csoport átlagai ($\pm$ SD) az egyes csoportoknál.

A 7. ábra összehasonlítja az rHuEPO és N47 EPO analóg relatív hatékonyságát vagy intraperitoneális (IP), vagy intravénás (IV) úton bevezetve hetenként egyszeri gyakorisággal (QW) vagy háromszor hetenkénti gyakorisággal (TIW). A kísérleti munkamenetet az 5. példában írjuk le. Az egyes pontok az adatok átlagát képviselik ($\pm$ SD) a különböző kísérletekből a következők szerint: N47, IP, TIW ($n=5$); N47, IV, TIW ($n=1$); N47, IP, QW ($n=2$); N47, IV, QW ($n=3$); rHuEPO, IP, TIW ($n=5$), rHuEPO, IV, QW ($n=2$). Minden kísérlet 7-13 egeret alkalmaz adagonként.

A 8. ábra mutatja be a növekedést a hematokrit értékben egerekben rHuEPO vagy N47 EPO analóg különböző dózisára adott válaszbán, intravénás injekcióban (IV) bevezetve hetenként egyszer vagy kétszer (QW) mintegy hat héten át. A kísérleti munkameneteket az 5. példában írjuk le. Az eredmények a hematokrit érték változások csoport átlagai ($\pm$ SD) az egyes csoportoknál.

A 9. ábra mutatja be a növekedést a hematokrit értékben egerekben N47 EPO analóg különböző dózisaiba adott válaszbán, intravénás injekcióban (IV) bevezetve egyszer egy héten (QW) vagy egyszer minden második héten (EOW) mintegy hat héten át. A kísérleti munkameneteket az 5. példában írjuk le. Az eredmények a hematokrit értékek változásának csoport átlagai ($\pm$ SD) az egyes csoportoknál.

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmányt.

A találmány eljárást nyújt hematokrit érték növelésére és fenntartására, amely eljárás abból áll, hogy beadjuk valamely gyógyászati kompozícióban az eritropoietin valamely hiperglikozilezett analógjának gyógyászatilag hatékony mennyiségét. Az analógot kevésbé gyakran adjuk be, mint az rHuEPO moláris ekvivalens mennyiségét, hogy hasonló cél hematokrit értéket kapjunk. A találmány továbbá eljárást nyújt hematokrit érték növelésére és fenntartására, amely eljárás abból áll, hogy egy hiperglikozilezett analógot kisebb molekuláris mennyiségben vezetünk be, mint az rHuEPO molekuláris mennyisége, hogy hasonló cél hematokrit értéket kapjunk. A kompozíciót bevezethetjük intravénásan, szubkután vagy intraperitoneális úton.

Meglepő módon arra jöttünk rá, hogy az N47 analóg, vagyis egy hiperglikozilezett EPO analóg, amelyet a WO 94/09257 számú PCT közlési iratban ismertettek, növekedést érhet el a hematokrit értékben hetenként egyszer beadva, amely érték hasonló ahhoz, amely rHuEPO hetenként háromszori beadásánál figyelhető meg. Az N47 a következő aminosav cserékkel jellemezhető: Ala Asn-ra a 30. helynél; His Thr-re a 32. helynél, Pro Val-ra és 87. helynél; Trp Asn-ra a 88. helynél; és Pro Thr-re a 90. helynél, amelyet két N-kapcsolt szénhidrát lánc hozzáadása eredményez a 30. és 88. aszparagin gyököknél. Az analógok kínai hörcsög petefészek [Chinese hamster ovary (CHO)] sejtekben expresszálódnak (amint ez az 1. példában le van írva) és úgy vannak

lisztítva, ahogyan ez a 2. példában le van írva, hogy megkapjuk a 17-22 szialinsavas izoformokat. Az N47 analóg nagyobb félélettartamot mutat patkányokban és Beagle kutyákban, mint az rHuEPO, amikor intravénásan injektáljuk (4. és 5. ábrák). Amikor intraperitoneálisan injektáljuk háromszor hetenként, az N47 növekedést indukál a normál egerek hematokrit értékeiben kisebb koncentrációkban az rHuEPO-val összehasonlítva (6. ábra). Az N47 hatékonyságáról kimutatjuk, hogy 3-4-szer nagyobb, mint az rHuEPO-é, amikor háromszor hetenként adjuk be (6. és 7. ábra). Amikor hetenként egyszer adjuk be hasonló dózisokban, az rHuEPO a normál egerekben kis hematokrit értéket stimulál, míg az N47 határozott növekedést ad (8. ábra). Az N47 hatékonysága mintegy 14-szerese az rHuEPO-énak a hetenként egyszeri beadásnál (7. ábra). Lényeges, hogy a hematokrit érték válasz a hetenként egyszer beadott N47 analógra hasonló ahhoz, mint az rHuEPO-ra adott válasz hetenként háromszori beadásra. Még akkor is, amikor minden második héten adjuk be, az N47 szignifikáns növekedést idéz elő a hematokrit értékben normál egerekben (9. ábra). Összefoglalva az adatok azt jelzik, hogy a hiperglikozilezett analógok, különösen az N47 analóg, előnyösen alkalmazhatók a hematokrit értékek növelésére kevésbé gyakori adagolást alkalmazva, mint a jelenlegi kezelés gyakorisága rHuEPO-val.

Azt is bemutatjuk, hogy az előzőekben leírt, egerekben kapott eredmények extrapolálhatók emberekre. A farmakokinetikai paraméterek rHuEPO és az N47 analóg beadásnál 11 folyamatos ambuláns peritoneális dialízist [Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD)] igénylő betegnél azt demonstrálják, hogy az N47 analógnak háromszor hosszabb a szérum félélettartama, mint az rHuEPO-é (6. példa és 6. táblázat). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hiperglikozilezett EPO analógok lehetővé teszik emberekben a kevésbé gyakori adagolást, mint az rHuEPO adagolása.

Ahogy itt használjuk, a „hiperglikozilezett EPO analóg” kifejezés olyan EPO-ra utal, amely legalább egy további glikozilezési hellyel bír egy további szénhidrát láncsal, amely ehhez a glikozilezési helyhez hozzá van adva. A glikozilezési hely szolgálhat N-kapcsolt vagy O-kapcsolt szénhidrát láncokhoz. Az új N-kapcsolt glikozilező helyek a DNS szekvencia megváltoztatásával vezethetők be, hogy kódolják a konszenzus helyet N-kapcsolt szénhidrát hozzáadásához (az Asn-X-Ser/Thr aminosavak) az aminosav láncban, miközben az új O-kapcsolt helyek a DNS szekvencia megváltoztatásával vezethetők le, hogy egy szerin vagy egy treonin gyököt kódoljanak. Az analógokat mutagenézises technikákkal alkotjuk meg aminosavak hozzáadásainak (addíció), kiiktatásainak (deléció) vagy helyettesítéseinek (szubsztitúció) bevezetésével, hogy növeljük az olyan helyek számát vagy megváltoztassuk azoknak a helyeknek az elhelyezkedését az EPO polipeptidben, amelyek a glikozilezésre rendelkezésre állnak. Egy hiperglikozilezett EPO analógot kódoló DNS-t átfertőzünk valamely eukarióta gazdaszervezetbe és az expresszált glikoproteint elemezzük további szénhidrát lánc jelenlétére.

A hiperglikozilezett EPO analógok olyan in vitro aktivitást mutatnak, amely hasonló vagy akár kisebb is, mint amelyet rHuEPO-val határozzunk meg, azt sugallva, hogy a kötés az EPO receptorhoz nem fokozott, sőt, bizonyos esetekben csökkent is lehet szénhidrát láncok hozzáadásával. A hiperglikozilezés azonban tipikusan növeli a szérum félélettartamot és potenciálisan megnövekedett in vivo biológiai aktivitáshoz vezet. Egy olyan EPO analóg, amely további N-kapcsolt szénhidrát láncsal bír a 88. helyen, csökkent affinitást mutat a receptorhoz, összehasonlítva az rHuEPO-val (9-14 izoform) vagy az rHuEPO olyan tisztított izomorfjával, amely molekulánként 14 szialinsavval bír, mégis hosszabb keringési félélettartamot és fokozott in vivo aktivitást mutat összehasonlítva akár

egy 9-14 izoformos EPO keverékkel, akár egy izolált 14 izoformos EPO-val.

A hiperglikozilezett EPO analógok, amelyeket a jelen találmány szerint vezetünk be, legalább egy további N-kapcsolt vagy O-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak. Az egyik kiviteli módban az analógok további két N-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak. Egy másik kiviteli formában az analógok három, négy vagy több további N-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak. Példaként említjük azokat a találmány szerinti analógokat, amelyek legalább egy további N-kapcsolt láncsal bírnak a humán EPO szekvenciája 30.; 51.; 57.; 69.; 88.; 89.; 136.; és 138. helyének egyikénél vagy többjénél. Az egyik kiviteli formában az analóg további N-kapcsolt szénhidrogén láncokkal bír a humán EPO 30. és 88. helyénél. A humán EPO aminosav gyökeinek számozását az 1. ábrában és a SEQ ID NO:1 szekvenciákban mutatjuk be. Az 1. ábra bemutat egy 166 aminosavas megjósolt érett EPO polipeptidet, míg a rekombináns úton kialakított EPO-nak 165 aminosava van a C-terminális arginin gyök eltávolítása után. Meg lehet érteni, hogy az rHuEPO és a hiperglikozilezett EPO analógok 165 vagy 166 aminosavval bírhatnak.

A találmány szerinti analógoknak legalább négy N-kapcsolt szénhidrát lánc van. A négy láncból három lehet a természetben előforduló glikozilező helyeknél, vagyis a 24.; 38.; és 83. helyeknél. Szóba jön azonban az is, hogy bizonyos találmány szerinti analógok változásokkal bírhatnak egy vagy több természetben előforduló glikozilező helynél úgy, hogy a glikozilező helyek közül egy vagy több ki van iktatva és új glikozilező hellyel van helyettesítve. Ilyen analógokat biztosít a találmány is. Így például a 24.; 38.; és 83. helyeknél levő glikozilező helyek közül az egyik ki lehet iktatva és helyettesítve lehet egy 88. helyen levő glikozilező hellyel. Kívánt esetben az analógok rendelkezhetnek egy O-kapcsolt glikozilező hellyel a 126. helynél.

A találmány szolgáltat új hiperglikozilezett EPO analógokat, amelyeknek legalább egy további szénhidrát láncuk van. Azt találtuk fel, hogy egy további N-kapcsolt szénhidrát láncot adunk az 52.; 53.; 55.; 86.; és 114. helyek bármelyikéhez, amely helyek úgy vannak módosítva, hogy glikozilező helyek legyenek. Speciális kiviteli formák magukban foglalják az analógokat N49-től N61-ig, amint ezt a 2. táblázatban bemutatjuk. Az új analógok legalább egy új, N-kapcsolt glikozilezési hellyel bírnak az 52.; 53.; 55.; 86.; és 114. helyek bármelyikénél, és tartalmazhatnak további N-kapcsolt vagy O-kapcsolt szénhidrogén láncokat más helyeknél. Az analógok rendelkezhetnek egy, kettő, három vagy négy további szénhidrát láncsal, vagy több, mint négy további szénhidrát láncsal. Az egyik előnyös kiviteli formában az analógok három további N-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak (összességében hat N-kapcsolt láncsal). Egy másik előnyös kiviteli formában az analógok négy további N-kapcsolt láncsal bírnak (összességében hét N-kapcsolt láncsal). Azok az analógok, amelyek három vagy négy, vagy több, mint négy további N-kapcsolt szénhidrát láncsal bírnak az 52.; 53.; 55.; 86.; és 114. helyek bármelyikénél, a korlátozás szándéka nélkül, bírhatnak egy további láncsal.

Meglepő módon arra jöttünk rá, hogy egy hiperglikozilezett analóg három további N-kapcsolt láncsal a 30.; 53.; és 88. helyeknél (összesen hat N-kapcsolt láncsal) nagyobb in vivo aktivitással bír, mint az N47 analóg két további láncsal (összesen öt láncsal). Az eredményeket a 3. ábrában mutatjuk be. Világos, hogy ezeknek az analógoknak az in vivo aktivitása közvetlenül függ az N-kapcsolt szénhidrát láncok számától. Ezek az eredmények extrapolálhatók a terápiás beállításhoz, ahol az N47-hez viszonyítva több N-kapcsolt szénhidrát láncsal bíró analóg adagolható még kisebb gyakorisággal.

Az analógok előállíthatók sokféle mutagenézises technikával, amelyek azok számára, akik a szakterületen járatosak, rendelkezésre állnak.

Ilyen például a helyre irányuló mutagenézis, PCR mutagenézis és kazetta mutagenézis [Zoller és munkatársai: *Meth. Enz.* 100, 468-500 (1983); Higuchi: a „PCR Protocols” című szakkönyvben, a 177-183. oldalon (Academic Press, 1990); Wells és munkatársai: *Gene* 34, 315-323 (1985)]. Az 1. példa leírja a PCR mutagenézises technikák alkalmazását új hiperglikozilezett analógok megalkotására.

Egy EPO DNS szekvenciát, amely mutagenézisen ment keresztül, beiktatunk egy expressziós vektorba standard technikákat alkalmazva olyan vektorokkal, amelyek alkalmasak a fennmaradásra valamely emlős gazdasejtben. A vektor tipikusan a következő elemeket tartalmazza: promóter és más „felfelé” (upstream) szabályozó elemek, replikációs origó, riboszóma kötőhely, transzkripció terminációs hely, polilinker hely, és szelektálható marker, amely kompatibilis egy emlős gazdasejtben való felhasználással. A vektorok tartalmazhatnak olyan elemeket is, amelyek lehetővé teszik a szaporodást és a fenntartást prokarióta gazdasejtekben is.

A megfelelő sejtek vagy sejtvonalak bármely emlős forrásból származóak lehetnek, ide értve az emberi forrásokat is. A példák közt találhatók a COS-7 (ATCC CRL 1651), humán 293, újszülött hörcsög vese [baby hamster kidney (BHK) (ATCC CCL 10)], kínai hörcsög petefészek sejtek [ide értve a dihidrofolát redukáz(DHFR)-hiányos sejteket, lásd Urlaub és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216-4220 (1980)]. További megfelelő emlős sejtvonalak lehetnek, a korlátozás szándéka nélkül, a HeLa, egér L-929 és 3T3 sejtvonalak. Egy előnyös kiviteli módban DHFR-hiányos CHO sejteket alkalmazunk.

Hiperglikozilezett EPO analógokat kódoló szekvenciákat tartalmazó vektorokat vezetünk be gazdasejtekbe standard transzformációs vagy átfertőzőses (transzfekeció) technikákkal. A transzformált vagy átfertőzött gazdasejtek tenyésztését, amplifikálását és átvizsgálását széles

körben ismert, rendelkezésre álló eljárások alkalmazásával végezzük [Gething és munkatársai: *Nature* 293, 620-625 (1981); Kaufman és munkatársai: *Mol. Cell. Biol.* 5, 1750-1759 (1985); 4,419,446 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom]. A hiperglikozilezett EPO analógokat kódoló DNS szekvenciákat magukban foglaló gazdasejteket olyan körülmények között tenyésztjük, amelyek lehetővé teszik az analógok expresszióját. Az analógokat a sejt tápközegéből nyerjük ki és olyan eljárások alkalmazásával tisztítjuk, amelyek lényegében azonosak a korábban leírt eljárásokkal (WO 94/02257 számú PCT közzétételi irat), vagy amelyek a 2. példában vannak leírva. A tisztítási munkamenetek lehetővé teszik nagyobb szialinsav tartalmú EPO izoformok izolálását, amelyek további szénhidrát lánc hozzáadások eredményei.

A hiperglikozilezett EPO analógok magukban foglalhatják az új glikozilező helyeken kívül aminosav gyökök olyan hozzáadását, kiiktatását vagy helyettesítését, amelyek nem alkotnak új glikozilező helyeket és lényegében nem változtatják meg a hiperglikozilezett analóg biológiai aktivitását. Az EPO-nak ezen egyedi helyeit vagy területeit, amelyek a nélkül vannak megváltoztatva, hogy hatnának a biológiai aktivitásra, az EPO-EPO receptor komplex szerkezetének vizsgálatával határozhatjuk meg, ahogyan azt Syed és munkatársai leírják [*Nature* 395, 511 (1998)]. Az EPO-EPO receptor komplex szerkezetének vizsgálata feltárja azokat a gyököket, amelyek kölcsönhatásba lépnek az EPO receptor kötő helyével vagy szoros közelségben kerülnek vele, és amelyeket el kell kerülni, amikor változtatásokat hajtunk végre az EPO aminosav szekvenciájában. Egy másik megoldás szerint empirikusan is meg lehet határozni azokat a területeket, amelyek tűrik az aminosav helyettesítéseket, alanin letapogató mutagenézissel [Cunningham és munkatársai: *Science* 44, 1081-1085 (1989)]. Ebben az eljárásban kiválasztott aminosav gyököket semlegesítünk egyedileg valamely semleges aminosavval (például

alaninnal) abból a célból, hogy meghatározzuk a hatásokat a biológiai aktivitásra.

Általában felismerhető, hogy a konzervatív aminosav cserék legalábbis valószínű, hogy zavarják egy polipeptid szerkezetét és/vagy funkcióját. Következésképpen a találmány körülölel egy vagy több konzervatív aminosav változtatást egy hiperglikozilezett EPO analógon belül. A konzervatív aminosav cserék általában egy aminosav helyettesítését érintik egy másikkal, amely szerkezetében és/vagy funkciójában hasonló (például aminosavak olyan oldalláncokkal, amelyek hasonlóak méretben, töltésben és alakban). Ezeknek a változásoknak a természete jól ismert azok számára, akik a szakterületen járatosak, és az ez utáni 1. táblázatban vannak összefoglalva. Ilyen konzervatív helyettesítéseket mutatunk be az „Előnyös helyettesítések” fejléce alatt. Figyelembe kell venni, hogy több helyettesítéses változás is létezhet („Példa szerinti helyettesítések”), amelyeket szintén be lehet vezetni. Azok, akik a szakterületen járatosak, tisztában vannak azzal, hogy kiinduláshoz a helyeket módosítani kell helyettesítéssel viszonylag konzervatív módon. Ha ilyen helyettesítések visszatartást eredményeznek a biológiai aktivitásban, akkor több helyettesítéses cserét lehet bevezetni („Példa szerinti helyettesítések”) és/vagy további hozzáadásokat/kiiktatásokat lehet elvégezni, majd a létrejövő termékeket átvizsgálni.

1. TÁBLÁZAT. Aminosav helyettesítések

Eredeti gyök	Előnyös helyettesítések	Példa szerinti helyettesítések
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucin
Leu (L)	Ile	norleucin; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucin

A találmány továbbá aminosavak kiiktatásait vagy hozzáadásait is nyújtja egy hiperglikozilezett EPO analógban, amely kiiktatások vagy hozzáadások lényegében nem hatnak a biológiai aktivitásra. Az ilyen hozzáadások és kiiktatások lehetnek a polipeptid N-terminálisánál vagy C-terminálisánál, de lehetnek belül is. A viszonylag kicsiny kiiktatások vagy hozzáadások kevésbé valószínű, hogy hatással vannak az EPO



vagy hiperglikozilezett analógja szerkezetére és/vagy funkciójára. Az egyik kiviteli formában a kiiktatások és hozzáadások 5-10 gyök köztiek lehetnek, egy másik megoldás szerint 2-5 aminosav gyök köztiek lehetnek, vagy 1-2 gyököt jelenthetnek.

A „moláris mennyiség” kifejezés hiperglikozilezett analóg vagy rHuEPO olyan mennyiségére utal, amely a glikozilezés nélküli megfelelő eritropoietin polipeptid molekulatömegére van alapozva. Az rHuEPO és analóg ekvivalens mennyiségei olyan mennyiségre utalnak, amelyek azonosak, amikor számításba vesszük a normális variációkat az ilyen meghatározásra alkalmas munkamenetekben. Szükséges meghatározni ilyen módon az ekvivalens mennyiségeket, mivel az rHuEPO és analógok molekulatömegei változnak a szénhidrát láncok számától függően. Az rHuEPO-nál az eritropoietin polipeptid molekulatömegét az 1-165. aminosav gyökökre alapozva számítjuk ki, ahogyan az 1. ábrában és a SEQ ID NO:1 szekvenciában bemutatjuk. A hiperglikozilezett analógoknál a molekulatömeget az aminosav változásoktól függően állítjuk be az 1. ábra és a SEQ ID NO:1 szekvencia 1-165. gyökeiben.

Egy hiperglikozilezett analóg adagolási gyakorisága függ a kezelen-dő állapottól és a cél hematokrit értéktől, de általában kevesebb, mint háromszor hetenként. Az adagolási gyakoriság lehet mintegy kétszer hetenként, vagy mintegy egyszer hetenként. Az adagolási gyakoriság kevesebb, mint mintegy hetenként egyszer, például minden második héten (mintegy egyszer 14 naponként), havonként egyszer vagy minden második hónapban. Meg lehet érteni, hogy a ténylegesen alkalmazott adagolási gyakoriságok valamelyest változhatnak az itt leírt gyakoriságokhoz képest a különböző egyedek EPO analógokra adott válaszainak variációja szerint; a „mintegy” kifejezés végül is az ilyen variációk miatt szerepel.

Ahogy itt használjuk, a „gyógyászatiilag hatékony mennyiség” kifejezés egy hiperglikozilezett analóg olyan mennyiségére utal, amely növekedést ad a hematokrit értékben egészen a cél hematokrit értékig, vagy egy olyan cél hematokrit tartományig, amely előnyt nyújt a betegnek; vagy egy másik megoldás szerint olyan mennyiségre utal, amely egy beteget egy cél hematokrit értéken tart vagy egy cél hematokrit érték tartományon belül tart. A mennyiség változik egyik egyéntől a másikig és számos tényezőtől függ, ide értve a beteg általános fizikai állapotát, a vérszegénység súlyosságát és tényleges okát, és a végső cél hematokrit értéket az egyes betegekhez. A cél hematokrit érték tipikusan legalább mintegy 30%, vagy a 30%-38% közti tartományban van, előnyösen 38%, és még előnyösebben 40-45%. A cél hematokrit tartományokra vonatkozó általános irányvonalak megtalálhatók az EPOGE csomag betétjében (12/23/96 keltezéssel), és ez 30%-36%, vagy egy másik érték szerint 32%-38%, ahogyan ott megállapítják. Meg lehet érteni, hogy az ilyen célok változhatnak az egyik egyéntől a másikig úgy, hogy az orvos megfontolása lehet megfelelő a tényleges cél hematokrit érték meghatározásában bármely adott betegnél. Mindazonáltal egy cél hematokrit érték meghatározása alaposan a szakterületen belüli jártasság keretén belül van.

A jelen kompozíciók gyógyászatiilag hatékony mennyiségét könnyen megbecsülheti az, aki a szakterületen járatos. A 6. példa bemutat egy klinikai munkamenetet, amelynek egyik tárgya meghatározni az N47 analóg gyógyászatiilag hatékony mennyiségét mind hetenként egyszeri, mind hetenként háromszori adagolásnál. Egy dózistartomány hetenként egyszeri beadásnál mintegy 0,075 és mintegy 4,5 μg eritropoietin peptid között van testtömeg kg-onként, adagonként. Egy dózistartomány hetenként háromszori beadásnál 0,025 és 1,5 μg eritropoietin peptid között van testtömeg kg-onként, adagonként. Ezt a dózistartományt alkalmaz-

hatjuk más hiperglikozilezett analógokhoz is bármely hozzáigazítással a adagolási tartományban, amely hozzáigazítás rutinművelet azok számára, akik a szakterületen járatosak.

A jelen találmány jelentős előnye az a képesség, hogy korrelációba hozza a hiperglikozilezés mértékét vagy egy dózis mennyiséggel, vagy egy dózis időközzel, amely lehetővé teszi egy EPO analóg „kiszabás”-át egy adott dózishoz vagy adagolási rendhez. Az egy, két vagy három további szénhidrát láncsal bíró EPO analógok in vivo aktivitásainak megnövekedésére alapozva, ahogyan a 3. ábrában bemutatjuk, a kezelő orvos kiválaszthat egy olyan analógot, amely megfelelő és kényelmes a kezelendő vérszegénységi állapothoz. Így például azokban a betegekben, akik akut vérszegénységben szenvednek és nagy hatékony dózissra van szükségük, vagy olyan betegekben, akik hosszan tartó kezelést igényelnek, előnyös egy olyan hiperglikozilezett analóg bevezetése, amely három, négy vagy akár több további szénhidrát láncsal bír. Más betegeknel, akiknél kevésbé súlyos vérszegénység tapasztalható vagy viszonylag rövid ideig igényelnek kezelést, előnyös lehet egy olyan analóg, amely egy vagy több további szénhidrát láncsal bír. A jelen találmány szerinti analógok lehetőséget nyújtanak az orvos számára a jelentős rugalmasságra az olyan vérszegénység megelőzésére és kezelésére, amely sokféle idevágó körülmény eredménye lehet.

A találmány eljárást nyújt vas gyógyászatiilag hatékony mennyiségének bevezetésére abból a célból, hogy fenntartsuk a megnövekedett eritropoiezist a terápia során. A beadandó mennyiséget azok, akik a szakterületen járatosak, könnyen meg tudják határozni az rHuEPO-val végzett terápiára alapozva.

A jelen találmány alkalmazható a vörösvérsejt termelés stimulálására és a vérszegénység kezelésére. A találmánnyal kezelhető állapotok magukban foglalják a veseműködés gyengülésével vagy elvesztésével

(krónikus veseelégtelenség) társult vérszegénységet, mieloszuppresszív terápiával, például kemoterápiás vagy vírusellenes gyógyszerekkel (például AZT-vel) végzett terápiával társult vérszegénységet, nem mieloid rákok előrehaladásával társult vérszegénységet, a vírus fertőzésekkel (például HIV) társult vérszegénységet és a krónikus betegségek által előidézett vérszegénységet. Szintén kezelhetők azok az állapotok is, amelyek vérszegénységhez vezethetnek egy egyébként egészséges egyénben, ilyen állapot például egy kiszámítható vérvesztés sebészeti beavatkozás során. Általában bármely állapot, amely rHuEPO-val kezelhető, kezelhető a találmány szerinti hiperglikozilezett EPO analógokkal is.

A találmány gyógyászati kompozíciókat is nyújt, amelyek hiperglikozilezett EPO analógok gyógyászatilag hatékony mennyiségét tartalmazzák valamely gyógyászatilag elfogadható hígítóval, hordozóval, szolubilizáló szerrel, emulgeáló szerrel, tartósító szerrel és/vagy adjuvánssal együtt. A kompozíció alkalmas a hetenkénti háromnál kevesebb adagolási menetrendhez. A kompozíció lehet folyékony vagy liofilizált formájú, és tartalmazhat hígítókat (trisz-, citrát-, acetát- vagy foszfát puffereket), amelyeknek különböző pH értékeik és ionerősségeik vannak, szolubilizáló szereket, például Tween, vagy poliszorbátot, hordozókat, például humán szérum albumint vagy zselatint, tartósító szereket, például timerozált, parabéneket, benzil-alkónium-kloridot, vagy benzilalkoholt, antioxidánsokat, például aszkorbinsavat vagy nátrium-metabiszulfidot, és más alkotórészeket, például lizint vagy glicint. Egy adott kompozíció kiválasztása sokféle tényezőtől függ, ide értve a kezelendő állapotot, a beadás útját és a kívánt farmakokinetikai paramétereit. A gyógyászati kompozíciókhoz alkalmas alkotórészek sokkal kiterjedtebb áttekintése található a Remington's Pharmaceutical Sciences című szakkönyvben; 18. kiadás; szerkesztő: Gennaro A. R., kiadó: Mack,

Easton, Pennsylvania, Amerikai Egyesült Államok. Egy előnyös kiviteli formában a találmány szerinti hiperglikozilezett EPO analógok folyékony formában vannak kisserelve egy izotóniás, nátrium-klorid/nátrium-citráttal pufferolt oldatban, amely humán albumint is tartalmaz, és kívánt esetben tartósító szerként tartalmaz benzilakoholt is. A kompozíció előnyösen olyan analógokat tartalmaz, amelyek egy, két, három, négy vagy több további szénhidrát láncot tartalmaznak.

A találmány szerinti kompozíciókat előnyösen injekcióval vezetjük be vagy szubkután vagy intravénásan. A beadás útja végül is függ egy sor tényezőtől és könnyen felbecsülhető azok által, akik a szakterületen járatosak.

Az itt következő példákat azért mellékeljük, hogy nagyobb teljességgel mutassuk be a találmányt, de ezzel szándékunk nem az, hogy bármilyen módon korlátozzuk a találmány oltalmi körét.

1. PÉLDA

Hiperglikozilezett EPO analógok megalkotása

Hiperglikozilezett EPO analógokat kódoló cDNS-ek megalkotása

EPO analógokat készíthetünk in vitro mutagenézissel sokféle különböző eljárással. Az N49 és N55 analógokat úgy alkotjuk meg, ahogyan ez a WO 94/09257 számú PCT közzétételi iratban le van írva. Analógokat alkotunk meg átfedő PCR (polimerase chain reaction (polimeráz lánc reakció)) eljárások változataival is. Az alap munkamenet két egymást követő lépést foglal magában. Az első lépésben két reakciót (PCR1 és PCR2) hajtunk végre EPO vagy EPO analóg templát DNS-en összesen négy oligonukleotidot alkalmazva: egy 5' forward (előre) primert, egy reverz mutagén primert, egy forward (előre) mutagén primert (amely általában komplementer a reverz mutagén primerrel), és egy 3' (reverz) primert. A mutagén primerek tartalmazzák a kívánt nukleotid cseréket, valamint 6-14 pontosan illeszkedő nukleotidot ezeknek a cseréknek



mindkét oldalán. A PCR1 alkalmazza az 5' (forward) primert és a reverz mutagén primert. A PCR2 alkalmazza a 3' (reverz) primert és a forward mutagén primert. Az amplifikált DNS fragmentumokat elkülönítjük agaróz gélelektroforézissel. A korrekt méretű DNS fragmentumokat tartalmazó kis agaróz darabokat kimetsszük a gélből. A PCR1-ből és PCR2-ből való DNS fragmentumokat egyesítjük és egy harmadik PCR reakciót hajtunk végre csak az 5' forward és a 3' reverz primereket alkalmazva. Így egy teljes hosszúságú, a kívánt mutációkat tartalmazó DNS szegmenst amplifikálunk. Sok esetben két vagy három mutációt egyesítünk egy új helyettesítést bevezetve abba a DNS-be, amely már tartalmaz egy cserét, azonos PCR folyamatokat alkalmazva. Abból a célból, hogy megalkossuk ezeket a többszörös glikozilezési hely analógokat, egyedi kettős vagy hármas hely analógokat (amelyeket a fentebb leírtak szerint állítunk elő) alkalmazunk PCR templátként, és további glikozilező helyeket vezetünk be helyre irányuló mutagenézissel a megfelelő primerekkel.

Az N51, N52 és N53 EPO analógokat átfedő PCR-rel (polimeráz láncreakció) alkotjuk meg az 1. eljárással. Egy további N-glikozilezési helyet vezetünk be minden esetben. Az N56-nál egy glikozilezési hely (N114 T116) van hozzáadva a HuEPO natív szekvenciájához PCR templátként pDSR α 2 EPO alkalmazásával, az N51-nél egy O-kapcsolt glikozilező hely (Thr125) van hozzáadva az N47 EPO-hoz pDSR α 2 EPO N47 templát (Asn30, Thr32, Val87, Asn88, Thr90) alkalmazásával, és az N59-nél egy glikozilező hely (Asn53) van hozzáadva az N47 analóghoz pDSR α 2 EPO N47 templátot alkalmazva.

Az 1. eljáráshoz a polimeráz láncreakciókat a szerint a munkamenet szerint készítjük el, amelyet Cheng és munkatársai közleményéből adaptálunk [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5695 (1994)]. A 3' (reverz) primer olyan szekvenciákat tartalmaz, amelyek bevezetnek egy stop kodont, amelyet egy XbaI restrikciós hely követ:

ATCTAGAAGTTGCTCTCTGGACAGTTCCT (SEQ ID NO:2).

Az 5' forward reakció primer:

GAAGCTTGCGCCACCATGGGGGTGCACGAATG (SEQ ID NO:3)

egy HindIII restrikciós hellyel bír, amelyet egy Kozak szekvencia követ az EPO beindító (iniciátor) kodon (ATG)-tól felfelé. A tipikus PCR reakciókeverék a következőket tartalmazza: 4-4 µl a forward és reverz primerekből (5-5 pmól/µl), 1 µl templát (25 ng), 10 µl 5xLP puffer [100 mmól/l tricin (pH 8,7)/25% glicerín/425 mmól/l KOAc], 10 µl dNTP törzsoldat (1-1 mmól/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,8 µl rTh polimeráz (Perkin Elmer; 2,5 egység/µl), és 2 µl Vent polimeráz (NEB; 0,01 egység/µl 1:100 friss hígítás után 1xLP pufferben). H₂O-t adunk hozzá, hogy elérjük a végső térfogatot, az 50 µl-t. Az összes alkotórészt egymáshoz adjuk a bemutatott sorrendben és a PCR-t akkor indítjuk be, 1 µl 50 mmól/literes MgOAc hozzáadásával, amikor a hőmérséklet az első ciklus után 60°C fölé van. A tipikus reakciófeltételek a következők: 2 ciklus 94°C-on, 10 másodperc 50°C-on, 1 perc 68°C-on, majd 5 perc, ezt követi 25 ciklus 94°C-on, 10 másodperc 55°C-on, 1perc 68°C-on, majd 5perc. Az amplifikált fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel elkülönítjük és a korrekt méretű DNS fragmentumokat tisztítjuk Geneclean készlet és olyan munkamenetek alkalmazásával, amelyet a gyártó cég (Bio 101, Inc.) javasol. A tisztított DNS-t Hind III-mal és Xba I-gyel emésztjük, majd ismét tisztítjuk a Geneclean készlet alkalmazásával. A fragmentumot azután ligáljuk a Hind III-mal és Xba I-gyel hasított pDSRα2 vektorba. A ligált DNS-t azután 2 térfogat etanollal kicsapjuk 0,3 mól/l NaOAc-ban (pH 5,2) hordozó tRNS jelenlétében, és E. coliba transzformáljuk. EPO analógokat vizsgálunk át restrikciós emésztéssel mini DNS preparátumokon. Ezután pozitív klónokból plazmidokat készítünk és a beiktatást szekvencia elemzésnek vetjük alá, hogy igazoljuk a kívánt mutációk

jelenlétét, és biztosítsuk azt, hogy további aminosav cserék ne legyenek bevezetve.

Az N54 – N61 analógokat átfedő PCR stratégia alkalmazásával alkotjuk meg a 2. eljárás szerint. A 3' (reverz) primer olyan szekvenciákat tartalmaz, ahol ezek egy stop kodont vezetnek be, amelyet egy Xba I restrikciós hely követ:

GATCCTCTAGAGTTGCTCTCTGGACAG (SEQ ID NO: 4).

Az 5' forward reakció primer:

CAACAAGCTTGCGCCGCCATGGGGG (SEQ ID NO: 5)

egy Hind III restrikciós hellyel bír, amelyet egy Kozak szekvencia követ egy EPO beindító kodontól (ATC) felfelé (upstream). Egy nagy hitelességű PCR stratégiát hajtunk végre Perkin Elmer U1Tma DNA Polymerase készletet és az ezzel társuló reagenseket alkalmazva: 10 µl 10xPCR puffer, 3 µl 1 mmól/literes dNTP keverék, 5-5 pmól minden egyes primerből, és víz 100 µl végső térfogatig. 0,5 egység U1Tma polimerázt adunk hozzá azután, miután a PCR keverék elérte a 94°C hőmérsékletet. A PCR reakciókat azután 5 cikluson keresztül végezzük, 94°C-on 30 másodpercig, 50°C-on 30 másodpercig, és 72°C-on 90 másodpercig. Ezután 25 ciklust végzünk, 94°C-on 30 másodpercig és 72°C-on 90 másodpercig. A korrekt méretű termék csíkokat kimetsszük az agaróz gélből az elektroforézist követően.

A létrejövő PCR termékeket az egyes analógokhoz tisztítjuk a Qiagen gél extrakciós készletet alkalmazva. A tisztított DNS-t emésztjük 100 µl restrikciós enzimes készítménnyel, Hind III és Xba I restrikciós enzimekkel (Boehringer Mannheim) 37°C hőmérsékleten 1 órán át. Az emésztményt ismét gélen tisztítjuk és az emésztett fragmentumot azután Hind III-mal és Xba I-gyel emésztett pDSRα2 vektorba ligáljuk.

A ligált DNS-t 2 térfogat etanollal kicsapjuk 0,3 mól/l NaOAc-ban (pH 5,2) hordozó tRNS jelenlétében, és *E. coli*-ba transzformáljuk. Az EPO analógokat előnyösen telep PCR-rel vizsgáljuk át, hogy olyan klónokat azonosítsunk, amelyek tartalmazzák a korrekt méretű és típusú DNS beiktatást. Ezzel a munkamenettel a plazmidokat tartalmazó sejteket PCR csövekbe helyezzük EPO forward és reverz primerek jelenlétében. A keveréket azután PCR-nek vetjük alá az előzőekben leírt reakciófeltételeket alkalmazva. A pozitív klónokból plazmidokat preparálunk, és az EPO analóg beiktatást (inzerter) szekvencia elemzésnek vetjük alá, hogy igazoljuk a kívánt mutációk jelenlétét és biztosítsuk, hogy további aminosav cserék ne legyenek bevezetve.

2. TÁBLÁZAT

N-KAPCSOLT SZÉNHIDRÁT LÁNCOKHOZ HELYEKKEL BÍRÓ
ERITROPOIETIN ANALÓGOK

Analóg	Aminosav helyettesítés	Szekvencia változások
N49	Lys, Met → Asn52, Thr54	AAG, ATG → AAT, ACC
N50	Arg, Glu → Asn53, Thr55	AGG, GAG → AAT, ACG
N51	Ala, His, Pro, Trp, Pro, Ala → N30, T32, V87, N88, T90, T125	GCT, CAC, CCG, TGG, CCC, GCC → AAT, ACG, GTG, AAT, ACC, ACC
N52	Ala, Lys → Asn114, Thr116	GCC, AAG → AAC, ACG
N53	Ala, His, Arg, Glu, Pro, Trp, Pro → N30, T32, N53, T55, V87, N88, T90	GCT, CAC, AGG, GAG, CCG, TGG, CCC → AAT, ACG, AAT, ACG, GTG, AAT, ACC
N54	Glu, Gly → Asn55, Thr57	GAG, GGG → AAT, ACT
N55	Gln, Pro, Trp → Asn86, Val87, Thr88	CAG, CCG, TGG, → ACC, GTG, ACG
N56	Pro, Trp, Pro → Ala87, Asn88, Thr90	CCG, TGG, CCC → GCG, AAT, AAC
N57	Pro, Trp, Pro → Val87, Asn88, Ser90	CCG, TGG, CCC, → GTG, AAT, AGC
N58	Pro, Trp, Glu, Pro → Val87, Asn88, Gly89, Thr90	CCG, TGG, GAG, CCC → GTG, AAT, GGG, AAC
N59	Ala, His, Arg, Glu → Asn30, Thr32, Asn53, Asn55	GCT, CAC AAG, GAG → AAT, ACG, AAT, ACG
N60	Ala, His, Ala, Lys → Asn30, Thr32, Asn114, Thr116	GCT, CAC, GCC, AAG → AAT, ACG, AAC, ACG
N61	A, H, R, E, P, W, P, A, K → N30, T32, N53, T55, V87, N88, T90, N114, T115	GCT, CAC, ACG, GAG, CCG, TGG, CCC, GCC, AAG → AAT, ACG, AAT, ACG GTG, AAT, ACC, AAC, ACG

A szénhidrát hozzáátétel elemzése

A hiperglikozilezett EPO analógokhoz tartozó konstrukciókat, amelyek be lettek iktatva a pDSR α 2 expressziós vektorba, átfertőzzük COS sejtekbe. Az átfertőzött COS sejtekből való felülűszókat elemezzük

Western foltképzéssel, hogy meghatározzuk, vajon az expresszált és kiválasztott EPO analóg tartalmaz-e további szénhidrátot. A mintákat közvetlenül ráterheljük SDS-PAGE gélek üregeibe, majd elemezzük immunfolt technikával a 9G8A monoklonális antitestet alkalmazva [Elliott és munkatársai: Blood 87, 2714 (1986)]. Az analóg minták mozgékonyságait összehasonlítjuk az rHuEPO-t tartalmazó minták mozgékonyságával. Az 1. ábra mutatja be az N53 és N61 minták csökkentett mozgékonyságát az N4 analóggal (négy szénhidrát lánc) és N47 analóggal (öt szénhidrát lánc) összehasonlítva. A mozgékonyság összevág hat szénhidrát lánc jelenlétével az N53 analógokban és hét szénhidrát lánc jelenlétével az N61 analógban. Az adatokat az összes hiperglikozilezett analóghoz a 3. táblázatban mutatjuk be.

In vitro biológiai mérések

Az rHuEPO-t vagy analógokat expresszáló COS vagy CHO sejtekkel kondicionált tápközegeket mérünk 3H-timidin felvétel stimulálására UT7-EPO sejtek által (Komatsu és munkatársai: Blood 82, 456). Az UT7-EPO sejtek érzékenyek EPO-ra és humán EPO receptorokat expresszálnak sejtfelületükön. Az UT7-EPO sejteket „növesztő” tápközegben [1xIscove-féle módosított Dulbecco tápközeg L-glutaminnal, 25 mmól/l HEPES puffer, és 3024 mg/l nátrium-bikarbonát, de α -tioglicerin vagy β -merkaptó-etanol nélkül (GIBCO)/10% (térfogat/térfogat) borjúembrió szérum/1% (térfogat/térfogat) L-glutamin-penicillin-streptomycin oldat (Irvine Scientific)/1 egység/ml rHuEPO] növesztjük mintegy $3 \cdot 10^5$ sejt/ml-ig. Sejteket gyűjtünk centrifugálással (mintegy 500xg), kétszer mossuk foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldattal, majd újra szuszpendáljuk $5 \cdot 10^4$ sejt/ml-re „vizsgáló” tápközegben [1xRPMI 1640 tápközegben L-glutamin nélkül (GIBCO)/1% L-glutamin/4% borjúembrió szérum]. A 100 μ l vizsgálati mintát vagy EPO standardot (rHuEPO), amelyet vizsgáló tápközegben ötszörösére hígítottunk, egy 96 üreges mikrotitráló

lemez üregeihez adjuk. 50 μ l szuszpendált sejtet adunk hozzá ezután (5000 sejt/üreg), és a lemezeket nedvesített inkubátorban inkubáljuk 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ jelenlétében. 72 óra múlva 1:100 arányban vizsgáló közeggel hígított 50 μ l metil-³H-timidin (1 mCi/ml; 20 Ci/mmol) oldatot adunk hozzá. A sejteket további 4 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten és 5% CO₂ jelenlétében. A jelölt sejteket üvegrost szűrőanyagra gyűjtjük, ionmentesített vízzel mossuk, szárítjuk és számoljuk. Az aktivitást úgy határozzuk meg, hogy összehasonlítjuk az egyes analógokhoz meghatározott választ az rHuEPO standard válaszaival. A fajlagos biológiai aktivitást azután úgy határozzuk meg, hogy elosztjuk az in vitro aktivitást az egyes analógok koncentrációival, ahogyan ez immunassayvel meghatározzuk [Elliott és munkatársai: Blood 87, 2714 (1996)]. Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. TÁBLÁZAT.

ANALÓG	N-kapcsolt szénhid- rát láncok száma	In vitro aktivitás
rHuEPO	3	+++
N49	4	+++
N50	4	+++
N51	5*	+++
N52	3 - 4	+++
N53	6	++
N54	4	NT
N55	4	+++
N56	4	+++
N57	3 - 4	+++
N58	4	+++
N59	5	++
N60	4 - 5	+++
N61	6 - 7	NT

* 1-2 O-kapcsolt láncot tartalmaz

** az in vitro aktivitás az rHuEPO aktivitására van vonatkoztatva

+++ az aktivitás egyenértékű az rHuEPO aktivitásával

++ az aktivitás 25-75%-a az rHuEPO aktivitásának

NT nem vizsgáltuk

2. PÉLDA

Rekombináns humán eritropoietin és hiperglikozilezett eritropoietin analógok előállítása

Az itt leírt kísérletekben alkalmazott rekombináns humán eritropoietint (rHuEPO) a humán eritropoietin gént hordozó rekombináns plazmával átfertőzött kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtekkel expresszáljuk. A rekombináns terméket a kondicionált tápközegből kinyerjük és tisztítjuk lényegében olyan módon, ahogyan ezt Lai és munkatársai leírták (az előzőekben idézett munka). A létrejövő rHuEPO készítmény zömmel 9-14 szialinsavas izomorf, ahogyan ezt izoelektromos fókuszálással megállapítjuk.

Rekombináns hiperglikozilezett eritropoietin analógokat expresszálunk EPO analóg géneket hordozó rekombináns plazmával átfertőzött CHO sejtekben, amint ez le van írva a WO 91/05867 és WO 94/09257 számú PCT közzétételi iratokban; ez a két irodalmi hely referenciaként beépül a jelen bejelentésbe. A hiperglikozilezett analógokat a tenyészet felülúszóból úgy tisztítjuk, ahogyan a továbbiakban leírjuk.

A kondicionált tápközeg koncentrációja és diaszűrése

Az átfertőzött CHO sejtvonal három egymást követő kinyeréséből (5-8 naponta) való kondicionált (szérummentes) tápközegeket gyűjtünk, átszűrjük 0,45 μm -os szűrőn, mintegy harmincadára sűrítjük, majd diaszűrjük 10 mmól/l triszt és 20 $\mu\text{mol/l}$ CuSO_4 -et tartalmazó oldatba (pH 7,0), tangenciális áramlású ultraszűrő rendszert (Millipore) alkalmazva 10000 molekulatömeg kizárású membránnal. A diaszűrt tápközeg [diafiltered medium (DFM)] másodszor is átszűrjük (0,45 μm) és -20°C hőmérsékleten tároljuk, amíg a tisztításhoz felhasználjuk.

Tisztítás

Az összes munkamenetet $2-8^\circ\text{C}$ hőmérsékleten hajtjuk végre.

Anioncserélő kromatográfia (10)

A derített DFM-et 10 mmól/l bisz-trisz propánnal (BTP) (pH 7,0) kiegyensúlyozott Q-Sepharose Fast Flow oszlopra (Pharmacia, 6 cmx18 cm) terheljük és két oszloptérfogat 10 mmól/l-es BTP-vel mossuk, hogy eluáljunk minden nem-kötő fajtát. Az alábbi gradienseket futtatjuk attól függően, hogy a hiperglikozilezett analógnak négy, öt vagy hat N-kapcsolt szénlánc van. Minden ebben a stádiumban használt puffer tartalmaz 1 mmól/l glicint, 20 μ m/l CuSO_4 -et, 6 mól/l karbamidot, 5 μ g/ml leupeptint és 1 μ g/ml pepsztatint. A négy N-kapcsolt szénhidrát láncos analógoknál a gradiens 10 mmól/l ecetsav és 0,1 mmól/l NaCl-től az 500 mmól/l ecetsav és 5 mmól/l NaCl-ig terjed 49 oszloptérfogattal, két oszloptérfogat tartással a nagy sótartalmú feltételeknél. Az öt N-kapcsolt szénhidrát láncos analógoknál a gradiens 0,7 mól ecetsav és 7 mmól/l NaCl-től az 1,0 mól/l ecetsav és 12 mmól/l NaCl-ig terjed 30 oszloptérfogattal, két oszloptérfogat tartással a nagy sótartalmú feltételeknél. A hat N-kapcsolt szénhidrát láncos analógoknál a gradiens 1,0 mól/l ecetsav és 10 mmól/l NaCl-től 1,5 mól/l ecetsav és 20 mmól/l NaCl-ig terjed 50 oszloptérfogattal, két oszloptérfogat tartással a nagy sótartalmú feltételeknél. A gradienst követően az oszlopot két oszloptérfogat 10 mmól/l BTP-vel (pH 7,0) mossuk és a magas izoform frakciókat 0,6 mól/liter NaCl-t és 100 mmól/l BTP-t tartalmazó oldattal (pH 7,0) eluáljuk.

Fordított fázisú kromatográfia (C4)

A nagy sótartalmú csíkot a Q-Sepharose oszlopról (1Q) ráterheljük a 20% etanollal és 10 mmól/l BTP-vel (pH 7,0) kiegyensúlyozott Vydac C4 fordított fázisú oszlopra (30 μ -os részecskék, 4 cmx18 cm), majd eluáljuk az oszlopról 30 oszloptérfogat gradienssel 10 mmól/l BTP-ben (pH 7,0) pufferolt 94% etanolig. Az összegyűlt termék csúcsokat, eluálva mintegy 60% etanolban, hígítjuk négy térfogat 10 mmól/l-es BTP-vel (pH 7,0), hogy minimális legyen az aggregálódás lehelősége etanol jelenlétében.

Anioncserélő kromatográfia (20)

A hígított eluátumot a fordított fázisú oszlopról ráterheljük egy második, 10 mmól/l BTP-vel (pH 7,0) kiegyensúlyozott Q-Sepharose Fast Flow oszlopra (Pharmacia, 3 cm x 9 cm). Az oszlopot a kiegyensúlyozó pufferral mossuk és a hiperglikozilezett EPO analógot eluáljuk 0,6 mól/l nátrium-kloridot és 20 mmól/l nátrium-citrátot (pH 6,0) tartalmazó oldattal.

A tisztított fehérjét átvisszük 20 mmól NaPO₄-et (pH 6,0) és 140 mmól/l NaCl-t tartalmazó oldatba Centricon berendezés alkalmazásával (10000 molekulatömeg kizárás), ezt követi az átjuttatás egy 0,2 µmólos szűrőn, majd a tárolás 2-8°C hőmérsékleten.

3. PÉLDA

rHuEPO és négy, öt vagy hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmazó rHuEPO analóg in vivo biológiai aktivitása

A négy, öt vagy hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmazó EPO analógok in vivo aktivitását összehasonlítjuk az rHuEPO biológiai aktivitásával az exhipoxiás, policitémiás egér biológiai vizsgálatban. Ez a vizsgálat mennyiségileg értékeli ⁵⁹Fe beépülését újonnan szintetizált vörösvérsejtekbe, amely beépülés mértéke az eritropoézis növekedésének egerekben valamely kívülről bevezetett vizsgálati mintára adott válaszként. Ez a vizsgálat, amint a későbbiekben bemutatjuk, Cotes és Bangham eljárásnak [Nature 191, 1065 (1961)] módosítása.

Ebben a vizsgálatban nőstény BDF₁ egereket először előkondicionálunk kis oxigéntartalmú feltételeknek kitévéssel egy kisnyomású kamrában (4.10⁴-5.10⁴ Pa) mintegy 18 órán át naponként 14 napon át. A kis oxigéntartalmú feltételek kompenzálására az egerek eritropoézis stimulálásával válaszolnak, hogy növekedjen a vörösvérsejtek száma és ezáltal a viszonylagos oxigén-hordozó kapacitás. A végső kisnyomású kitévés befejezése után az egereket normál nyomáson hagyjuk mintegy

72 órán át, mielőtt a vizsgálati minták beadása megtörténik intraperitoneális injekcióval. Normál nyomáson az egerek viszonylag policitémiások és az endogén eritropoietin termelésnek és az eritropoézis sebességének csökkenésével válaszolnak. Öt nappal a minta beadása után 0,2-0,3 μCi $^{59}\text{FeCl}$ -t injektálunk intravénásan a farokvénába. 48 óra múlva az állatokat leöljük és a növekedést vizsgálati mintákkal kialakított eritropoézisben meghatározzuk a beépített ^{59}Fe mennyiségének mérésével a teljes vér 0,5 ml-ében.

A kapott eredmények egyik példája, amikor rHuEPO-t és négy, öt vagy hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmazó öt különböző EPO analógot vizsgálunk ebben a vizsgálatban, ahogyan a 3. ábrában bemutatjuk. Minden mintát hat vagy hét különböző hígításban vizsgáljuk egy megfelelő koncentrációtartományon belül. Minden mintát foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldatban hígítunk, amely oldat tartalmaz továbbá 0,5% szarvasmarha szérum albumint is, és az egyes hígításokból 0,4-0,4 ml-t vezetünk be öt előkondicionált egérbe. Negyvennyolc órával az ^{59}Fe beadása után mérjük 0,5 ml vérbe beépített mennyiséget γ -számlálással. Az eredményeket az egyes mintákhoz függvényben ábrázoljuk mint a beépített ^{59}Fe százalékát a beadott dózis logaritmusaival szemben.

Amint a 3. ábrában bemutatjuk, mind az öt, ebben a vizsgálatban vizsgált hiperglikozilezett EPO analóg hatékonyabb, mint az rHuEPO. Ezen kívül az egyes analógok hatékonysága közvetlenül függ az N-kapcsolt szénhidrát láncok számától; azok az analógok, amelyek megnövekedett számú szénhidrát láncsal bírnak, nagyobb aktivitással rendelkeznek. Így az N53 analóg, amely hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmaz, a leghatékonyabb analóg. Az N47 analóg, amely öt N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmaz, viszont hatékonyabb, mint azok az analógok, amelyek négy N-kapcsolt láncot tartalmaznak. A négy N-kapcsolt

szénhidrát láncot tartalmazó három analóg (N4, N18 és N50) hatékonyságai mintegy egyformák egymással és nagyobbak, mint az rHuEPO hatékonysága.

Ebben a kísérletben az rHuEPO és a négy, öt vagy hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmazó analógok dózisa, amelyek 40% ^{59}Fe beépüléséhez szükségesek, 10700 ng; 600 ng illetve 38 ng. Az eritropoézis ezen szintjének kialakításához szükséges anyag mennyisége alapozva a négy, öt, vagy hat N-kapcsolt szénhidrát láncot tartalmazó EPO analóg 17-szer, 72-szer illetve 280-szor hatékonyabb, mint az rHuEPO.

4. PÉLDA

rHuEPO és N47 EPO analóg IV farmakokinetikája patkányokban és Beagle kutyákban.

Két külön kísérletet hajtottunk végre patkányokban és kutyákban, hogy összehasonlítsuk az N47 EPO analóg és az rHuEPO farmakokinetikai paramétereit.

Patkány tanulmányokban $1\ \mu\text{Ci}$ ($\sim 0,1\ \mu\text{g}$ peptid/kg) ^{125}I -EPO N47 analógot, vagy ^{125}I -rekombináns humán eritropoietint (Amersham) injektálunk intravénásan egy sebészeti beépített karotid kanülbe 314-363 g közötti testtömegű normál hím Sprague-Dawley patkányokba. Különböző időpontokban beadás után 0,3 ml vért gyűjtünk és szérumot készítünk centrifugálással. A ^{125}I -rHuEPO vagy ^{125}I -EPO N47 analóg szintjét ezután meghatározzuk minden szérum minta 0,1 ml-ében, ezt követi inkubálás 4°C hőmérsékleten egy éjszakán át 90% etanollal. Az etanollal kicsapott fehérjét minden szérum mintában centrifugálással összegyűjtjük és a radioaktivitást megszámláljuk gamma számlálóban. A létrejövő szérum koncentráció idővel szembeni függvényét jelentő farmakokinetikai görbét a 4. ábrában mutatjuk be. Minden pont öt patkány csoportátlagát képviseli az N47 analóg csoportban és hat patkány csoportátlagát jelenti

az rHuEPO csoportban. A farmakokinetikai paramétereket minden patkánynál meghatározzuk PCNONLIN 4.0 nem lineáris regressziós elemzéssel [Statistical Consultants (1992)], és az eredményeket minden csoportnál átlagoljuk. Az eredményeket a 4. táblázatban mutatjuk be.

4. TÁBLÁZAT

N47 és rHuEPO IV farmakokinetikai paramétereinek összehasonlítása patkányokban

Vizsgálati minta	Félélettartam		V_d (ml/kg)	Szérum ki- választás (ml/kg-óra)
	α (óra)	β (óra)		
N47 (n = 5 patkány)	$0,57 \pm 0,49$	$6,9 \pm 0,3$	33 ± 5	$4,8 \pm 1,2$
rHuEPO (n = 6 patkány)	$0,18 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,2$	36 ± 6	$17,7 \pm 3,4$

a Az eredményeket csoportátlag $\pm$ SD-ben adjuk meg öt patkánynál az N47 csoportban és hat patkánynál az rHuEPO csoportban.

A kutya tanulmányokban normál, 7,8-9,5 kg közti testtömegű Beagle kutyák $\sim 29 \mu\text{Ci}$ intravénás bólusz injekciót kapnak vagy ^{125}I -rHuEPO-ból, vagy ^{125}I -N47-ből ($\sim 0,1 \mu\text{g}$ peptid/kg) a fej vénába. 24 órán keresztül különböző időpontokban a beadástól számítva mintegy 1-2 ml vért gyűjtünk és szérumot készítünk. A ^{125}I -rHuEPO és a ^{125}I -N47 koncentrációját meghatározzuk és a farmakokinetikai paramétereket kiszámítjuk az előzőekben leírtak szerint. A szérum koncentráció idővel szembeni farmakokinetikai görbéit a kutya tanulmányokhoz az 5. példában mutatjuk be. Az időpontok két állat csoportátlagai mindegyik csoportban. A farmakokinetikai paramétereket az 5. táblázatban foglaljuk össze.

5. TÁBLÁZAT

N47 és rHuEPO IV farmakokinetikai paramétereinek összehasonlítása kutyákban

Vizsgálati minta	Félélettartam		V_d (ml/kg)	Szérum ki- választás (ml/kg-óra)
	α (óra)	β (óra)		
N47	0,34	25,0	55,9	2,4
rHuEPO	0,40	7,2	60,8	8,4

a A közölt eredmények csoportonként két kutya átlag paramétereit.

Mind a patkány, mind a kutya tanulmányokban az rHuEPO és az EPO N47 analóg kétfázisú szérum kiválasztást mutat. A kiválasztás patkányokban mintegy 3,7-szer gyorsabb rHuEPO-nál, mint az EPO N47 analógnál, és a β -félélettartam mintegy 2,8-szor hosszabb az EPO N47 analógnál, mint az rHuEPO-nál. A farmakokinetikai paraméterek a kutya tanulmányokban általában egybevágóak a patkányokban észlelt paraméterekkel. Kutyákban az rHuEPO kiválasztása 3,5-ször gyorsabb, mint az EPO 47 analógnál, és a β -félélettartam 3,5-ször hosszabb EPO N47 analógnál az rHuEPO-val összehasonlítva.

5. PÉLDA

Hematokrit értékek dóziszválasza rHuEPO és N47 EPO analóg beadása után

Hematokrit dózis válasz hetenként háromszori beadás után (TIW)

Az rHuEPO és N47 EPO analóg in vivo biológiai hatásait normál egerekben összehasonlítjuk egy dózistartomány beadása után vagy intraperitoneális vagy intravénás injekcióval hetenként háromszor maximum hat héten át. A hematokrit értékek meghatározását hetenként kétszer végezzük el hátsó szemüregi vérvétellel.

Mintegy 30 g tömegű normál CD1 egereket (10-13 egeret csoportonként) injektálunk intraperitoneálisan hetenként háromszor összesen hat héten át vagy rHuEPO-val (0,625-10 μ g peptid/kg/dózis dózistartomány mentén), vagy N47 EPO analóggal (0,156-1,25 μ g peptid/kg/dózis dózistartomány mentén), vagy hordozó kontrollal. A hordozó kontroll és hígító a különböző rHuEPO és N47 EPO analóg adagolási készítményekhez a foszfáttal pufferolt fiziológiás konyhasóoldat (PBS), amely tartalmaz még 0,025% egér szérum albumint. Az összes egér hematokrit értékét meghatározzuk az alapvonalnál és hetenként kétszer ez után hátsó arcüregi véreztetéssel. A kísérletek végén minden állatból szérumot gyűjtünk és megvizsgáljuk antitestekre az injektált termékek ellen egy oldatos radioimmunkicsapásos vizsgálattal. Az állatokból kapott hematokrit érték adatokat, amelyeket negatívnak ítélnék meg antitestek semlegesítéséhez, felhasználjuk az ezt követő elemzéshez.

Amint a 6. ábrában bemutatjuk, mind az rHuEPO, mind az N47 EPO analóg dózisfüggő növekedést alakít ki a hematokrit értékben a hat hetes tanulmányban, bár az N47 analóg nagyobb növekedést idéz elő a hematokrit értékben összehasonlítva az rHuEPO-val egy adott koncentrációnál. Ebben a kísérletben az N47 EPO analóg mintegy 3-4-szer hatékonyabb, amikor hetenként háromszor adagoljuk intraperitoneális injekcióval.

Az rHuEPO és N47 analóg dózisválasz tanulmányait hetenként háromszori intravénás injekcióval hajtjuk végre olyan munkameneteket alkalmazva, amelyek hasonlóak az intraperitoneális beadásnál végrehajtott munkamenetekhez. A kapott eredmények hasonlóak az intraperitoneális beadásnál kapott eredményekhez, és a tanulmányok továbbá igazolják, hogy az N47 EPO analógoknak nagyobb a hatékonyságuk, mint az rHuEPO-é, amikor hetenként háromszor vezetjük be.

Abból a célból, hogy jobban összehasonlíthassuk és mennyiségileg értékelhessük az rHuEPO és N47 EPO analóg biológiai aktivitását a normál egerek hematokrit értékeinek növelésében, a kísérletek eredményeit elemezzük relatív hatékonysági görbékkel. Az egyes kísérletekhez az rHuEPO vagy N47 analóg aktivitását minden adagnál meghatározzuk a hematokrit értékekben való növekedést összegezve a tanulmány első 38 napja mentén trapezoid összegzéssel, hogy megkapjuk a területet a görbe alatt [area under the curve (AUC)]. Ezt azután függvényben ábrázoljuk a log dózissal szemben μg peptid/kg/hétben. A hatékonysági különbségeket a vegyületek között a beadás vagy adagolási gyakoriságok azonos vagy különböző útjaival bevezetve a releváns log-dózis válasz vonalaik közti távolság mérésével határozhatjuk meg. A 7. ábra foglalja össze a relatív hatékonysági adatokat az összes végrehajtott kísérlethez, összehasonlítva a két különböző úton (intraperitoneális és intravénás) és két különböző adagolási menetrenddel bevezetett rHuEPO és N47 EPO analóg aktivitását.

Amint a 7. ábrában bemutatjuk, amikor hetenként háromszor vezetünk be, az N47 EPO analógnak azonos hatékonysága van, akár intravénásan, akár intraperitoneális úton adjuk be, és 3,6-szor hatékonyabb, mint az rHuEPO intraperitoneálisan injektálva hetenként háromszor.

Hematokrit dóziszválasz tanulmányok hetenként egyszeri beadással (OW)

Elvégezzük az rHuEPO és N47 EPO analóg összehasonlításait növekvő hematokrit értékeknél normál egerekben hetenként egyszeri beadásnál a beadásnak vagy intraperitoneális, vagy intravénás útján hat héten át.

Mintegy 30 g testtömegű normál CD1 egereket (csoportonként 8-10 egér) injektálunk intravénásan hetenként egyszer összesen hat héten át

rHuEPO vagy N47 EPO analóg változó koncentrációival, amelyeket 0,025% egér szérumot is tartalmazó PBS-ben készítünk el, vagy hordozó kontrollal (PBS 0,025% egér szérum albuminnal). Az analóg dózisa 6,25-25 μg peptid/kg/dózis között változik és az rHuEPO dózisa 25-200 μg /kg/adag között változik. Az összes egér hematokrit értékét meghatározzuk az alapvonalnál, majd ezután hetenként kétszer hátsó szemüregi vérmintából. A kísérlet végén szérumot gyűjtünk az összes állatból és megvizsgáljuk antitestekre az injektált termék ellen folyadékos radioimmun kicsapással. Az állatokból nyert adatokat, amelyeket negatívnak ítélnék meg semlegesítő antitestekhez, alkalmazzuk a további elemzéshez.

Amint a 8. ábrában bemutatjuk, miközben mind az rHuEPO, mind az N47 analóg növeli a hematokrit értéket normál egerekben, amikor hetenként egyszer adagoljuk, az rHuEPO-nak egy válasz kialakításához szükséges adagja jelentősen nagyobb, mint az N47 analóg ehhez szükséges adagja. Így például ebben a kísérletben 25 μg peptid/kg/hét N47 41,2 ponttal növeli egerek hematokrit értékét hat hét alatt, míg rHuEPO azonos dózisa csak 12,5 pont hematokrit érték növekedést idéz elő.

rHuEPO és N47 analóg dózisválasz tanulmányait hajtjuk végre hetenként egyszeri intraperitoneális injekcióval olyan munkameneteket alkalmazva, amelyek hasonlóak az előzőekben leírt munkamenetekhez. A kapott eredmények egybevágóak az intravénás beadásnál kapott eredményekkel, továbbá igazolják az N47 analóg nagyobb hatékonyságát az rHuEPO-val összehasonlítva, amikor hetenként egyszer adjuk be.

Abból a célból, hogy mennyiségileg is értékeljük a különbséget az rHuEPO és N47 analóg között, amikor mindegyiket hetenként egyszer adjuk be, relatív hatékonysági függvényeket alakítunk ki az összes releváns kísérletből, ahogyan az előzőekben leírtuk. Amint a 7. ábrában bemutatjuk, amikor hetenként egyszer adjuk be, az N47 analóg azonos

hatékonysággal bír intravénás és intraperitoneális úton injektálva. Az N47 analóg mintegy 14-szer hatékonyabb, mint az rHuEPO, amikor mindegyiket hetenként egyszer vezetjük be.

Ezen kívül a log-dózis válasz görbék a 6. ábrában az alábbiakat illusztrálják: (1) hetenként egyszer (QW) bevezetett N47 analóg egy adott dózisa mintegy olyan hatékony, mint az rHuEPO teljes hetenkénti dózisa három osztott dózisként (TIW); (2) hetenként egyszer bevezetett (QW) rHuEPO egy adott dózisa csak mintegy 2%-nyi hatékonyságú, mint az N47 analóg ugyanolyan teljes heti dózisa három osztott dózisként beadva (TIW); (3) az N47 analóg mintegy négyszer olyan hatékony egerekben, amikor TIW formában vezetjük be a QW formához viszonyítva.

Hematokrit dózis válasz tanulmányok minden második héten egyszer (EOW) történő beadásnál

Kísérleteket hajtunk végre, hogy felbecsüljük az N47 analógnak azt a képességét, hogy növeli az egerek hematokrit értékét, amikor minden második héten egyszer injektáljuk ezeket. Normál CD1 egereket (10 egér csoportonként) injektálunk intravénásan vagy hetenként egyszer, vagy minden második héten egyszer összesen mintegy hat héten keresztül N47 EPO analóg változó koncentrációival 0,025% egér szérumban albumint tartalmazó PBS-ben. Az N47 analógok 200; 100; vagy 25 $\mu\text{g/kg}$ /adagját adjuk be minden második héten, vagy 12,5 $\mu\text{g/kg}$ /adagot adunk be minden héten egyszer. A hematokrit értékeket az összes egernél meghatározzuk az alapvonalnál és ezután hetenként kétszer hátsó szemüregi vérvétellel.

Amint a 9. ábrában bemutatjuk, az N47 analóg növelheti a normál egerek hematokrit értékét dóziszfüggő módon még akkor is, ha csak két-hetenként egyszer adjuk be. Amint ez várható, amikor kevésbé gyakran adjuk be, nagyobb mennyiségű N47 analóg szükséges a hematokrit érték növeléséhez. Minden második héten egyszer beadott N47 analóg

200 $\mu\text{g/kg}$ -os adagja a hematokrit értéket mintegy azonos mértékben növeli hat hét alatt, mint a 12,5 $\mu\text{g/kg}$ teszi, amikor hetenként egyszer adagoljuk.

6. PÉLDA

N47 EPO analóg és rHuEPO IV farmakokinetikája folyamatos ambuláns peritoneális dialízises [Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD)] betegekben

Annak a határozott növekedésnek alapján, amely az N47 EP analóg félélettartamában mutatkozik szérumban az rHuEPO-hoz viszonyítva patkányokban és Beagle kutyákban, érdemes meghatározni, vajon a növekedés megfigyelhető-e emberekben is.

Véghez viszünk egy kettős vak, randomizált, keresztezetten tervezett tanulmányt tizenegy stabil CAPD-s betegen (7 férfi, 4 nő, 27-75 év között). Egy betegcsoport 100 egység/testtömeg/kg rHuEPO-t kap (amely egyenértékű 0,5 μg peptid/testtömeg kg-mal), míg egy másik csoport betegei 0,5 μg /testtömeg kg N47 EPO analógot kapnak, minden esetben egyedi intravénás bólusz injekcióként bevezetve. Vénás vérmintákat (3 ml) vonunk ki egy jelen levő kanülön keresztül az adagolás előtt, majd 5; 10; 15; 30 perccel és 1; 2; 5; 8; 12; 16; 24; 30; 36; 48; 60; 72; és 96 órával az intravénás bólusz injekció után. 28 napos kimosási időtartam után az első betegcsoport N47 EPO analóg egyedi intravénás dózisát kapja, míg a második csoport rHuEPO egyedi intravénás dózisát kapja. Vérmintákat veszünk ugyanúgy, mint a kezelés első ciklusában. Az rHuEPO és N47 EPO analóg szintjeit a szérumban meghatározzuk ELISA-val, miután kivontuk az endogén alapvonal EPO szinteket. A keresztezett tervezési hatásokhoz való beállítás után becsült farmakokinetikai paramétereket ($\pm\text{SD}$) a 6. táblázatban mutatjuk be. Az AUC szérum koncentrációt a lineáris trapezoid összegzés alkalmazásá-

val számítjuk ki. A $t_{1/2z}$ -t úgy határozzuk meg, mint $\log(2)/K_z$ -t, ahol K_z -t úgy számítjuk ki, mint az $\ln(\text{szérum koncentráció})$ időgörbe terminális részének deriváltját. A kiválasztást (Cl) úgy határozzuk meg, mint dózis/AUC-t. Az eloszlás térfogatát (V_d) úgy határozzuk meg, mint Cl/K -t.

6. TÁBLÁZAT.

Dózis- csoport	AUC (ng.óra/ml)	$t_{1/2z}$ (óra)	Kiválasztás (ml/óra/kg)	V_d (ml/kg)
N47	291,0 $\pm$ 7,6	25,3 $\pm$ 2,2	1,6 $\pm$ 0,3	52,4 $\pm$ 2,0
rHuEPO	131,9 $\pm$ 8,3	8,5 $\pm$ 2,4	4,0 $\pm$ 0,3	48,7 $\pm$ 2,1

Az N47 EPO analóghoz tartozó átlagos szérum félélettartam (25,3 óra) háromszor hosszabb, mint az rHuEPO-é (8,5 óra), és a kiválasztás 2,5-ször gyorsabb az rHuEPO-nál, mint az N47 analógnál.

7. PÉLDA

N47 EPO analóg II. fázisú dózis-meghatározási és dózis ütemezési tanulmánya

Többközpontos, randomizált, sorozatos dózis-fokozó tanulmányokat indítunk be, hogy megvizsgáljuk az optimális dózist és optimális ütemezést N47 analóghoz, amikor szubkután vagy intravénás injekcióval vezetjük be dialízist befogadó CRF betegekbe.

Az adagolási ütemezés a következő:

Hetenként egyszeri adag: 0,075; 0,225; 0,45; 0,75; 1,5; és 4,5 μg peptid/testtömeg kg/dózis.

Hetenként háromszori adag: 0,025; 0,075; 0,15; 0,25; 0,5; és 1,5 μg peptid/testtömeg kg/dózis.

A tanulmányokat két részben hajtjuk végre: az első rész egy dózis-növelő tanulmány, amelyet úgy tervezünk, hogy értékelje az N47 analóg dózist egyszer hetenként vagy háromszor hetenként beadva, amely a hemoglobint optimális sebességnél növeli négy héten keresztül (ez na-

gyobb, vagy egyenlő 10 g/liternél, de kevesebb, mint 30 g/liter). Az egyes tanulmányok második része úgy van megtervezve, hogy meghatározza a kívánt dózist (amikor hetenként egyszer vagy háromszor vezetjük be a beadás intravénás vagy szubkután útján), hogy fenntartsa a hematokrit értéket a terápiás cél értékén.

Az előzetes eredmények azt jelzik, hogy a hetenként egyszeri dózis az N47 analóggal alkalmazható a vérszegény CRT betegek hematokrit értékének mind növelésére, mind fenntartására. A kiindulási eredmények azt sugallják, hogy az előnyös dózisok a terápia beindításához háromszor hetenkénti adagolási ütemezésnél 0,15 és 0,25 μg peptid/testtömeg kg/adag között vannak, és hetenként egyszeri adagolási ütemezésnél 0,45 és 0,75 μg peptid/kg/dózis között vannak a beadás mindkét útjánál.

Bár a találmányt úgy írjuk le, hogy elsősorban az szerepeljen benne, amelyet előnyös kiviteli formájának vagy módjának tekintünk, ez nem korlátozódik a mellékelt kiviteli formákra vagy módokra, hanem ellenkezőleg: az a szándékunk, hogy ez lefedje a különböző módosulatokat és ekvivalenseket, amelyek a mellékelt igénypontok szellemén és oltalmi körén belül vannak, ahol az oltalmi kör a legszélesebben van értelmezve, hogy körülöleljen minden ilyen módosulatot és ekvivalenst.

SZEKVENCIALISTA

38330

<119> Eerie C. Joan
Elliott G. Steven
Browne R. Jeffrey

<120> Eljárás és kompozíció vérszegénység kezelésére és megelőzésére

<130> A-460

<140> 09/178,292

<141> 1998-10-23

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 193

<212> PPT

<213> humán

<220>

<221> SZIGNÁL

<222> (11), (27)

<223> szignál szekvencia, az 1-27 gyök

<400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

-45-

38330

<210> 2
<211> 29
<212> DNS
<213> humán

<400> 2
atctagaagt tgcctctctgg acagttcct

29

<210> 3
<211> 32
<212> DNS
<213> humán

<400> 3
gaagcttgcg ccaccatggg ggtgcacgaa tg

32

<210> 4
<211> 27
<212> DNS
<213> humán

<400> 4
gattctctcg agttgctctc tggacag

27

<210> 5
<211> 25
<212> DNS
<213> humán

<400> 5
caacaagcct ggcccgccat ggggg

25

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Humán eritropoietin analóg, amely tartalmaz még legalább egy további glikozilező helyet a humán eritropoietinnek az 1. sz. szekvencián feltüntetett 1-165 csoportjai közül az 52.; 53.; 55.; 86.; és 114. helyek bármelyikénél, ahol egy N-kapcsolt szénhidrát lánc van hozzáadva a nevezett helyhez.

2. Az 1. igénypont szerinti analóg, amely legalább két további glikozilező helyet tartalmaz, ahol a helyek mindegyikéhez egy-egy szénhidrát lánc van rögzítve.

3. Az 1. igénypont szerinti analóg, amely legalább három további glikozilező helyet tartalmaz, ahol a helyek mindegyikéhez egy-egy szénhidrát lánc van rögzítve.

4. Az 1. igénypont szerinti analóg, amely legalább négy további glikozilező helyet tartalmaz, ahol a helyek mindegyikéhez egy-egy szénhidrát lánc van rögzítve.

5. Az 1. igénypont szerinti analóg, amelyet az alábbiak közül választunk:

Asn⁵² Thr⁵⁴ EPO;

Asn⁵³ Thr⁵⁵ EPO;

Asn¹¹⁴ Thr¹¹⁶ EPO;

Asn³⁰ Thr³² Asn⁵³ Thr⁵⁵ Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO;

Asn⁵⁵ Thr⁵⁷ EPO;

Asn⁸⁶ Val⁸⁷ Thr⁸⁸ EPO;

Asn³⁰ Thr³² Asn⁵³ Thr⁵⁵ EPO;

Asn³⁰ Thr³² Asn¹¹⁴ Thr¹¹⁶ EPO; vagy

Asn³⁰ Thr³² Asn⁵³ Thr⁵⁵ Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ Asn¹¹⁴ Thr¹¹⁶ EPO.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti analóg, amely egy exogén DNS szekvencia expressziójának terméke.

7. DNS szekvencia, amely valamely, az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti analógot kódol.

8. Eukarióta gazdasejt, amely valamely 7. igénypont szerinti DNS szekvenciával van átfertőzve olyan módon, amely lehetővé teszi a gazdasejt számára, hogy expresszálja az analógot.

9. Kompozíció, amely valamely 1-5. igénypont szerinti analóg gyógyászatilag hatékony mennyiségét tartalmazza valamely gyógyászatilag elfogadható hígítóval, adjuvánssal vagy hordozóval együtt.

10. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti analóg terápiásan hatásos mennyiségének alkalmazása emlősök hematokrit értékének növelésére és fenntartására szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

11. A 10. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy az analóg mennyiségét hetenként egyszer, minden második héten egyszer vagy minden hónapban egyszer adjuk be.

12. A 11. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a bevezetett analóg mennyisége mintegy 0,025 és 1,5 µg eritropoietin peptid/testtömeg kg/dózis hetenként háromszor.



13. A 12. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a bevezetett analóg mennyisége kevesebb, mint mintegy 0,025 μg eritropoietin peptid/testtömeg kg/dózis hetenként háromszor.

14. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az emlős csökkent vagy megszűnt vesefunkcióval járó anémiában szenved.

15. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az emlős mieloszuppresszív terápiával járó anémiában szenved

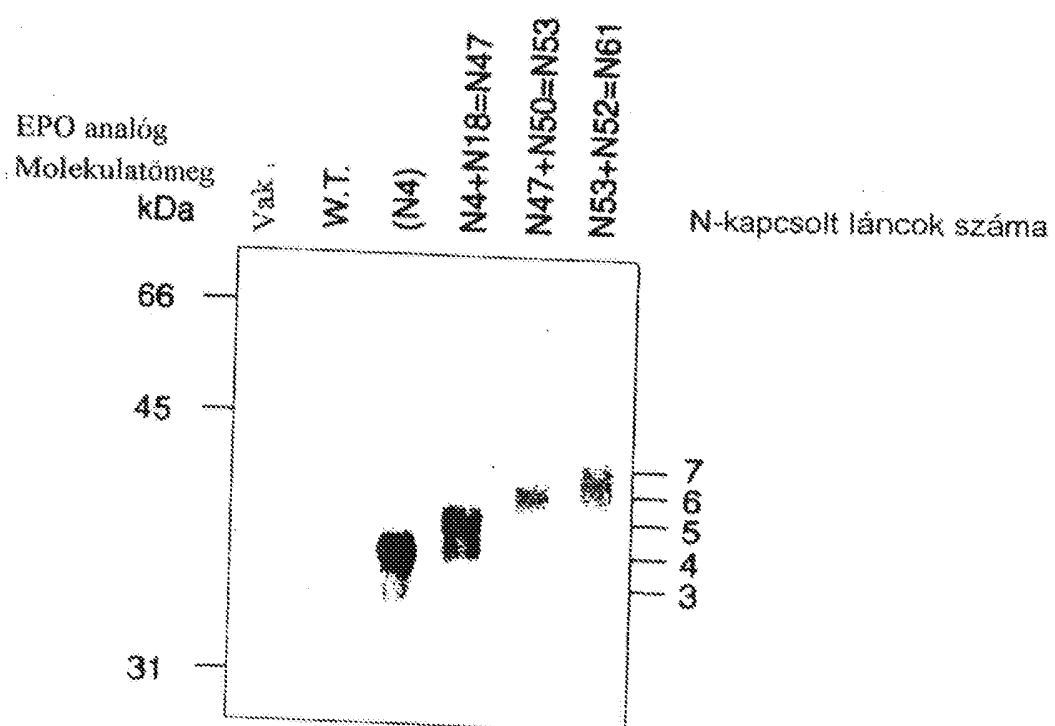
16. A 10. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a célszervezetben legalább 30 %-os értékre növeljük vagy ezen a szinten tartjuk.

17. Eljárás humán eritropoietin analóg előállítására, amelynek során egy a 8. igénypont szerinti gazdasejtet tenyésztünk az analóg expresz-szióját lehetővé tévő körülmények között, majd az analógot kinyerjük.

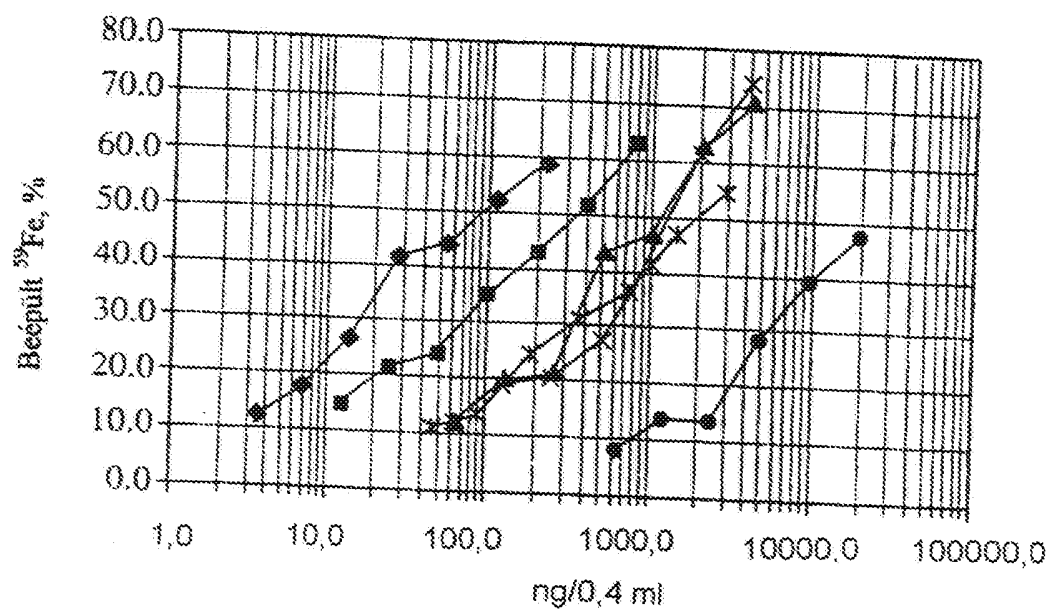
A meghatalmazott:

Dr. Szentpéteri Ádám
Szabadalmi Ügyvivő
SOGK Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113
Telefon: +36 1 460 5300 / 461 4293
Email: szentpeteri@sogk.hu

2. ÁBRA

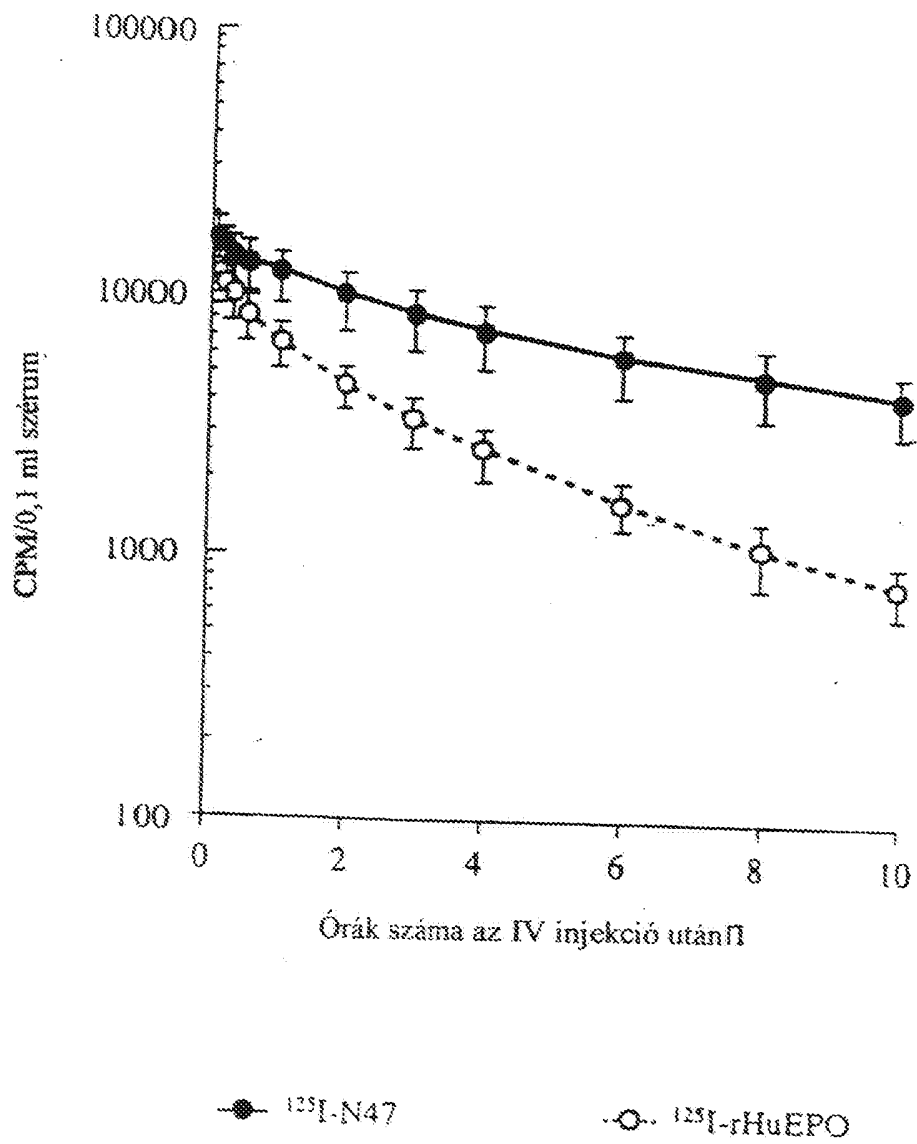


3. ÁBRA

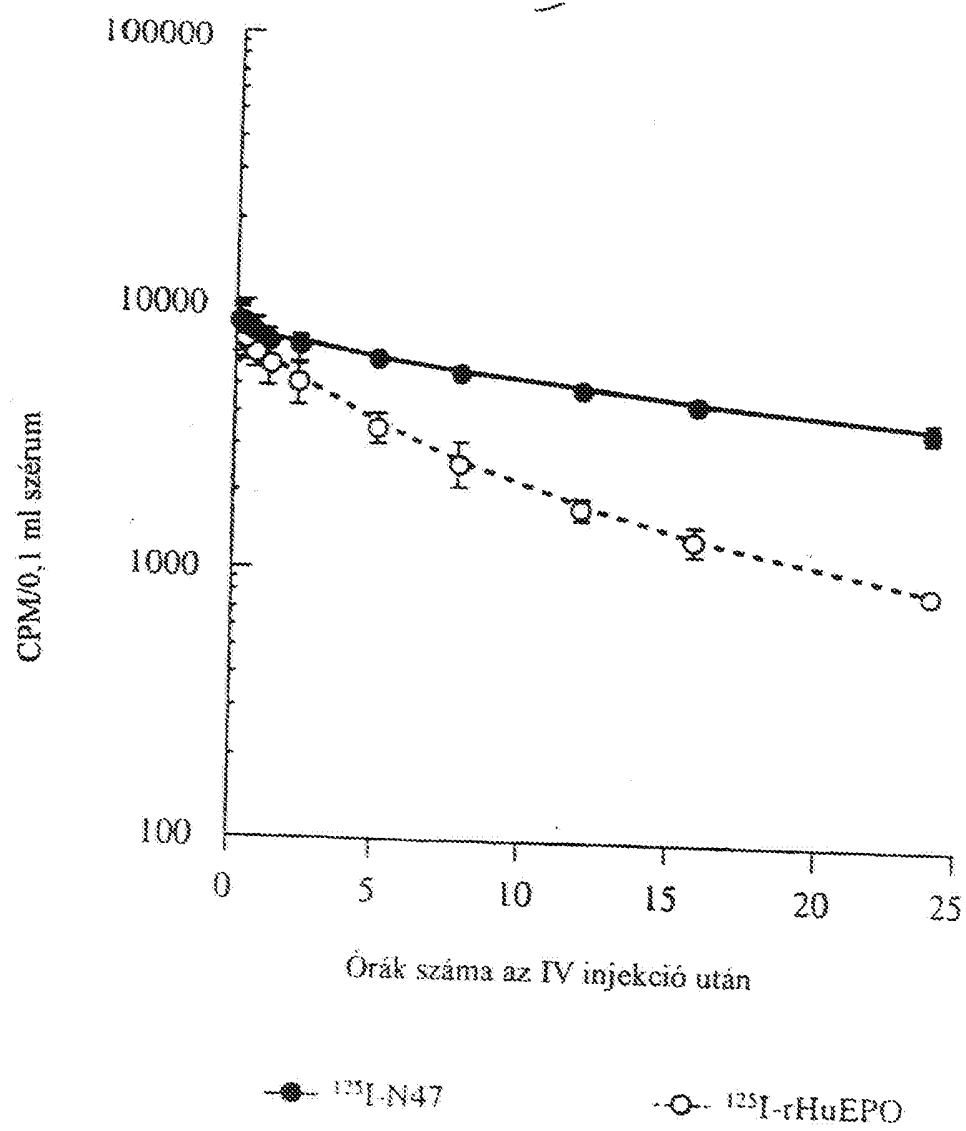


- ◆ N53
- ▲ N4
- ✕ N18
- rHuEPO
- N47
- ✱ N50

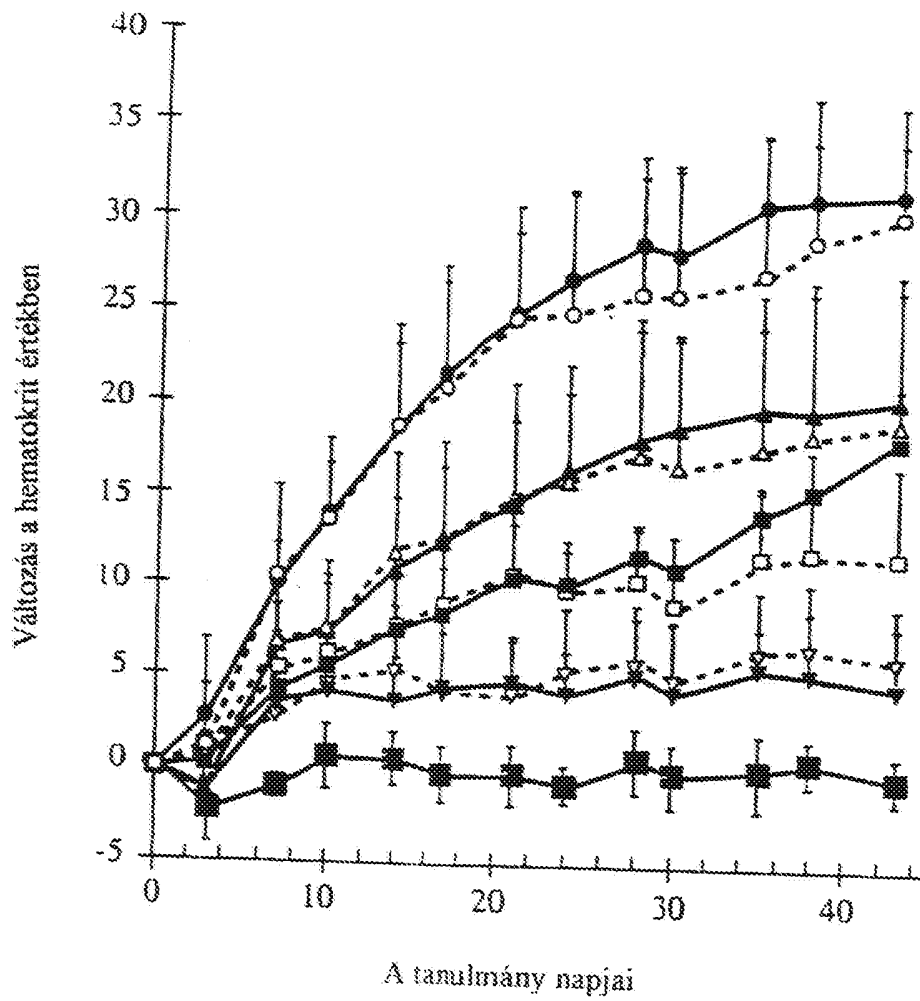
4. ÁBRA



5. ÁBRA

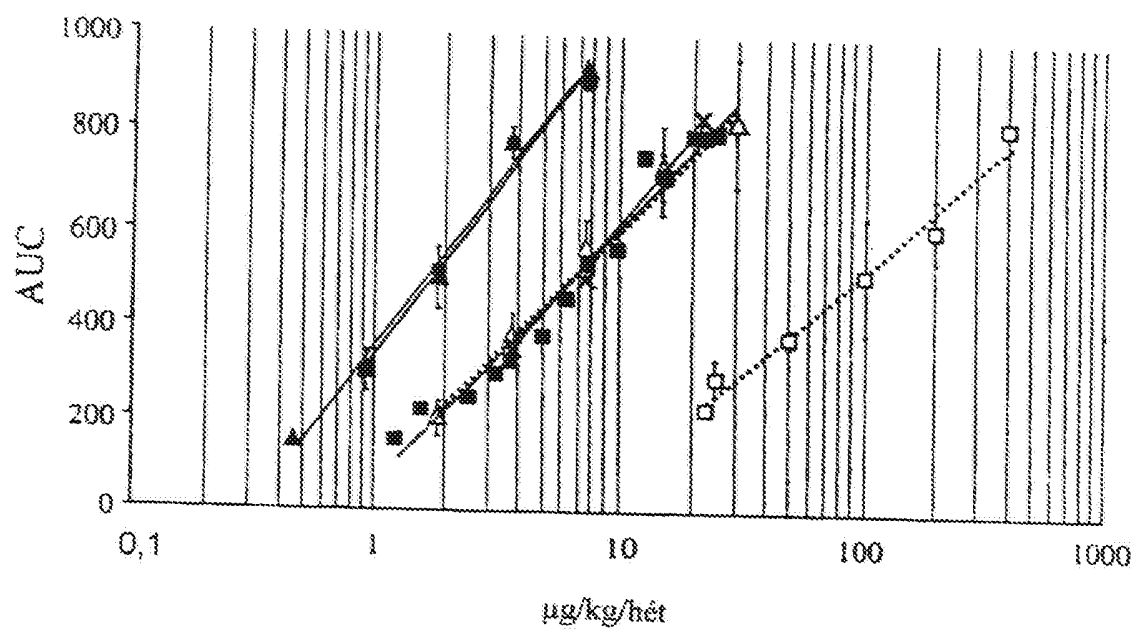


6. ÁBRA



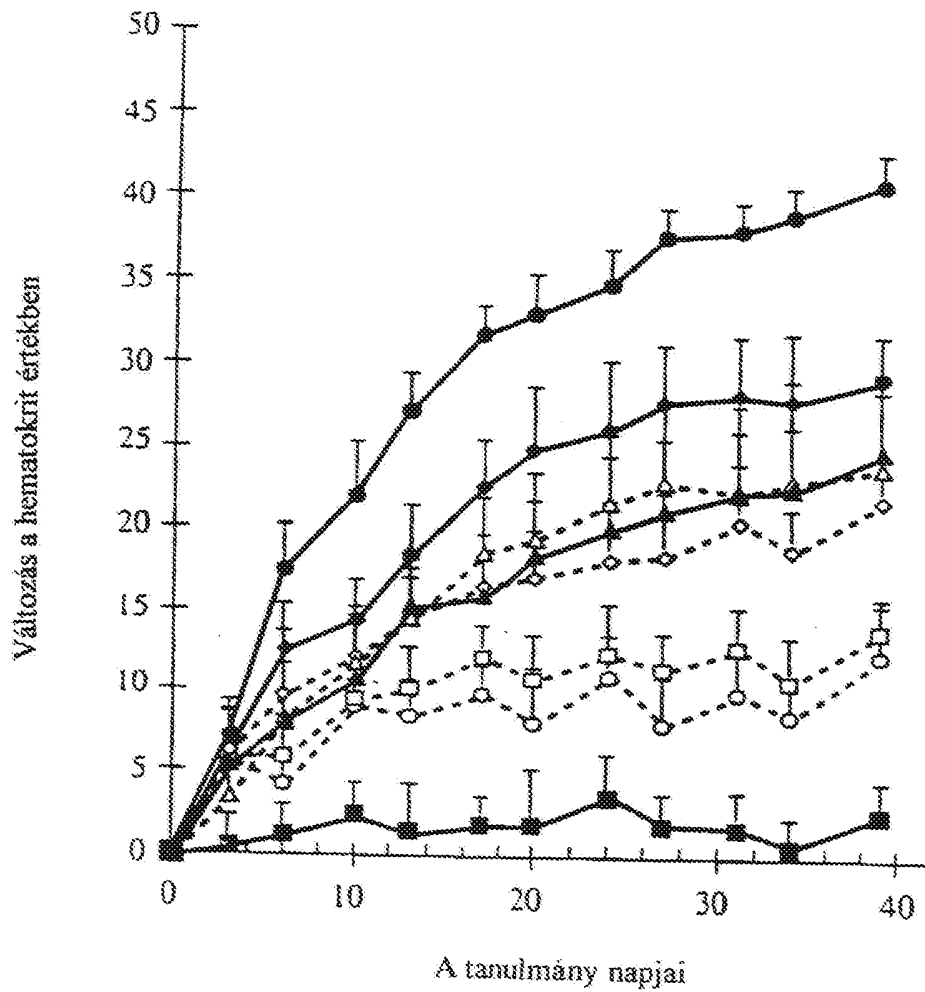
- N47 1,25 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- ▲ N47 0,625 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- N47 0,313 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- ▼ N47 0,156 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- hordozó (IV-TIW)
- rHuEPO 10 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- △ rHuEPO 2,5 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- rHuEPO 1,25 ug/kg/dózis (IP-TIW)
- ▽ rHuEPO 0,625 ug/kg/dózis (IP-TIW)

7. ÁBRA



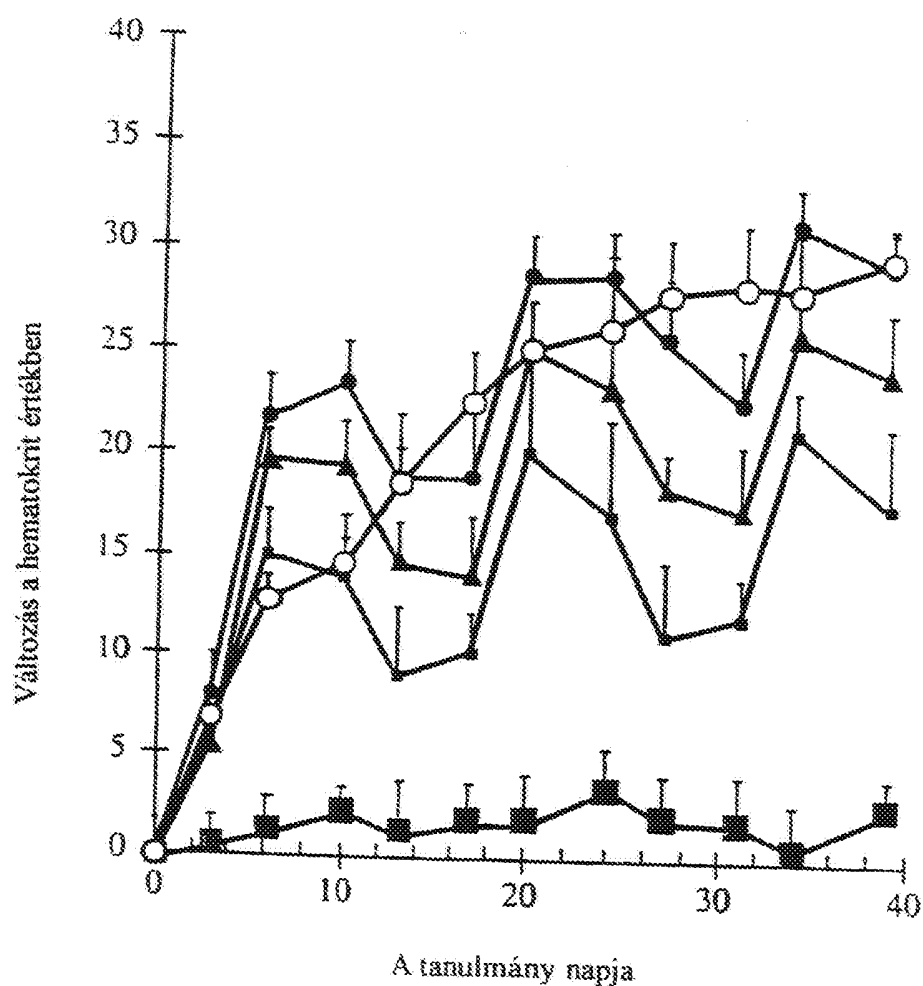
- N47 (IV TIW)
- ▲ N47 (IP TIW)
- N47 (IV QW)
- ✱ N47 (IP QW)
- △ rHuEPO (IP TIW)
- rHuEPO (IV QW)

8. ÁBRA



- N47 25 µg/kg/dózis(IV-QW)
- ◆ N47 12,5 µg/kg/dózis (IV-QW)
- ▲ N47 6,25 µg/kg/dózis (IV-QW)
- hordozó (IV-QW)
- △ rHuEPO 200 µg/kg/dózis(IV-QW)
- ◇ rHuEPO 100 µg/kg/dózis(IV-QW)
- rHuEPO 50 µg/kg/dózis(IV-QW)
- rHuEPO 25 µg/kg/dózis(IV-QW)

9. ÁBRA



- N47 200 µg/kg/dózis (IV-EOW)
- ▲ N47 100 µg/kg/dózis (IV-EOW)
- N47 25 µg/kg/dózis (IV-EOW)
- N47 12,5 µg/kg/dózis (IV-QW)
- hordozó