



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **338435**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20055852	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.05.12 PCT/US2004/14889
(22)	Inng.dag	2005.12.09	(85)	Videreføringsdag	2005.12.09
(24)	Løpedag	2004.05.12	(30)	Prioritet	2003.05.12, US, 60/469,993 2003.05.12, US, 60/470,244
(41)	Alm.tilgj	2006.02.13			
(45)	Meddelt	2016.08.15			
(73)	Innehaver	Affymax Inc, 4001 Miranda Avenue, US-CA94304 PALO ALTO, USA Christopher P Holmes, 13633 Westover Drive, US-CA95070 SARATOGA, USA Kevin Yin, 747 Coastland Drive, US-CA94303 PALO ALTO, USA Guy Lalonde, 20007 Skyline Drive, US-CA94062 WOODSIDE, USA Peter J Schatz, 10949 Sycamore Drive, US-CA95014 CUPERTINO, USA David Tumelty, 250 Santa Fe Terrace #106, US-CA94085 SUNNYVALE, USA Palani Balu, 21856 Dolores Avenue, US-CA95014 CUPERTINO, USA Gemete H Zemede, 100 Kiley Blvd. #106, US-CA95051 SANTA CLARA, USA Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig				
(54)	Benevnelse	Nye peptider som binder til erythropoietinreseptoren			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0138342 A WO 0191780 A Wrighton NC. ET AL. Increased potency of an erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization. Nat Biotechnol. 1997, vol. 15, no. 12, side 1261-1265. Johnson DL. ET AL. Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity. Chem Biol. 1997, vol. 12, side 939-350. Johnson DL. ET AL. Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. Biochemistry. 1998, vol. 37, no. 11, side 3699-3710. Lee JW. AND Fuchs PL. Reduction of azides to primary amines in substrates bearing labile ester functionality. Synthesis of a PEG-solubilized, "Y"-shaped iminodiacetic acid reagent for preparation of folate-tethered drugs. Org Lett. 1999, vol. 1, no. 2, side 179-181.			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører peptidforbindelser som er agonister til erythropoietinreseptoren (EPO-R). Oppfinnelsen vedrører også terapeutiske fremgangsmåter som anvender slike peptidforbindelser for å behandle forstyrrelser assosiert med utilstrekkelig eller defekt rød blodcelleproduksjon. Farmasøytiske sammensetninger som omfatter peptidforbindelsene i oppfinnelsen blir også tilveiebrakt.

Felt for oppfinnelsen

- Den foreliggende oppfinnelsen vedrører peptidforbindelser som er agonister til erythropoietin reseptoren (EPO-R). Oppfinnelsen vedrører også terapeutiske fremgangsmåter ved å anvende slike peptidforbindelser for å behandle forstyrrelser assosiert med utilstrekkelig eller defekt blodcelleproduksjon. Farmasøytiske sammensetninger som omfatter peptidforbindelsene i oppfinnelsen bli også tilveiebrakt.

Bakgrunn for oppfinnelsen

- Erythropoietin (EPO) er et glykoproteinhormon med 165 aminosyrer, med en molekylvekt på ca. 34 kilodalton (kD) og foretrukne glykosyleringssteder ved aminosyreposisjonene 24, 38, 83 og 126. Den blir initielt produsert som et forløperprotein med et signalpeptid på 23 aminosyrer. EPO kan finnes i tre former: α , β og asialo. α - og β -formene skiller seg lett i deres karbohydratkomponenter, men har den samme potensen, biologiske aktivitet og molekylvekten. Asialoformen er en α - eller β -form hvor det terminale karbohydratet (sialinsyre) er fjernet. DNA-sekvensene som koder for EPO er blitt rapportert (US patentskrift nr. 4 703 008 til Lin).

- EPO stimulerer mitotisk deling og differensiering av erytrocytt forløperceller, og sikrer dermed produksjonen av erytrocytter. Den blir produsert i nyrene når hypoksiske betingelser råder. I løpet av EPO-indusert differensiering av erytrocyttforløperceller, så blir globinsyntese indusert; hem komplekssyntese blir stimulert; og antall ferritinreseptorer øker. Disse forandringer tillater cellen å ta opp mer jern og syntetisere funksjonelt hemoglobin, som i modne erytrocytter binder oksygen. Erytrocytter og deres hemoglobin spiller dermed en nøkkelrolle i å levere oksygen til kroppen. Disse forandringer initieres av interaksjonen mellom EPO og en passende reseptor på celleoverflaten av erytrocytt forløpercellene (se for eksempel Graber og Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29.51-66).

- EPO er tilstede i veldige lave konsentrasjoner i plasma når kroppen er i en frisk tilstand hvor vev mottar tilstrekkelig oksygen fra det eksisterende antall erytrocytter. Denne normale lave konsentrasjon er tilstrekkelig for å stimulere erstatning av røde blodceller som tapes normalt gjennom aldring.

- Mengden EPO i sirkulasjonen økes under betingelser som hypoksi når oksygentransport av blodceller i sirkulasjonen reduseres. Hypoksi kan forårsakes for eksempel av vesentlig blodtap gjennom blødning, ødeleggelse av røde blodceller ved

overeksponering for stråling, reduksjon i oksygeninntak som skyldes høyde eller forlenget ubevisthet, eller forskjellige former anemi. Som respons på slik hypoksisk stress, så øker forhøyede EPO-nivåer rød blodcelleproduksjon ved å stimulere prolifereringen av erytrocyttpregenitorceller. Når antallet røde blodceller i sirkulasjon er større enn det som er nødvendig for normal vevoksygenkrav, så blir EPO-nivåene i sirkulasjonen senket.

Fordi EPO er essensiell i prosessen ved dannelsen av røde blodceller, så har dette hormonet potensielt nyttig anvendelse i både diagnose og behandlingen av blodsykdommer som er karakterisert ved lav eller defekt rød blodcelleproduksjon. Nylige studier har tilveiebrakt en basis for projeksjonen av EPO-terapi som er effektiv for en rekke sykdomstilstander, forstyrrelser og tilstander av hematologisk irregularitet, inkludert: β -talassemi (se Vedovato, et al. (1984) Acta. Haematol. 71:211-213); cystisk fibrose (se Vichinsky, et al. (1984) J. Pediatric 105:15-21); graviditet og menstruasjonsforstyrrelser (se Cotes et al. (1993) Brit. J. Obstet. Gynaecol. 90:304-311); tidlig anemi ved prematuritet (se Haga, et al. (1983) Acta Paediatr. Scand. 72; 827-831); ryggmargsskade (se Claus-Walker, et al. (1984) Arch. Phys. Med. Rehabil. 65:380-374); romfart (se Dunn, et al. (1984) Eur. J. Appl. Physiol. 52:178-182); akutt blodtap (se Miller, et al. (1982) Brit. J. Haematol. 52:545-590); aldring (se Udupa, et al. (1984) J. Lab. Clin. Med 103:574-580 og 581-588 og Lipschitz, et al. (1983) Blood 63:502-509); forskjellige neoplastiske sykdomstilstander akkompagnert av unormalt erythropoiese (se Dainiak, et al. (1983) Cancer 5:1101-1106 og Schwartz, et al. (1983) Otolaryngol. 109:269-272); og nyreutilstrekkelighet (se Eschbach. Et al. (1987) N. Eng. J. Med. 316:73-78).

Renset, homogent EPO er blitt karakterisert (US patentskrift nr. 4 677 195 til Hewick). En DNA-sekvens som koder for EPO ble renset, klonet og uttrykt til å produsere rekombinante polypeptider med de samme biokjemiske og immunologiske egenskapene og naturlig EPO. Et rekombinant EPO-molekyl med oligosakkarid identisk til de på naturlig EPO er også blitt produsert (se Sasaki, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:12059-12076).

Den biologiske effekten av EPO synes å være styrt delvis gjennom interaksjon med en cellemembranbundet reseptor. Initielle studier som anvender umodne erytroide celler isolert fra musemilt, antydte at EPO-bindende celleoverflateproteiner omfatter to polypeptider som har ca. molekylvekter på henholdsvis 85 000 dalton og 100 000 dalton

- (Sawyer, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3690-3694). Antallet EPO-bindingssteder blir beregnet til gjennomsnitt for 800 til 1 000 celler per overflate. Av disse bindingssetene så bandt ca. 300 EPO med en K_d på ca. 90 pM (pikomolar), mens resten bant EPO med en redusert affinitet på ca. 570 pM (Sawyer, et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:5554-5562).
- 5 En uavhengig studie antydte at EPO-responsive milterytroblaster laget fra mus injisert med den anemiske stammen (FVA) til Friend leukemivirus innehar totalt ca. 400 høy og et lavt affinitetsbindingssete med K_d -verdier på henholdsvis ca. 100 pM og 800 pM (Landschulz, et al. (1989) Blood 73:1476-1486).
- 10 Senere arbeid indikerte at de to formene med EPO-reseptor (EPO-R) var kodet for av et enkelt gen. Dette genet er blitt klonet (se for eksempel Jones, et al. (1990) Blood 76, 31-35; Noguchi, et al. (1991) Blood 78:2548-2556; Maouche, et al. (1991) Blood 78:2557-2563). For eksempel så er DNA-sekvenser og kodede peptidsekvenser for muse- og humane EPO-R-proteiner beskrevet i PCT publikasjonsnr. WO 90/08822 til
- 15 D'Andrea, et al. Nåværende modeller tyder på at binding av EPO til EPO-R resulterer i dimeriseringen og aktiveringen av to EPO-R-molekyler, som resulterer i etterfølgende trinn med signaltransduksjon (se for eksempel Watowich, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2140-2144).
- 20 Tilgjengeligheten til klonede gener for EPO-R faciliterer søket for agonister og antagonist av denne viktige reseptor. Tilgjengeligheten av det rekombinante reseptorprotein tillater studien av reseptorligandinteraksjon i en rekke tilfeldige og semitilfeldige peptid-diversiterings genereringssystemer. Disse systemer inkluderer "peptid på plasmid" systemet (beskrevet i US patentnr. 6 270 170); "peptid på fag"-
- 25 systemet (beskrevet i US patentnr. 5 432 018 og Cwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-6382); "det kodede syntetiske bibliotek" (ESL)-systemet (beskrevet i US patentsøknad serienr. 946 239, arkivert 16. september 1992); og "det veldig stor-skala immobiliserte polymer syntese"-systemet (beskrevet i US patentnr. 5 143 854; PCT publikasjonsnr. 90/15070; Fodor, et al. (1991) Science 251:767-773; Dower og
- 30 Fodor (1991) Ann. Rep. Med. Chem. 26:271-180; og US patentskrift nr. 5 424 186).
- Videre beskriver Wrighton NC. ET AL. Increased potency of an erythropoietin peptide mimetic through covalent dimerization. Nat Biotechnol. 1997, vol. 15, no. 12, side 1261-1265; Johnson DL. ET AL. Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity. Chem Biol. 1997, vol. 12,
- 35 side 939-350; Johnson DL. ET AL. Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of

erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. Biochemistry. 1998, vol. 37, no. 11, side 3699-3710; and Lee JW. AND Fuchs PL. Reduction of azides to primary amines in substrates bearing labile ester functionality. Synthesis of a PEG-solubilized, "Y"-shaped iminodiacetic acid reagent for preparation
 5 of folate-tethered drugs. Org Lett. 1999, vol. 1, no. 2, side 179-181 kjent teknikk.

Peptider som interagerer i minst noen grad med EPO-R er blitt identifisert og er beskrevet for eksempel i US patent nr. 5 773 569, 5 803 851 og 5 986 047 til Wrighton et al.; PCT publikasjonsnr. WO 96/40749 til Wrighton et al., US patentnr. 5 767 078 og
 10 PCT publikasjonsnr. 96/40772 til Johnson og Zivin; PCT publikasjonsnr. WO 01/38342 til Balu; og WO 01/91780 til Smith-Swintosky et al. Spesielt så har en gruppe peptider som inneholder et peptidmotiv blitt identifisert, medlemmer av denne binder seg til EPO-R og stimulerer EPO-avhengig celleprolifisering. Enda så stimulerer peptider som er identifisert opp til nå som inneholder motivet EPO-avhengig celleprolifisering *in*
 15 *vitro* med EC50-verdier å ca. 20 nanomolar (nM) til ca. 250 nM. Dermed så kreves peptidkonsentrasjoner på 20 nM til 250 nM for å stimulere 50% av den maksimale celleprolifisering som er stimulert ved EPO.

Gitt dette veldige potensialet av EPO-R-agonister, både for studier av de viktige
 20 biologiske aktiviteter som styres av denne reseptor og for behandling av sykdom, så gjenstår det et behov for identifikasjonen av peptid-EPO-R-agonister for økt potens og aktivitet. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer slike forbindelser.

25 **Oppsummering av oppfinnelsen**

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye peptidforbindelser som er EPO-R-agonister av mer dramatisk øket potens og aktivitet. Disse peptidforbindelser er homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1), eller homodimerer av
 30 peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2), homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (Sekv. Id. nr. 3), hvor hver aminosyre er indikert ved standard en-bokstavs forkortelse ("AcG") er N-acetylglysin, "(1-nal)" er 1-naftylalanin, og "(MeG)" er N-metylglysin, også kjent som
 35 sarkosin. Hver peptidmonomer av en peptiddimer inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom cysteinresidiene til monomeren.

Peptidmonomeren kan være dimerisert ved kovalent festing av en forgrenet, tertiær amidlinker. Den tertiære amidlinkeren kan avtegnes som:



hvor:

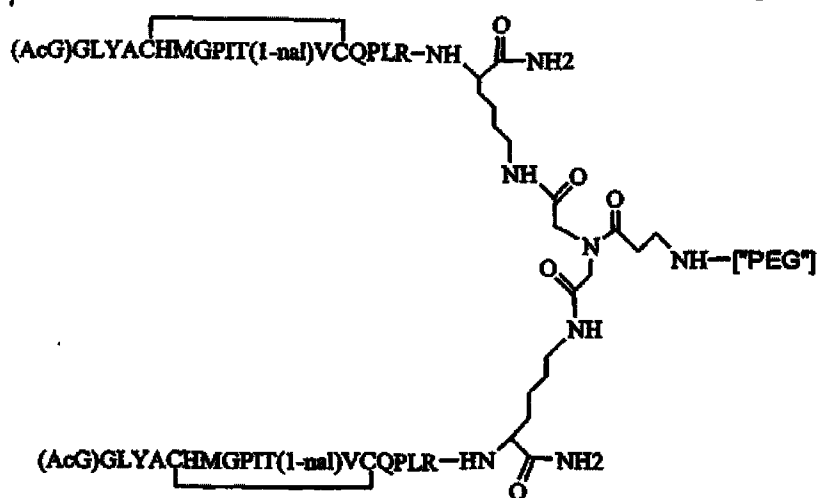
X er $NCO-(CH_2)_2-N^1H-$;

C^1 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet i den første peptidmonomeren;

C^2 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet til den andre peptidmonomeren; og

N^1 i X er festet via en karbamatkobling eller en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG) enhet, hvor PEG har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 dalton (uttrykket "ca" indikerer at de preparater med PEG så vil noen molekyler veier mer og noen mindre enn den konstaterte molekylvekten).

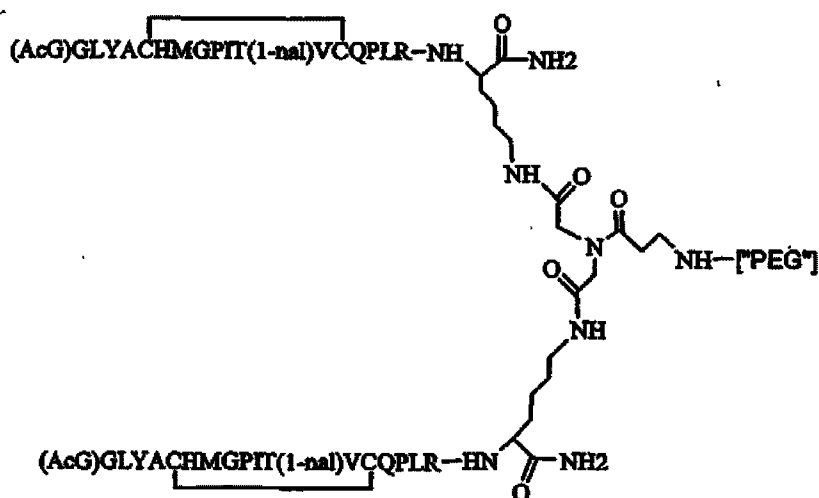
Foreliggende oppfinnelse angår en forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), der forbindelsen omfatter en peptiddimer som har formelen:



25 hvor

- (i) i hver peptidmonomer i peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortning, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intermolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene i hver monomer
- (iii) [”PEG”] omfatter minst en lineær polyetylenglykol (PEG)-enhet, hver PEG-enhet har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

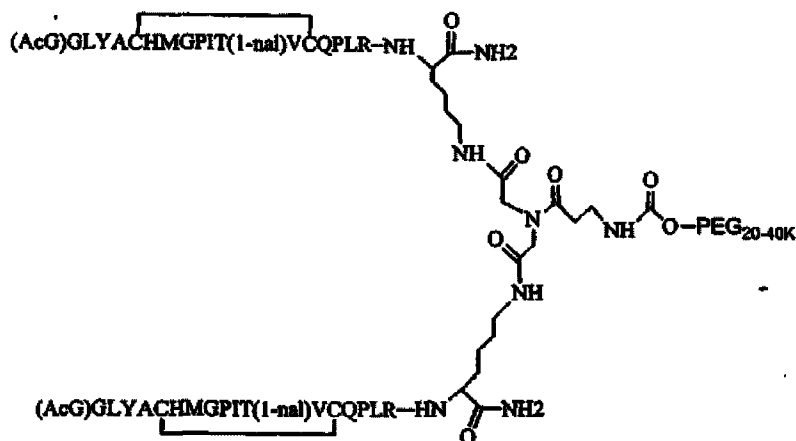
Foreliggende oppfinnelse angår videre en forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), der forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:



hvor

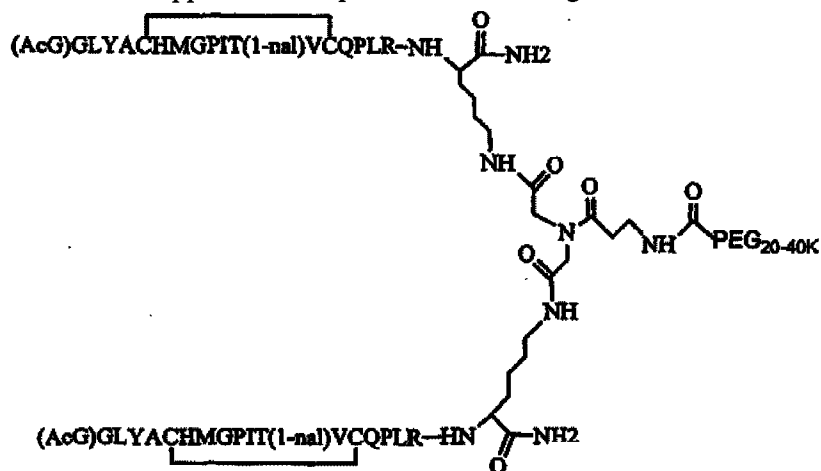
- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin;
- 20
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer

- (iii) ["PEG"] omfatter minst to lineære polyetylenglykol (PEG)-enheter koblet ved et enkelt punkts festing og som har en kombinert molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 60 000 daltons.
- 5 Hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR (Sekv. Id. nr. 1) og N¹ i linkerene er festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG) enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



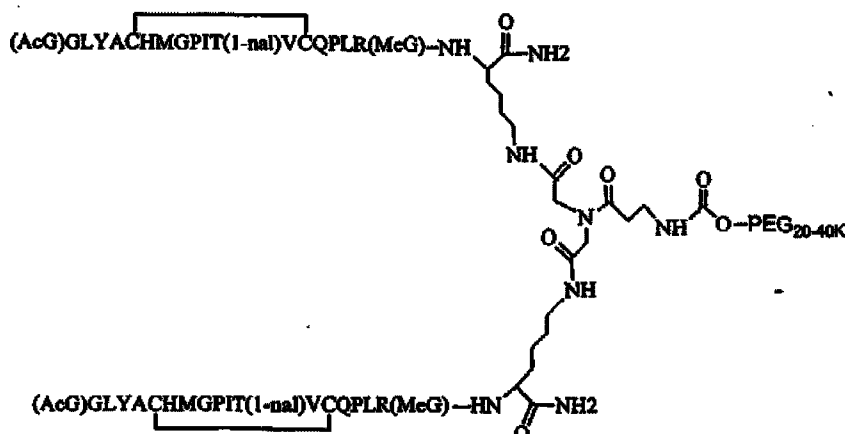
10

- Hvor hver monomer av homodimer har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR (Sekv. Id. nr. 1) og N¹ i linkerene er festet via en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG) enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



15

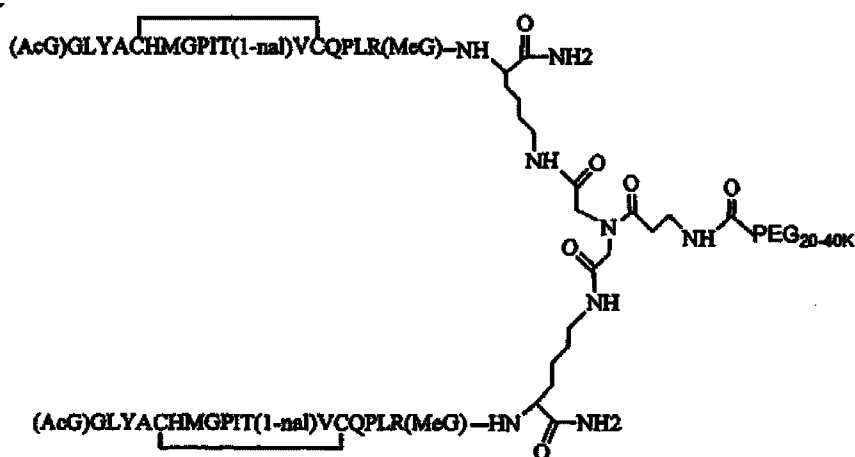
Hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og N¹ i linkeren er festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



5

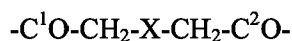
Hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og N¹ i linkeren er festet via en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

10



Peptidmonomerene kan også dimeriseres ved kolvalent festing til en forgrenet tertiær amidlinker. Den tertiære amidlinkeren kan skrives som:

15



hvor

X er $\text{NCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}^3\text{O}-$;

5

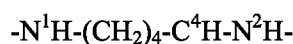
C^1 til linkerens danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen i det C-terminale lysinresidiet av den første peptidmonomeren; og

10

C^2 i linkerens danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen av det C-terminale lysinresidiet i den andre peptidmonomeren.

Peptiddimeren i oppfinnelsen omfatter videre en spacerenhet med den følgende strukturen:

15



hvor

20

C^4 i spaceren er kovalent bundet til C^3 i X;

N^1 i spaceren er kovalent festet via en karbamat- eller amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet; og

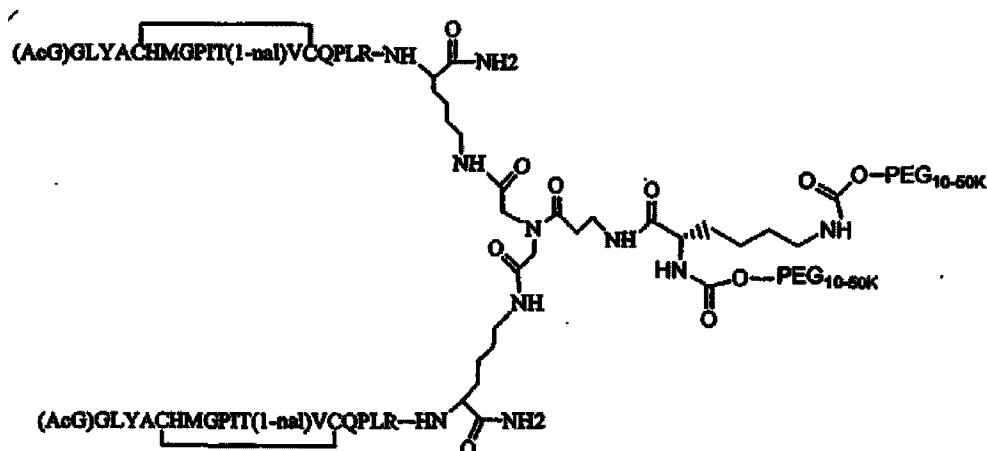
25

N^2 til spaceren er kovalent festet via en karbamat- eller en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, hvor PEG har en molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 50 000 dalton (uttrykket "ca" indikerer at i preparasjoner med PEG så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den konstaterte molekylvekten). Hver PEG-enhet kan individuelt være 10 000 daltons (10 kD), 20 kD, 30 kD, 40 kD eller 50 kD.

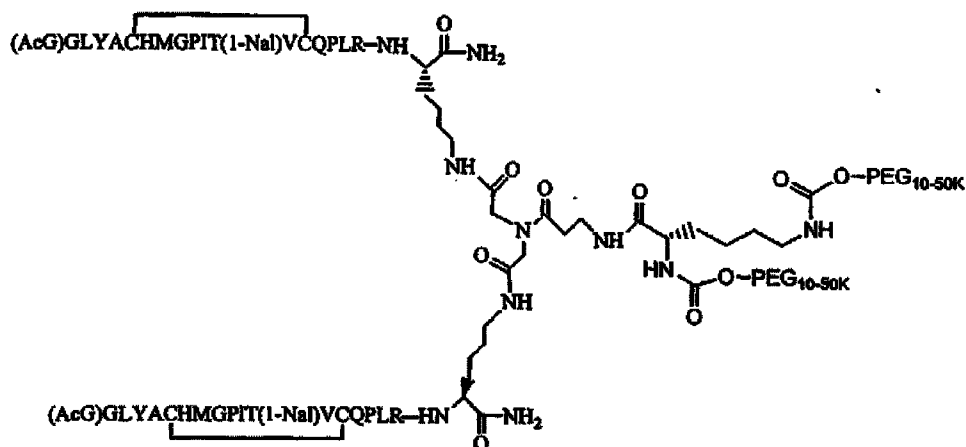
30

Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og både N^1 og N^2 i spaceren er kovalent festet via en karbamatkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

35



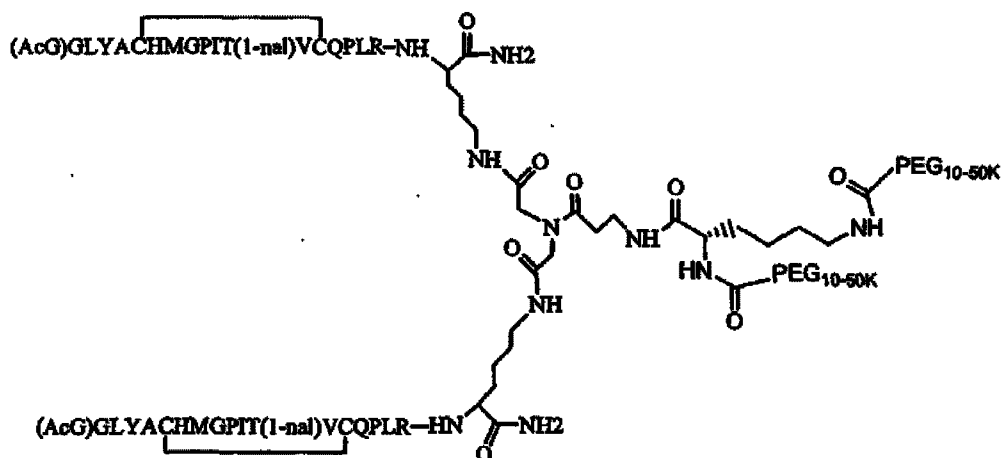
- I foretrukne utførelsesformer så er det C-terminale lysinet i de to peptidmonomerene L-lysine. Fagpersoner vil forstå fra de ovenfor beskrevne kjemiske strukturer at de to lineære PEG-enhetene også er koblet med lysin (for eksempel som mPEG₂-Lys-NHS eller som mPEG₂-Lysinol-NPC), som også er helst L-lysine og gir opphav til den andre stereokjemien.



- Alternativt så kan en eller flere av lysinresidene være et D-lysine, som gir opphav til alternative stereokjemier som lett vil forstås av fagfolk.

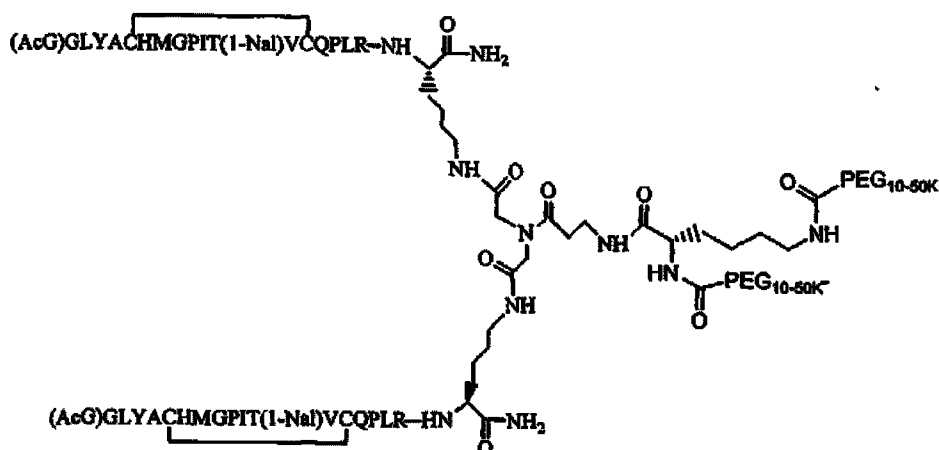
- Der hvor hver monomer i homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-Nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og både N¹ og N² i spaceren er kovalent festet via en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

11



Lysinmolekylene i denne forbindelse er igjen helst alle L-lysin, og gir opphav til den følgende stereokjemien.

5



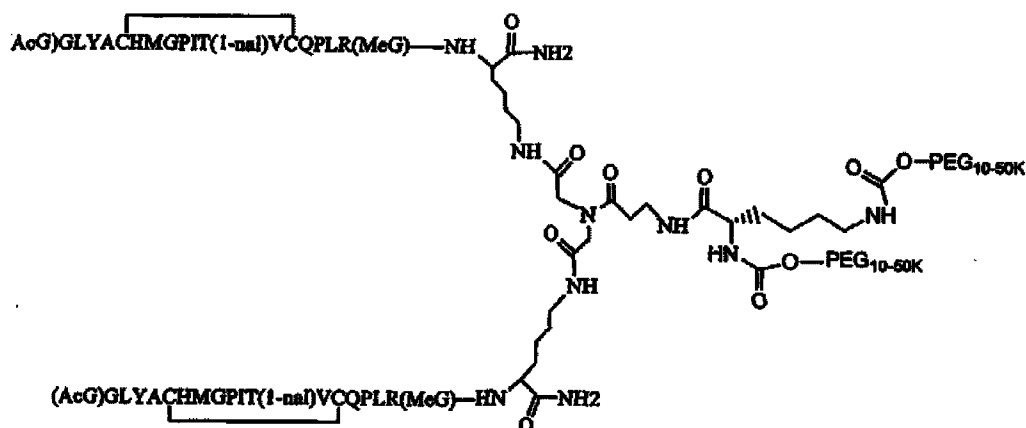
Alternativt så kan et eller flere av lysinresidiene være et D-lysin og gi opphav til alternative stereokjemier som vil lett forstås av fagfolk.

10

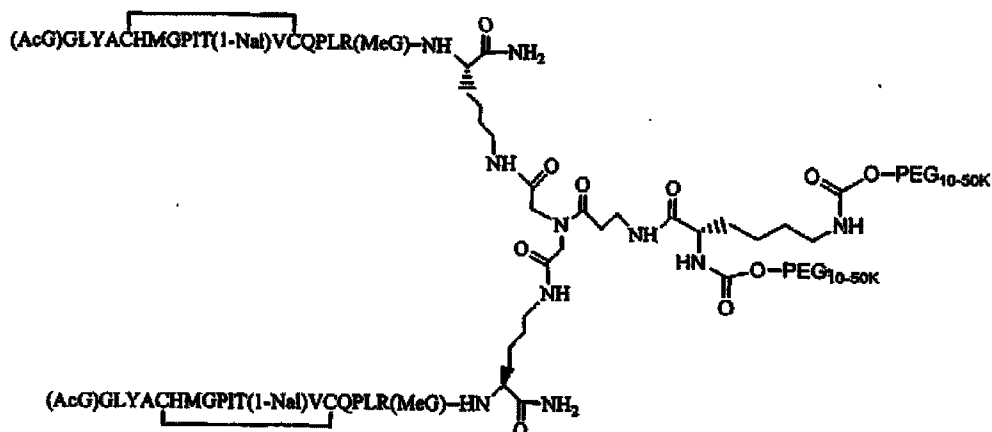
Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og både N¹ og N² i spaceren er kovalent festet via en karbamatkobling til en aktivert PEG-enhet, og Y er en karbamatgruppe, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

15

12



Helst så er lysinresidiene som kobler peptidmonomeren og de lineære PEG-enhetene i dette molekyl alle L-lysin og gir opphav til den følgende stereokjemien:

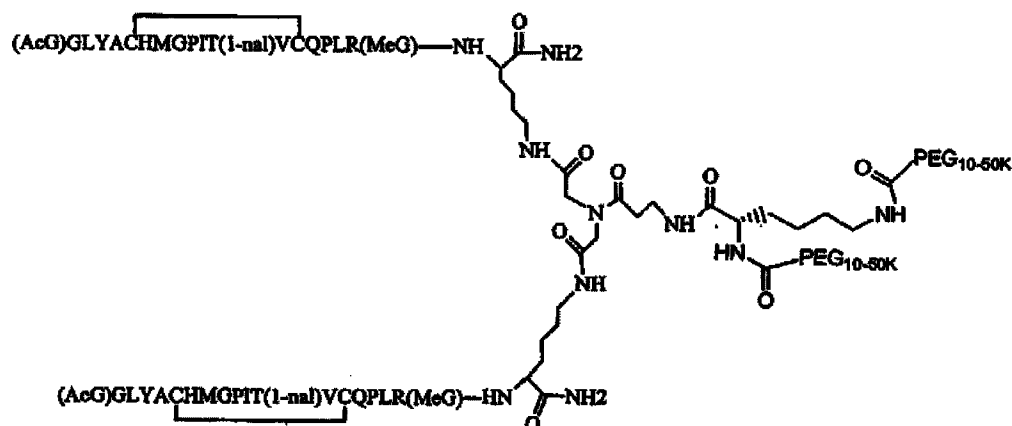


5

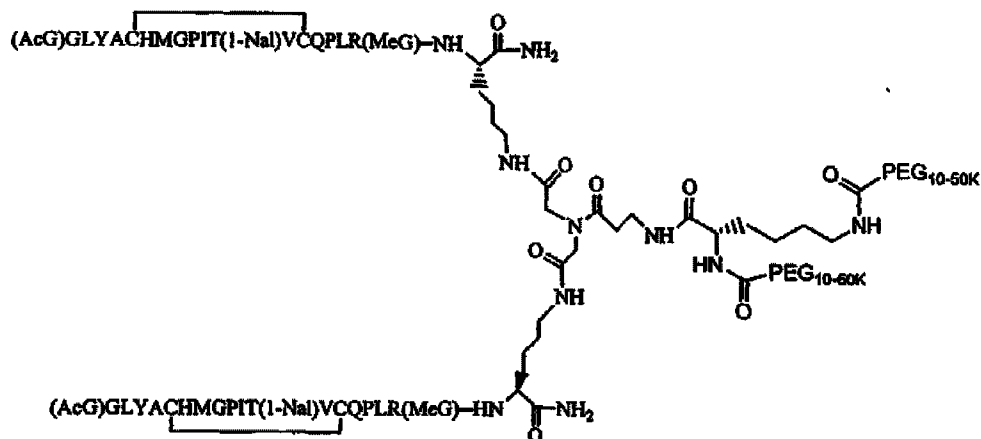
Alternativt så kan en eller flere av lysinresidiene være en D-lysin, som gir opphav til to alternative stereokjemier som lett vil forstås av fagfolk.

- 10 Der hvor hver monomer i homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og både N¹ og N² i spaceren er kovalent festet via en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

13



Helst så er lysinresidiene som kobler peptidmonomerer og lineære PEG-enheter i dette molekyl alle L-lysin og gir opphav til den følgende stereokjemien.



5

I andre utførelsesformer så kan et eller flere av lysinresidiene være et D-lysin som gir opphav til alternative stereokjemier som lett vil forstås av fagfolk.

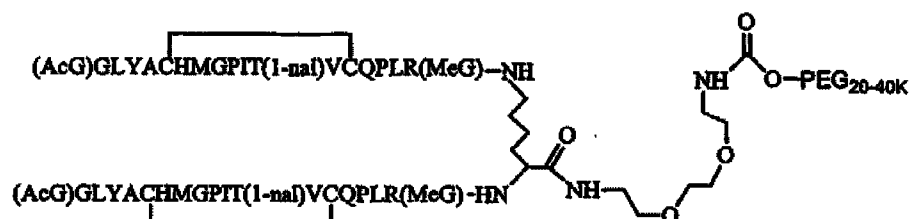
- 10 Peptidmonomeren kan også dimeriseres ved festing til en lysinlinker, hvor en peptidmonomer blir festet ved sin C-terminale ende til lysinets ϵ -gruppe og den andre peptidmonomeren er festet ved sin C-terminale ende til lysinets α -aminogruppe.

- Peptiddimeren i oppfinnelsen omfatter videre en spacerenhet med den følgende
15 strukturen:

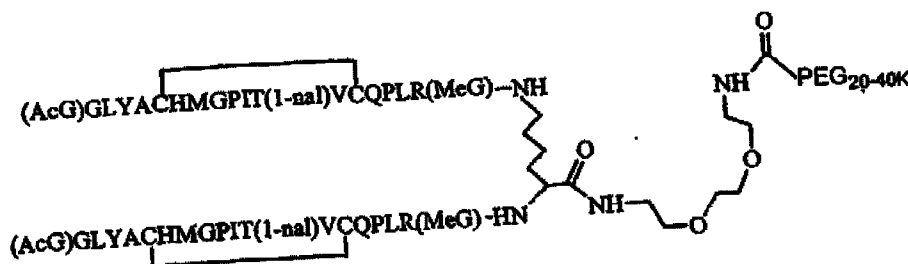


Ved den ene enden så er N¹ i spaceren festet via en amidkobling til et karbonylkarbon i lysinlinkeren. I den motsatte enden så er N² i spaceren festet via en karbamatkobling eller en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet hvor PEG har en
 5 molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons (uttrykket "ca" indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den konstaterte molekylvekten).

Der hvor spaceren er festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



Der hvor spaceren er festet via en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



Oppfinnelsen tilveiebringer videre farmasøytiske sammensetninger som omfatter slike peptidforbindelser og fremgangsmåter for å behandle forskjellig medisinske tilstander eller anvende slike peptidforbindelser.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

25 Definisjoner:

Aminosyreresidier i peptider er forkortet som følger: fenyylalanin er Phe eller F; leucin er Leu eller L; isoleucin er Ile eller I; metionin er Met eller M; valin er Val eller V; serin er Ser eller S; prolin er Pro eller P; treonin er Thr eller T; alanin er Ala eller A; tyrosin er Tyr eller Y; histidin er His eller H; glutamin er Gln eller Q; asparagin er Asn eller N; lysin er Lys eller K; asparginsyre er Asp eller D; glutaminsyre er Glu eller E; cystein er Cys eller C; tryptofan er Trp eller W; arginin er Arg eller R; og glysin er Gly eller G. De ukonvensjonelle aminosyrene i peptider er forkortet som følger: 1-naftylalanin er 1-nal eller Np; N-metylglysin (også kjent som sarkosin) er MeG eller Sc; og acetylt glysin (N-acetylglysin) er AcG.

Som anvendt her så refererer uttrykket "polypeptid" eller "protein" til en polymer med aminosyremonomerer som er α -aminosyrer koblet sammen gjennom amidbindinger. Polypeptider er derfor minst to aminosyreresidier i lengde og de er vanligvis lengre. Vanligvis så refererer uttrykket "peptid" seg til et polypeptid som bare er noen få aminosyrer i lengde. De nye EPO-R-agonistpeptidene i den foreliggende oppfinnelsen er helst ikke lenger enn 50 aminosyreresidier i lengde. De er mer ønskelig ca. 17 til ca. 40 aminosyreresidier i lengde. Et polypeptid, i motsetning til et peptid, kan omfatte ethvert antall aminosyreresidier. Følgelig så inkluderer uttrykket polypeptid peptider så vel som lengre sekvenser av aminosyrer.

Som anvendt her så refererer frasen "farmasøytisk akseptabel" seg til molekyldeler og sammensetninger som er "generelt betraktet som trygge", dvs. de er fysiologisk tolererbare og produserer vanligvis ikke et allergen eller lignende uønsket reaksjon, slik som magetrøbbel, svimmelhet og lignende, når det gis til et menneske. Som anvendt her, så betyr uttrykket "farmasøytisk akseptabelt" helst godkjent av et regulatorisk kontor ved den føderale eller en statlig regjering eller opplistet i USA Pharmacopeia eller andre generelle godkjente farmakopeia for anvendelse i dyr, og mer bestemt i mennesker. Uttrykket "bærer" refererer til en fortynner, adjuvant, hjelpemiddel eller verktøy som forbindelsen blir administrert med. Slike farmasøytiske bærere kan være sterile væsker slik som vann og oljer, inkludert de av petroleum, dyre, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse, slik som peanøttolje, soyabønne olje, mineralolje, sesamolje og lignende. Vann eller vandige saltvannsløsninger og vandig dekstrose og glyserolløsninger blir helst brukt som bærere, spesielt for injiserbare løsninger. Passende farmasøytiske bærere er beskrevet i "Remington's Pharmaceutical Sciences" av E.W. Martin.

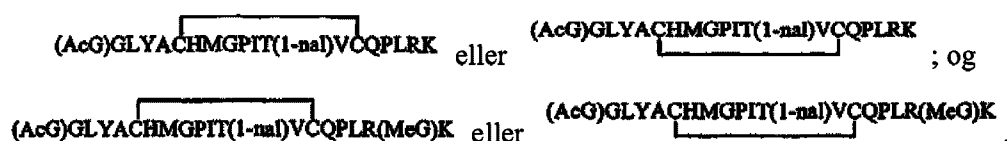
Som anvendt her så refererer uttrykket "agonist" seg til en biologisk aktiv ligand som binder seg til dens komplementære biologiske aktive reseptor, og aktiverer den sistnevnte enten til å forårsake en biologisk respons i reseptoren eller til å øke allerede eksisterende biologisk aktivitet av reseptoren.

5

Nye peptider som er EPO-R-agonister

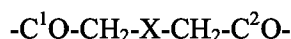
Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer nye peptidforbindelser som er EPO-R-agonister med dramatisk øket potens og aktivitet. Disse peptidforbindelsene er homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen

- 10 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1), eller homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og hver aminosyre er indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, "(AcG)" er N-acetylglysin; "(1-nal)" er 1-naftylalanin og "(MeG)" er N-metylglysin også kjent som sarkosin. Hver peptidmonomer til en peptiddimer
15 inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom cysteinresidiene i monomeren. Slike monomerer kan representeres skjematisk som følger:



- 20 Disse monomere peptidene er dimerisert for å tilveiebringe peptiddimerer med øket EPO-R-agonistaktivitet. Linker (L_K)-enheten er et forgrenet, tertiært amid, som lager bro mellom de to peptidmonomerene i den C-terminale enden, ved samtidig festing av det C-terminale lysinresidiet til hver monomer. Den tertiære amidlinkeren kan skisseres som:

25



hvor:

- 30 X er $NCO-(CH_2)_2-N^1H-$;

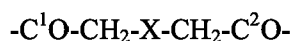
C^1 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet i den første peptidmonomeren;

C^2 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet til den andre peptidmonomeren; og

5 N^1 i X er festet via en karbamatkobling og en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, hvor PEG har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 dalton (uttrykket "ca." indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler være mer og noen mindre enn den konstaterte molekylvekten).

Den tertiære amidlinkeren kan også skisseres som:

10



hvor:

15

X er $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$;

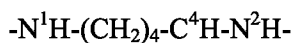
C^1 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen i det C-terminale lysinresidiet til den første peptidmonomeren; og

20

C^2 i linkeren danner en amidbinding med ϵ -aminogruppen i det C-terminale lysinresidiet til den andre peptidmonomeren.

Peptiddimerene til oppfinnelsen omfatter videre en spacerenhet med den følgende strukturen:

25



hvor:

30

C^4 i spaceren er kovalent bundet til C^3 i X;

N^1 i spaceren er kovalent festet via en karbamat eller en amidkobling til en aktivert PEG-enhet; og

35

N^2 av spaceren er kovalent festet via en karbamat eller en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, hvor PEG har molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 60 000

dalton (uttrykket "ca." indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den konstaterte molekylvekten).

Dermed kan de nye peptidene i oppfinnelsen også inneholde en PEG-enhet som er
 5 kovalent festet via en karbamatkobling eller en amidkobling til en tertiær amidlinker i
 peptiddimeren. PEG er en vannløselig polymer som er farmasøytisk akseptabel. PEG
 får anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen kan være lineær, uforgrenet PEG som
 har en molekylvekt på ca. 20 000 kilodaltons (20 K) til ca. 60 K (uttrykket "ca."
 indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler være mer og noen mindre enn
 10 den stadfestede molekylvekten). Mest ønskelig så har PEG en molekylvekt på ca. 30 K
 til ca. 40 K. En fagperson vil være i stand til å velge den ønskede polymerstørrelsen
 basert på slike betraktninger som den ønskede dosen; sirkulasjonstiden; resistens mot
 proteolyse; effekter, hvis det er noen, på den biologiske aktiviteten; hvor lett det er å
 håndtere; graden eller mangelen av antigenisitet; og andre kjente effekter av PEG på et
 15 terapeutisk peptid.

Peptider, peptiddimerer og andre peptidforsterkende molekyler i oppfinnelsen kan være
 festet til vannløselige polymerer (for eksempel PEG) ved å anvende enhver av en rekke
 kjemier for å koble den vannløselige polymeren eller polymerene til den
 20 reseptorbindende delen av molekylet (for eksempel peptid + spacer). En typisk
 utførelsesform bruker en enkelt festekobling for kovalent å feste den vannløselige
 polymeren eller polymerene til den reseptorbindende delen, i alternative
 utførelsesformer så kan imidlertid multiple festekoblinger anvendes, inkludert videre
 variasjoner hvor forskjellige arter vannløselig polymer festes til den reseptorbindende
 25 delen ved bestemte festekoblinger, som kan inkludere kovalent festekobling eller
 koblinger til spaceren og/eller til en eller begge peptidkjedene. I noen utførelsesformer
 så vil dimeren eller den høyere ordens multimeren omfatte distinkte typer peptidkjede
 (dvs. en heterodimer eller annen heteromultimer). Ved hjelp av eksempel og ikke
 begrensende, så kan en dimer omfatte en første peptidkjede som har en PEG-
 30 festekobling og den andre peptidkjeden kan enten mangle en PEG-festekobling eller
 benytte en annen koblingskjemi enn den første peptidkjeden og i noen variasjoner så
 kan spaceren inneholde eller mangle en PEG-festekobling og nevnte spacer hvis den er
 PEGylert kan benytte en koblingskjemi som er forskjellig fra den til den første og/eller
 andre peptidkjeden. En alternativ utførelse bruker en PEG festet til spacerdelen av den
 35 reseptorbindende delen og en forskjellig vannløselig polymer (for eksempel et

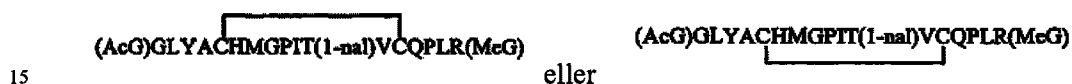
karbohydrat) konjugert til en sidekjede av en av aminosyrene av peptiddelen av molekylet.

En rekke polyetylenglykol (PEG)-typer kan anvendes for PEGylering av den reseptorbindende delen (peptider + spacer). Vesentlig ethvert passende reaktivt PEG-reagens kan anvendes. I foretrukne utførelsesformer så vil det reaktive PEG-reagenset resultere i dannelsen av en karbamat eller amidbinding ved konjugering til den reseptorbindende delen. Passende reaktive PEG-typer inkluderer, men er ikke begrenset til de som er tilgjengelig for salg i Drug Delivery Systems katalogen (2003) til NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150-6019) og Molecular Engineering katalogen (2003) til Nektar Therapeutics (490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806). For eksempel og ikke som begrensning, så er de følgende PEG-reagensene ofte foretrukket i forskjellige utførelsesformer: mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, multi-Arm PEG, mPEG(MAL)2, mPEG2(MAL), mPEG-NH2, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-tioestere, mPEG-dobbel estere, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, heterofunksjonelle PEGer (NH2-PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), PEG-akrylater (ACRL-PEG-NHS), PEG-fosfolipider (for eksempel mPEG-DSPE), multiarmede PEGer fra Sunbrite-seriene som inkluderer GL-seriene til glyserinbaserte PEGer aktivert ved en kjemi valgt av fagpersoner, enhver av de Sunbrite-aktiverte PEGene (inkludert, men ikke begrenset til, karboksyl-PEGer, p-NP-PEGer, tresyl-PEGer, aldehyd PEGer, acetal-PEGer, amino-PEGer, tiol-PEGer, maleimido-PEGer, hydroksyl-PEG-amin, amino-PEG-COOH, hydroksyl-PEG-aldehyd, karboksylsyreanhydridtype-PEG, funksjonalisert PEG fosfolipid og andre lignende og/eller passende reaktive PEGer valgt av en fagperson for deres bestemte anvendelse og bruk.

De nye peptidene i oppfinnelsen kan også inneholde to PEG-enheter som er kovalent festet via en karbamat eller en aminkobling til en spacerenhet, hvor spacerenheten er kovalent bundet den tertiære amidlinkeren i peptiddimeren. Hver av de to PEG-enheterne anvendt i slike utførelsesformer i den foreliggende oppfinnelsen kan være lineære og de kan være koblet sammen ved et enkelt festepunkt. Hver PEG-enhet har helst en molekylvekt på ca. 10 kD (10 K) til ca. 60 K (uttrykket "ca." indikerer at i preparater med PEG, så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den stadfestede molekylvekten). Lineær PEG-enheter er spesielt foretrukket. Mer ønskelig så har hver av de to PEG-enheterne en molekylvekt på ca. 20K til ca. 40K, og enda mer ønskelig mellom ca. 20K og ca. 40K. Enda mer ønskelig så har hver av de to PEG-

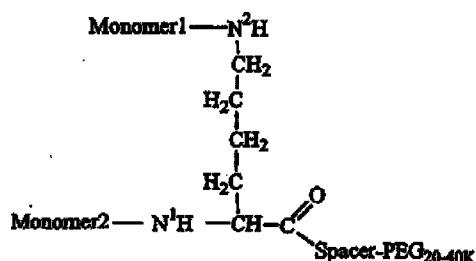
enhetene en molekylvekt på ca. 20K. En fagperson vil være i stand til å velge den ønskede polymerstørrelse basert på slike betraktninger som den ønskede dosen; sirkulasjonstiden; resistensen mot proteolyse; effektene, hvis det er noen, på den biologiske aktiviteten, hvor lett den er å håndtere; graden eller mangelen på antigenisitet; og andre kjente effekter på PEG på et terapeutisk peptid.

Den foreliggende oppfinnelsen omfatter også peptidagonister som er homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) (Sekv. Id. nr. 3), hvor hver aminosyre er indikert ved standard en-bokstavs forkortning, "(AcG)" er N-acetylglysin, "(1-nal)" er 1-naftylalanin og "(MeG)" er N-metylglysin, også som kjent som sarkosin. Hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom cysteinresidene i monomeren. Slike monomerer kan representeres skjematisk som følger:

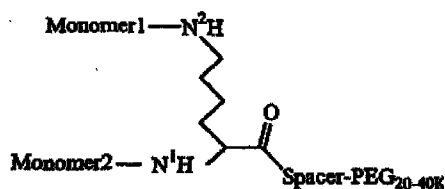


Disse monomere peptidene er dimerisert for å tilveiebringe peptiddimerer for å øke EPO-R-agonistaktivitet. Linker (L_K)-enheten er et lysinresidie som danner bro mellom den C-terminale enden av de to peptidmonomere, ved samtidig festing til den C-terminale aminosyren i hver monomer. En peptidmonomer er festet til dens C-terminale ende til lysinets ϵ -aminogruppe og den andre peptidmonomeren er festet til dens C-terminale ende til lysinets α -aminogruppe. For eksempel så kan dimeren illustreres strukturelt som vist i Formel I, og oppsummeres som vist i Formel II:

25 Formel I



Formel II



I Formel I og Formel II så representerer N^2 nitrogenatomet til lysinets ϵ -aminogruppe og N^1 representerer nitrogenatomet til lysinets α -aminogruppe.

Peptiddimeren til oppfinnelsen omfatter videre en spacerenhet med den følgende strukturen:



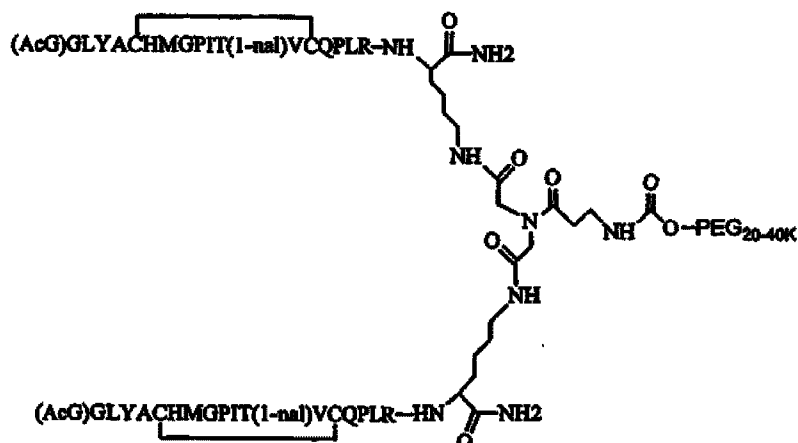
5

Ved den ene enden så er N^1 i spaceren festet via en amidkobling til et karbonylkarbon i lysinlinker. I den motsatte enden så er N^2 til spaceren festet via en karbamatkobling eller en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, hvor PEG har en molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 60 000 daltons (uttrykket "ca." indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den stadfestede molekylvekten). Mer ønskelig har PEG en molekylvekt på ca. 20 000 til 40 000 daltons.

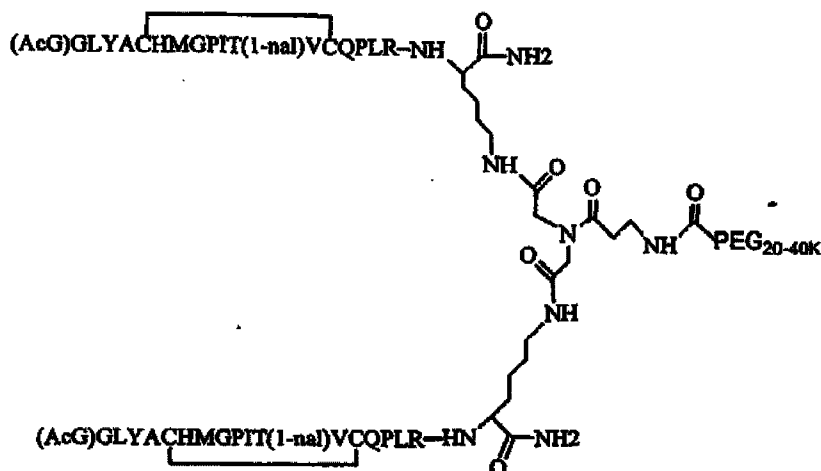
De nye peptidene i oppfinnelsen inneholder dermed også en PEG-enhet som er kovalent festet til peptiddimeren. PEG er en vannløselig polymer som er farmasøytisk akseptabel. PEG får anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen kan være lineær, uforgrenet PEG som har en molekylvekt på ca. 20 kilodaltons (20K) til ca. 60K (uttrykket "ca." indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler veie mer og noen mindre enn den stadfestede molekylvekten). Mest ønskelig så har PEG en molekylvekt på ca. 20K til ca. 40K, og enda mer ønskelig en molekylvekt på ca. 30K til ca. 40K. En fagperson vil være i stand til å velge den ønskede polymerstørrelsen basert på slike betraktninger som den ønskede dosen; sirkulasjonstiden; resistensen mot proteolyse; effektene, hvis det er noen, på den biologiske aktiviteten; lettheten i håndtering; graden eller mangel av antigenisitet; og andre kjente effekter av PEG på et terapeutisk peptid.

Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og N^1 i linkeren er festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

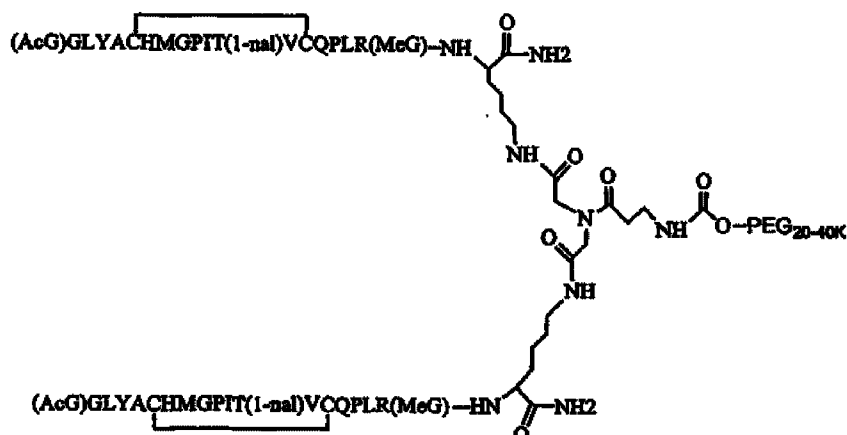
30



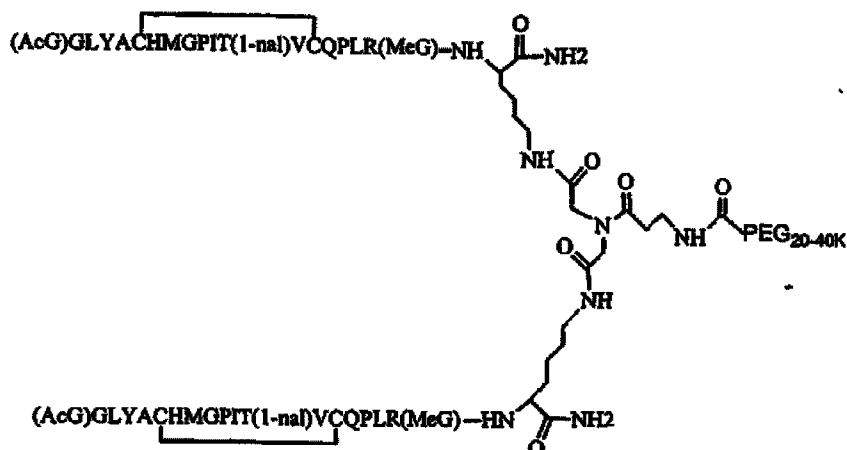
Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen
 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og N¹ i linkeren er festet via
 5 en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye
 peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



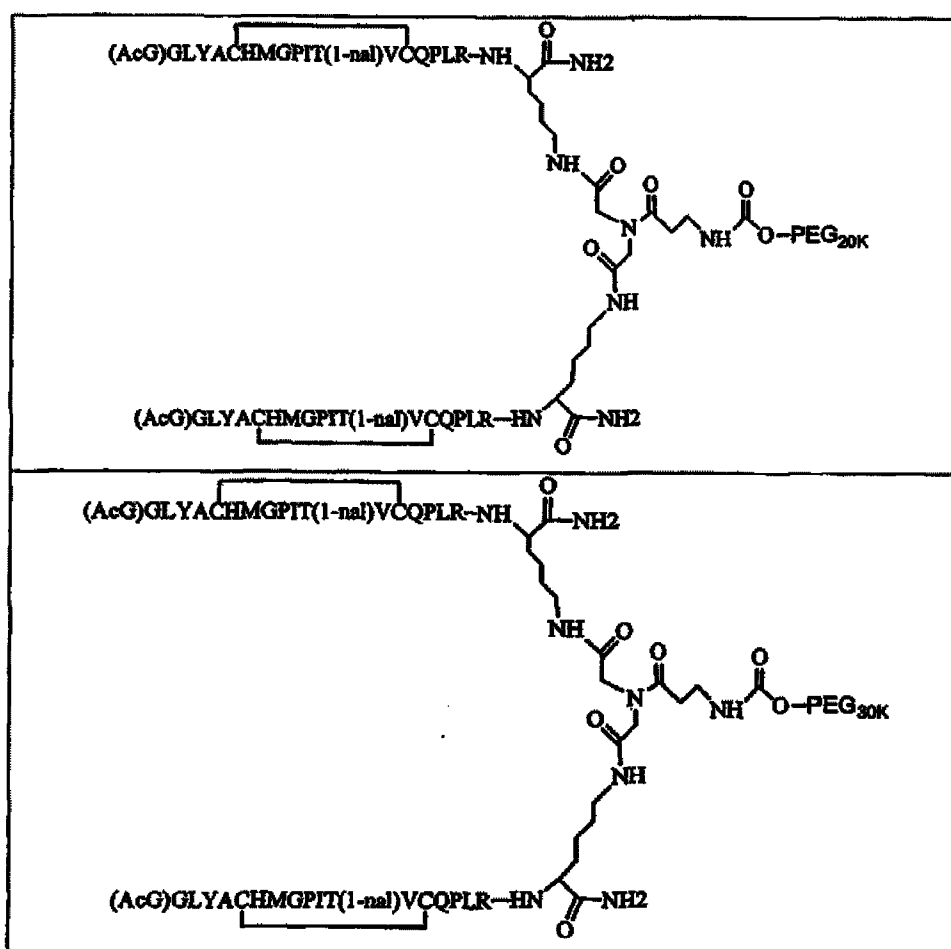
Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen
 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og N¹ i linkeren er
 10 festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet så kan de
 nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

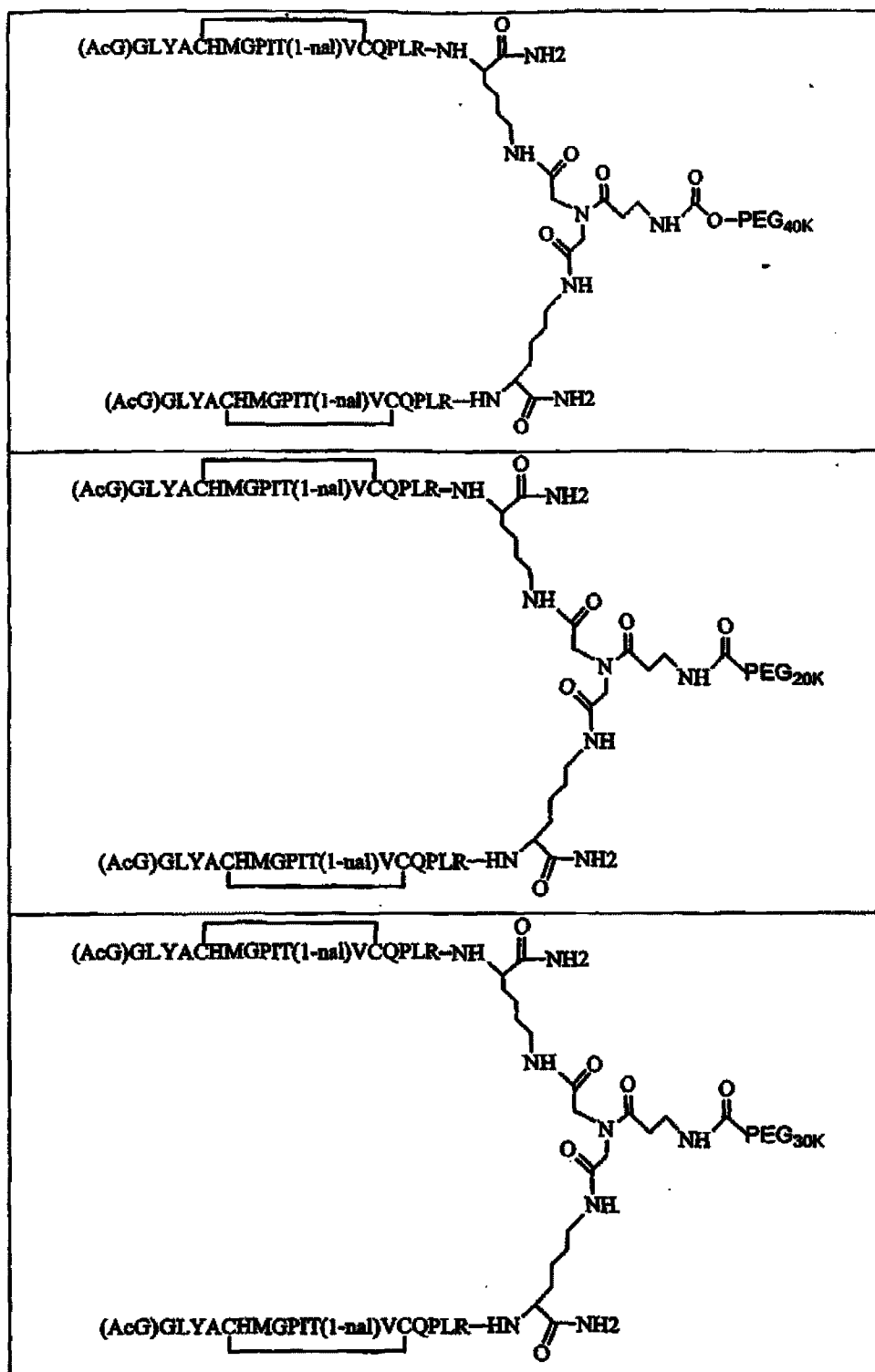


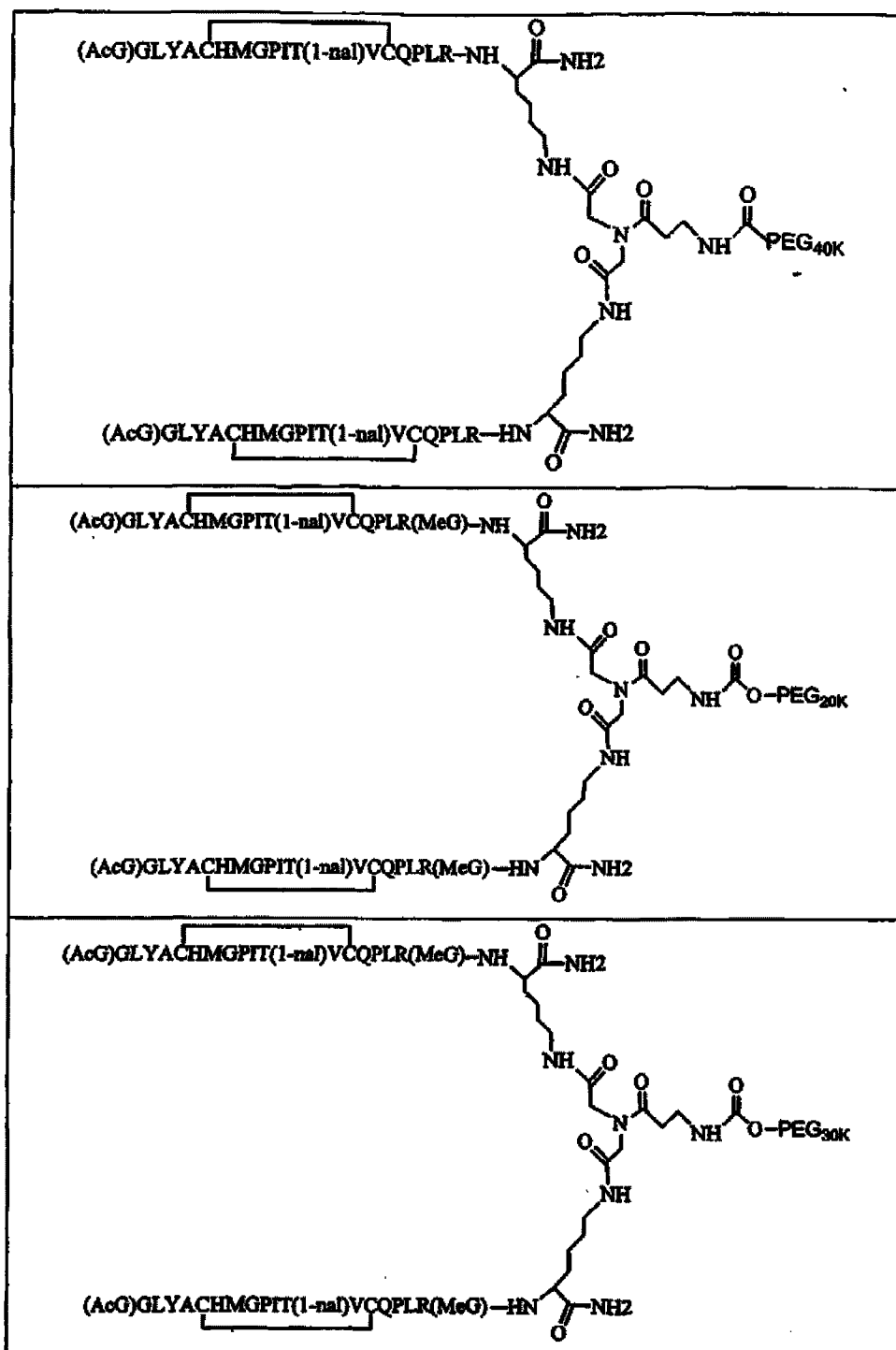
Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPI(1-na)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og N¹ i linkerene er festet via en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

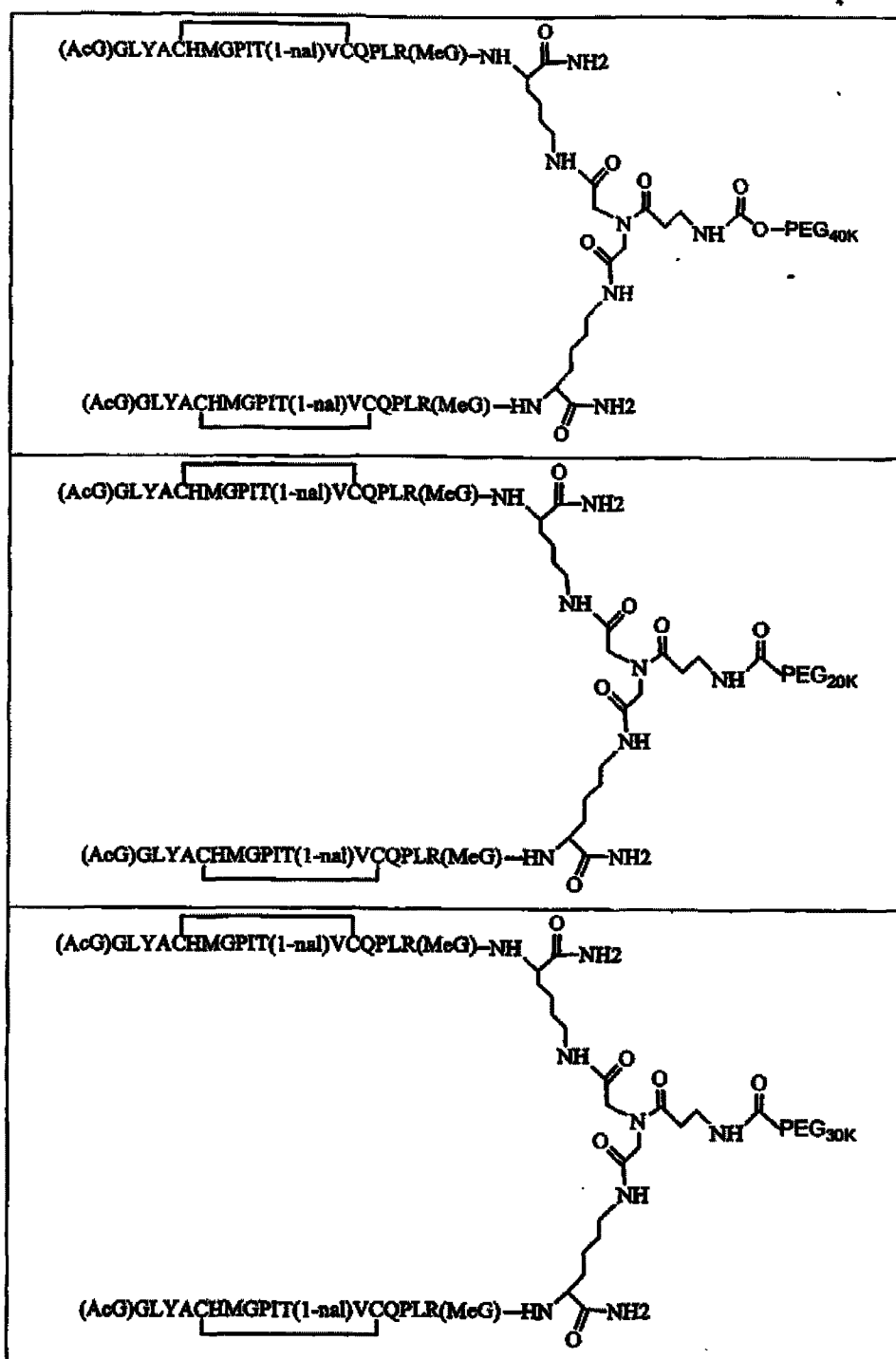


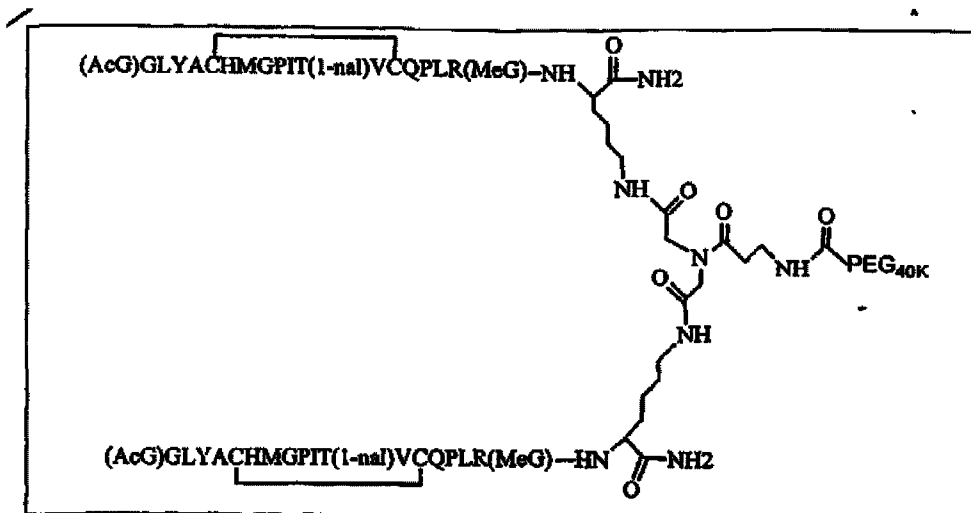
Foretrukne peptiddimerer i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til:



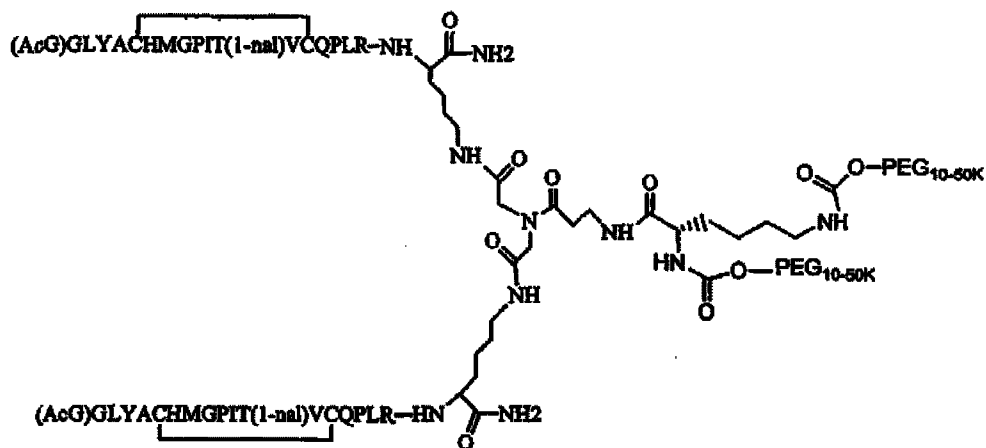






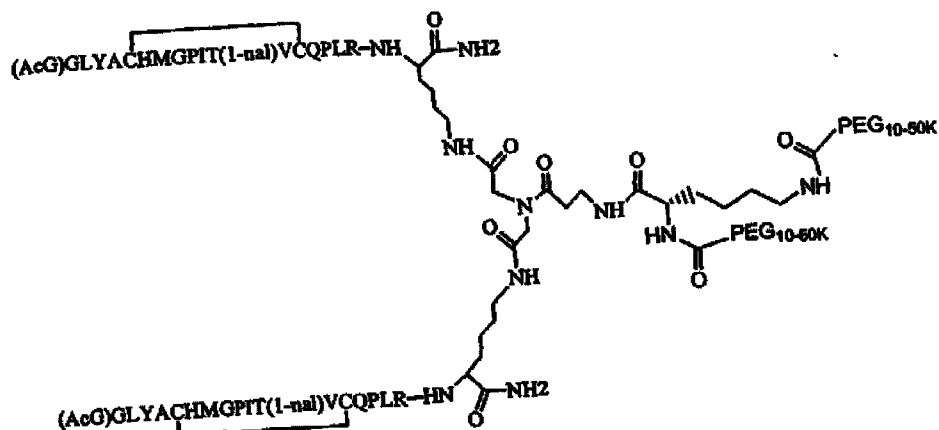


Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen
 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og både N¹ og N² i spaceren
 5 er kovalent festet via en karbamatkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye
 peptidforbindelsene ifølge oppfinnelsen representeres som følger:

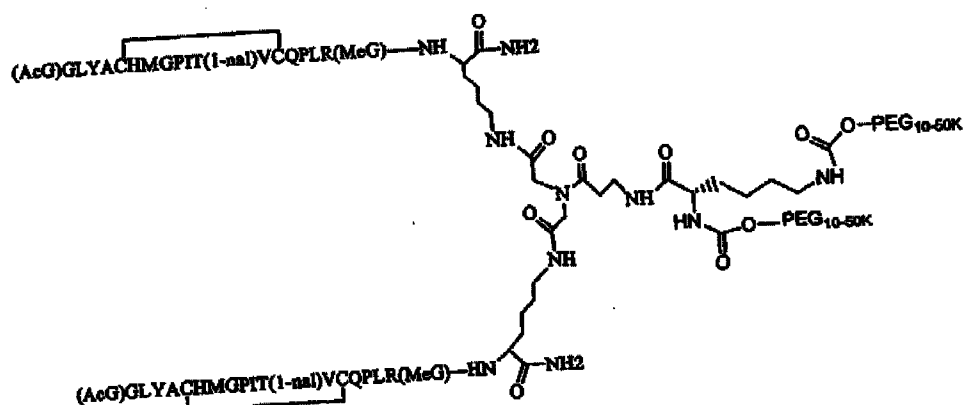


Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen
 10 (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1) og både N¹ og N² av
 spaceren er kovalent festet via en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye
 peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

29

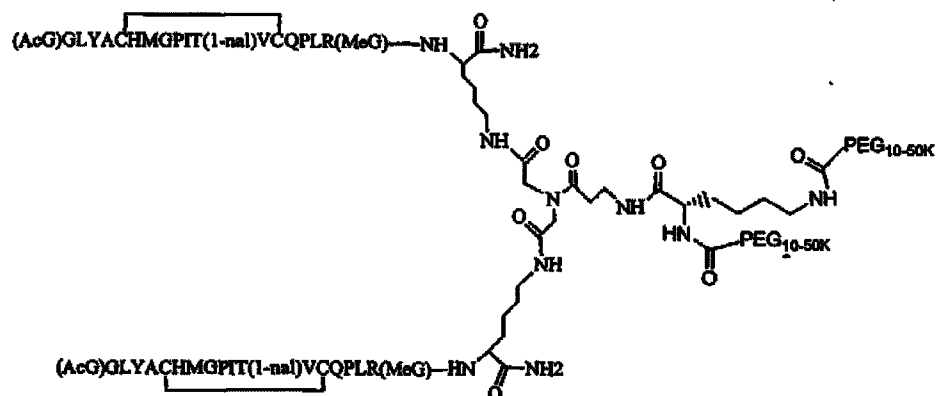


- Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og både N¹ og N² i spaceren er kovalent festet via en karbamatkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye peptidforbindelsen i oppfinnelsen representeres som følger:

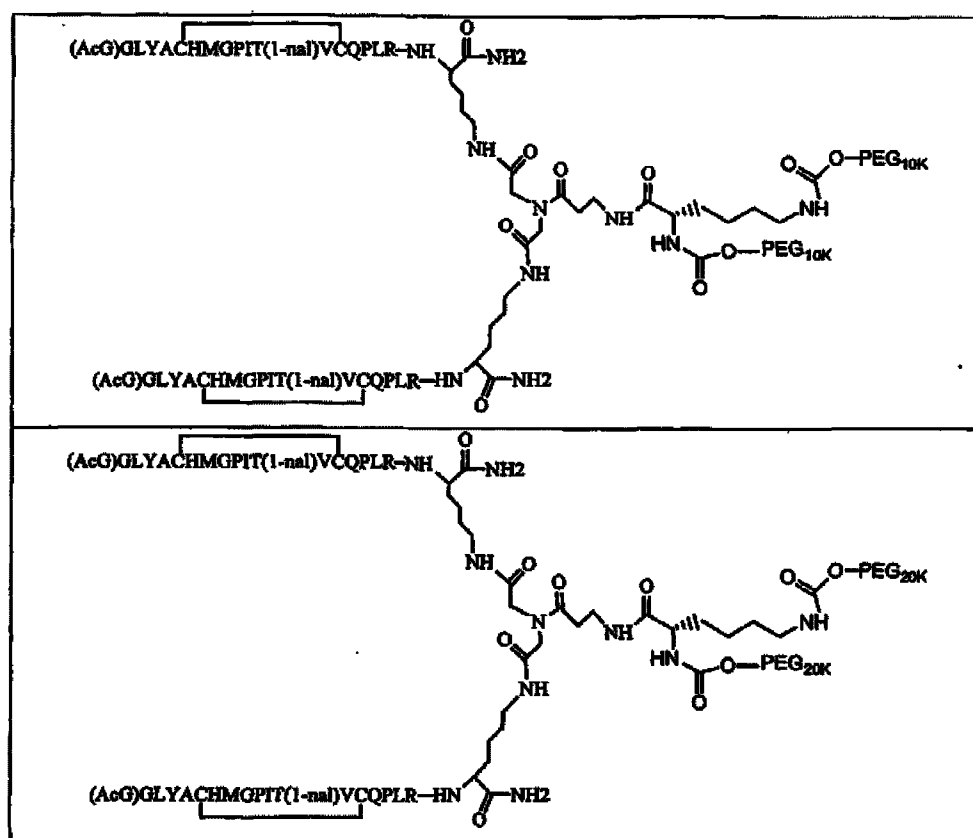


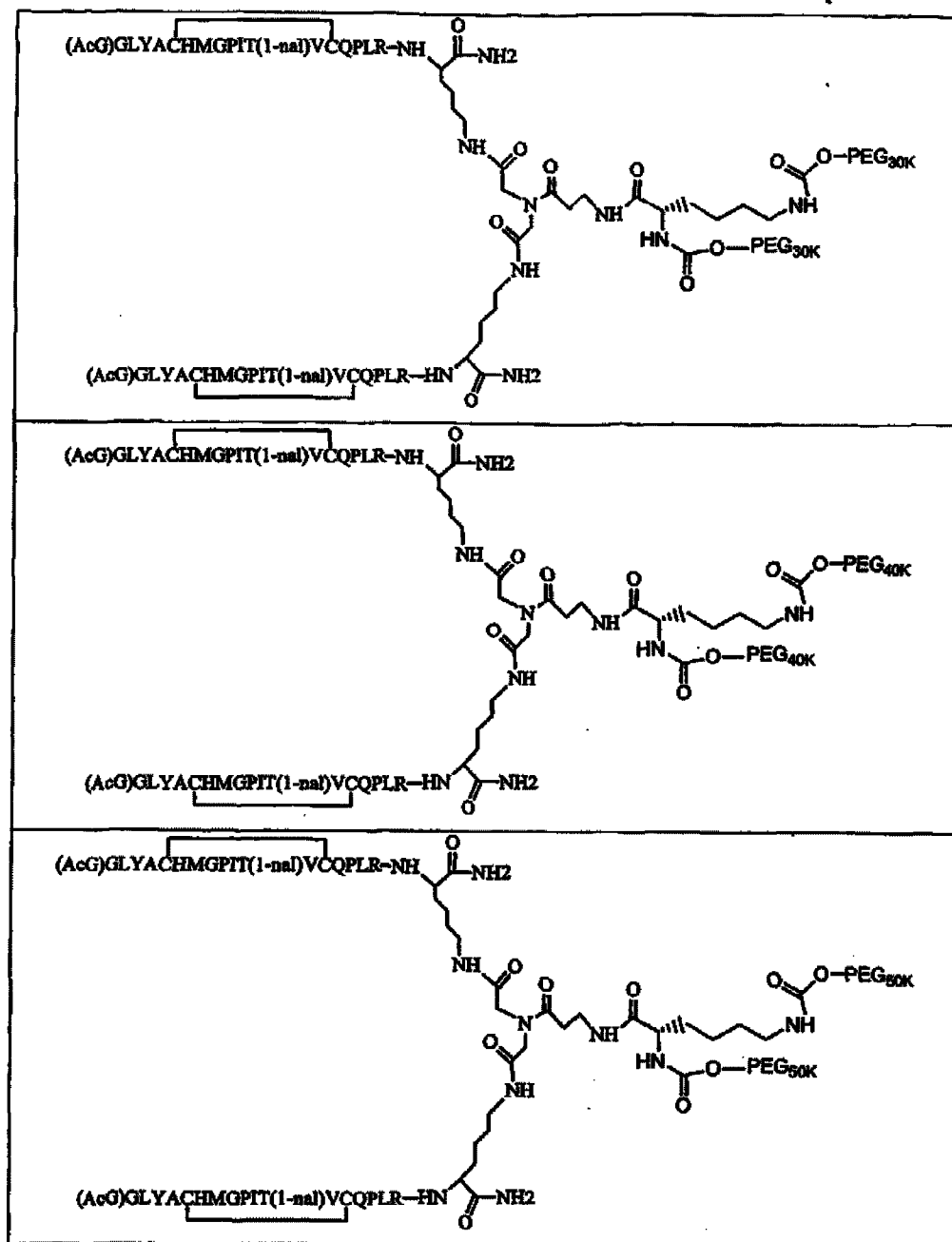
- Der hvor hver monomer av homodimeren har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) og både N¹ og N² av spaceren er kovalent festet via en amidkobling til en aktivert PEG-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene via forbindelsen representeres som følger:

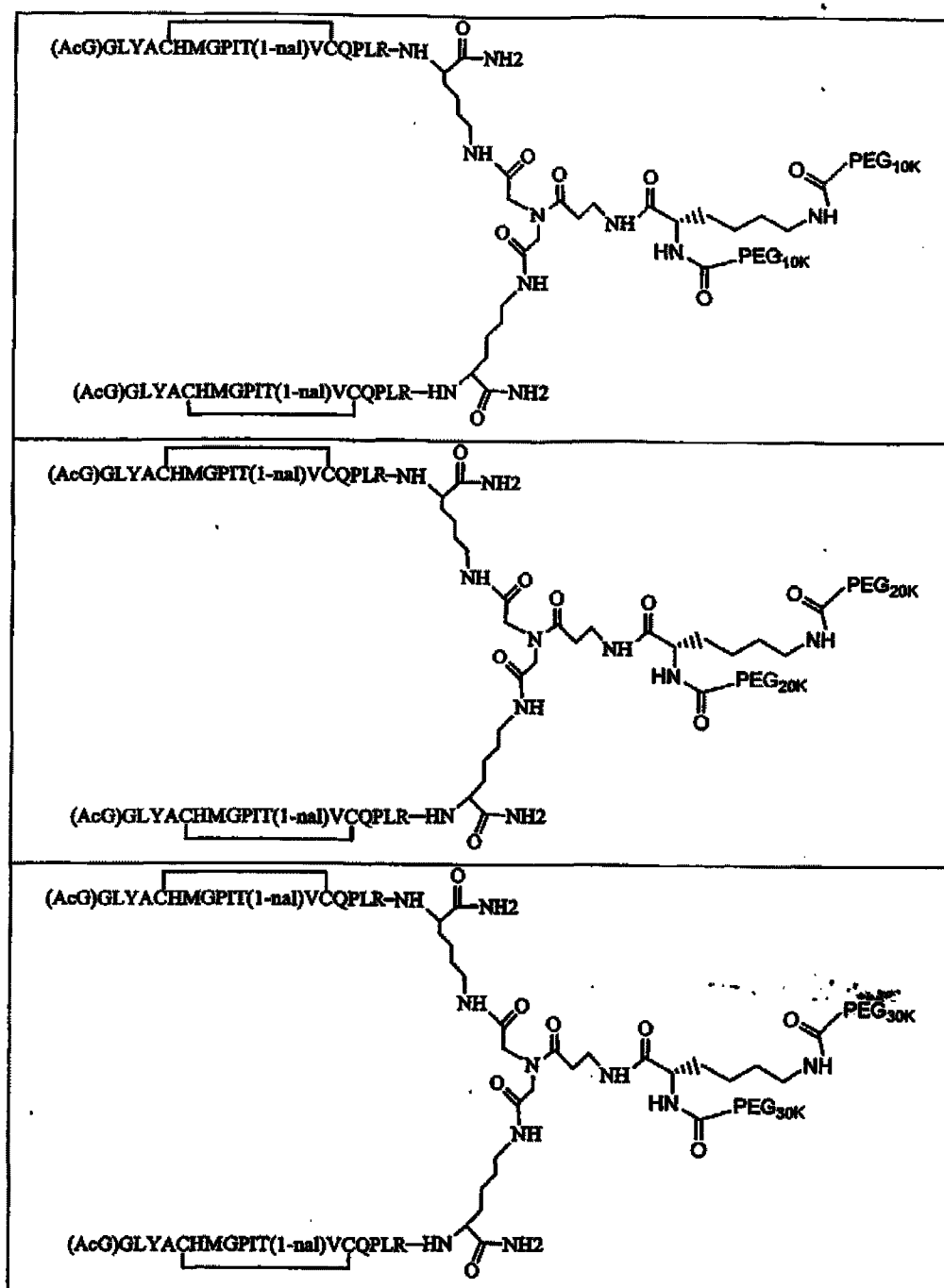
30

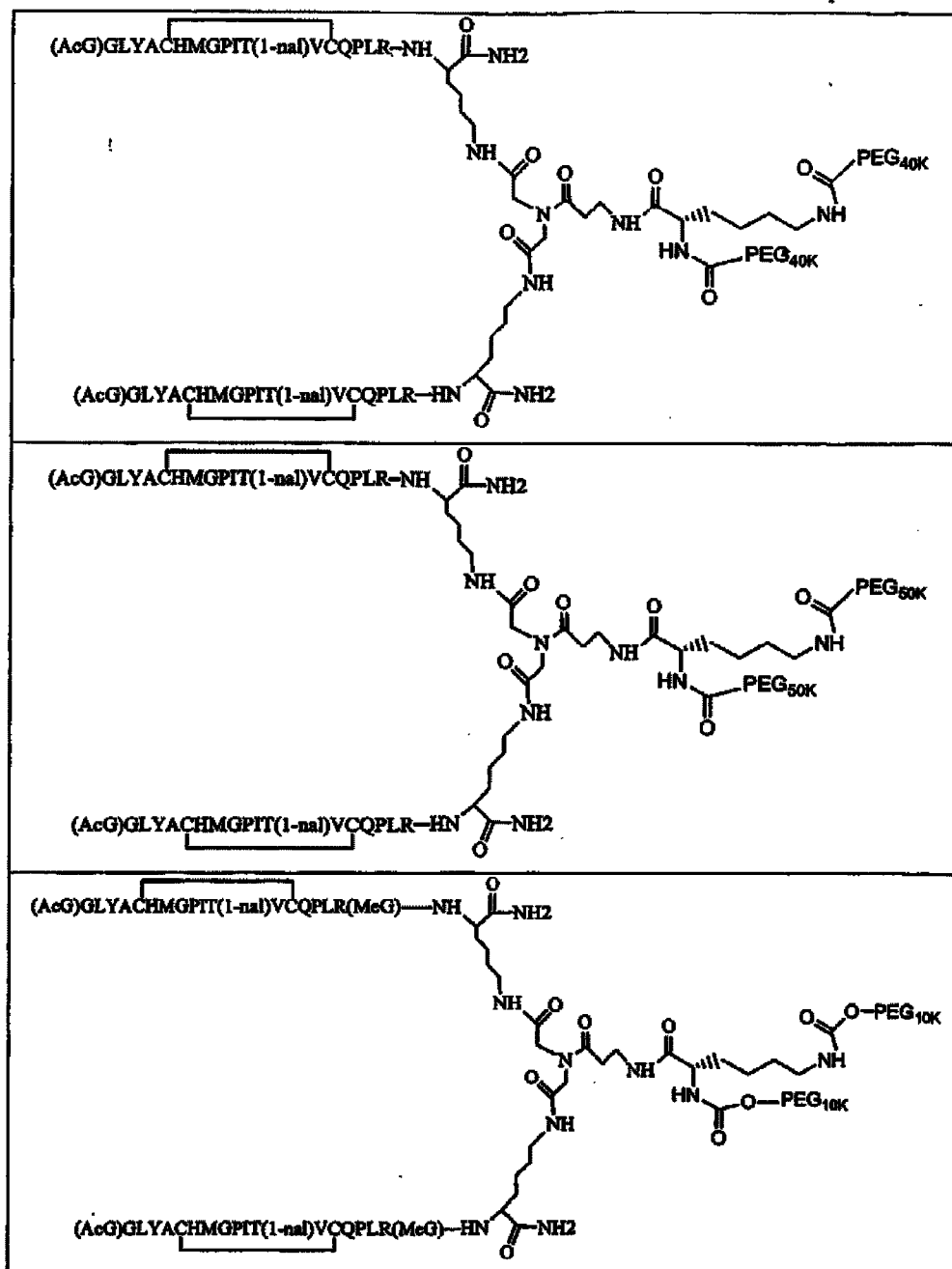


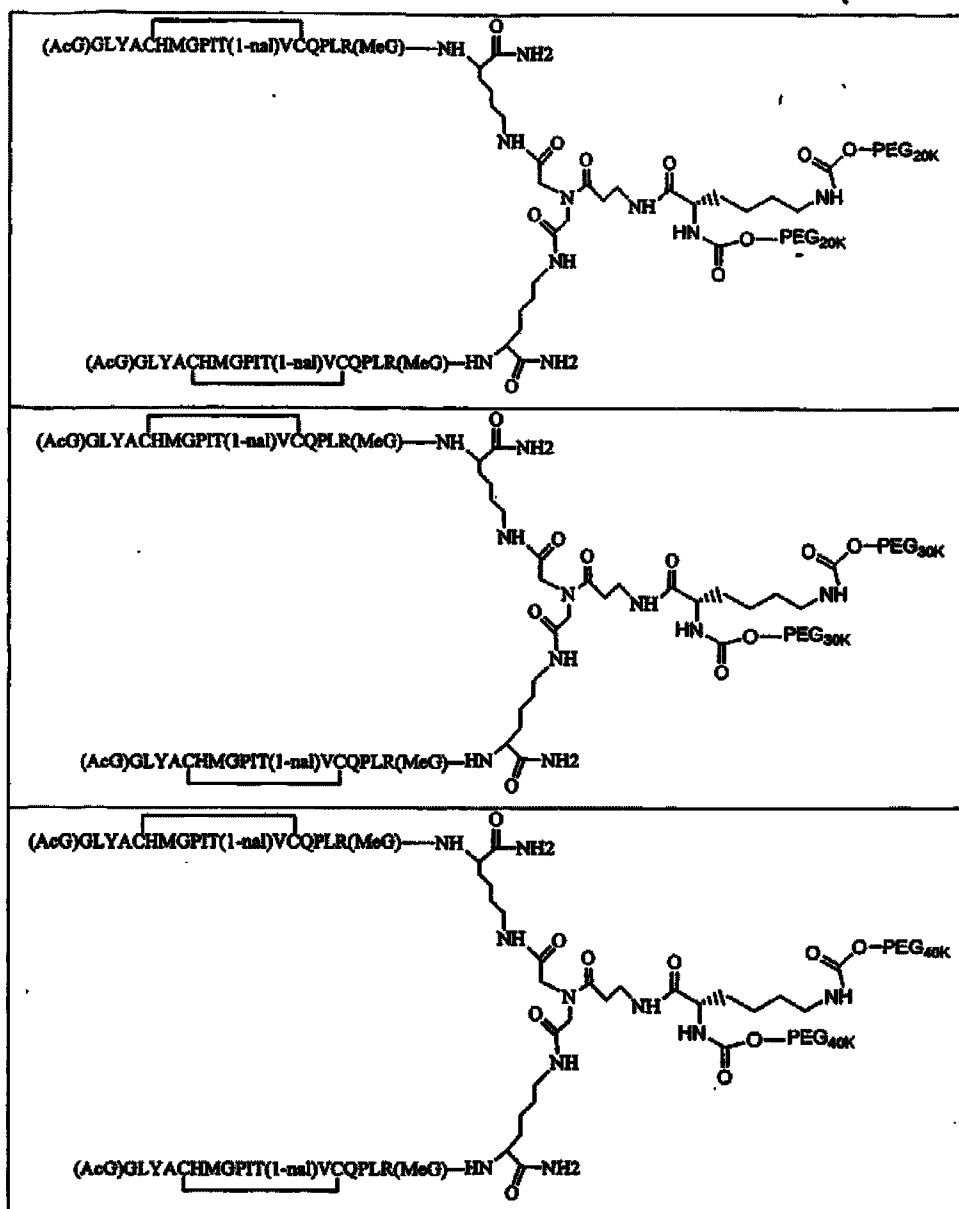
Foretrukne peptiddimerer ifølge oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til:

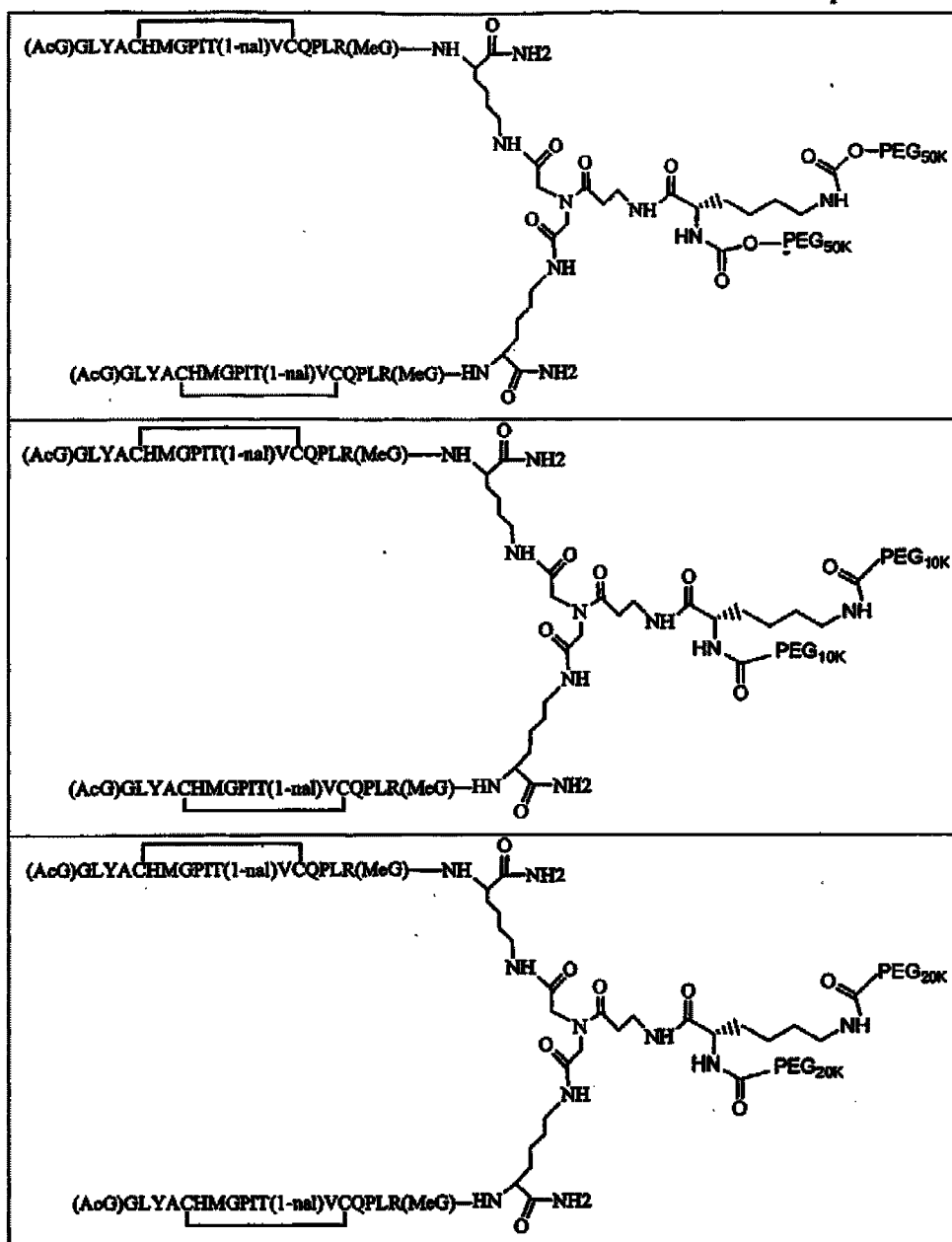


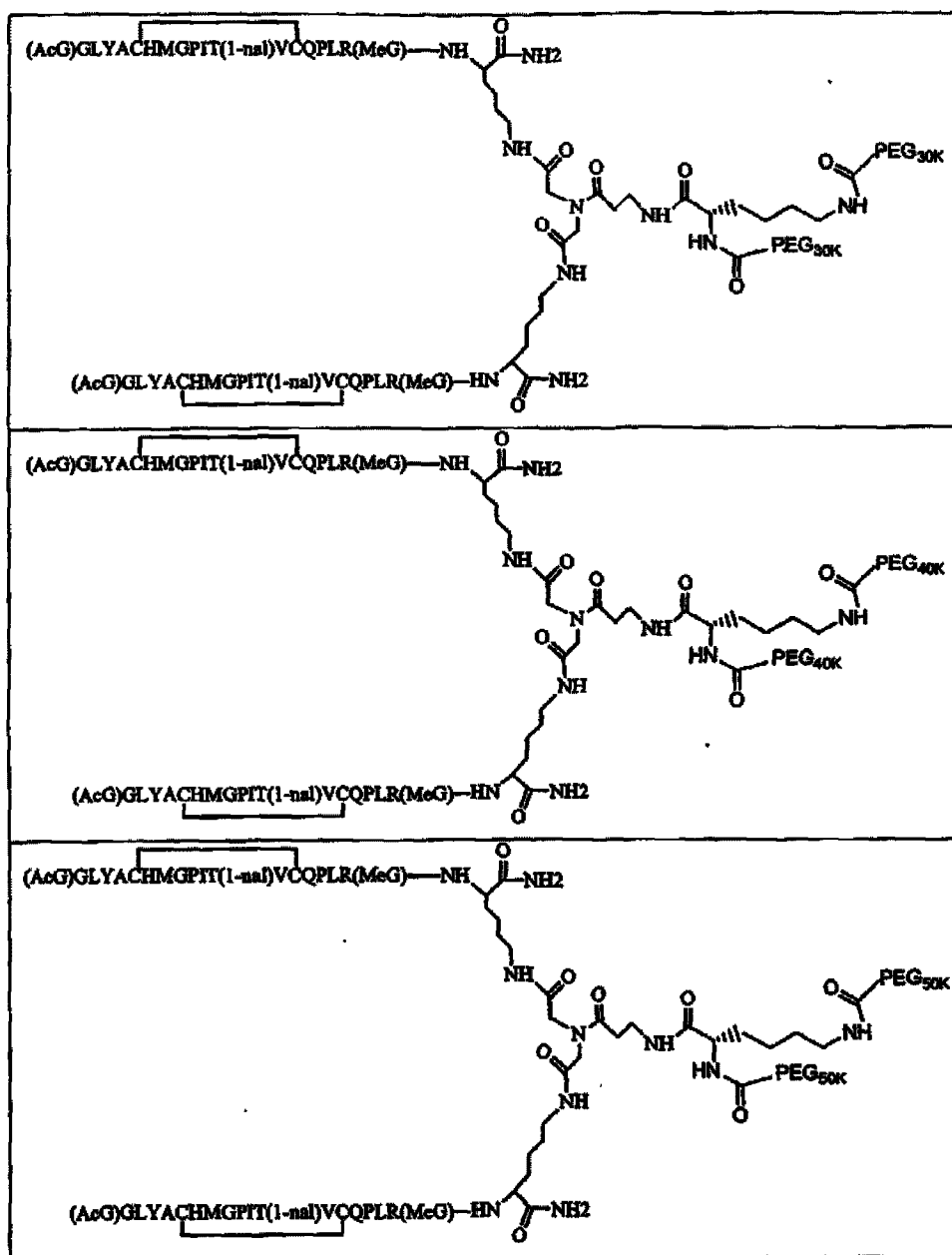




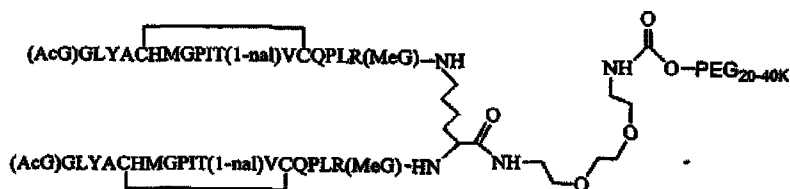






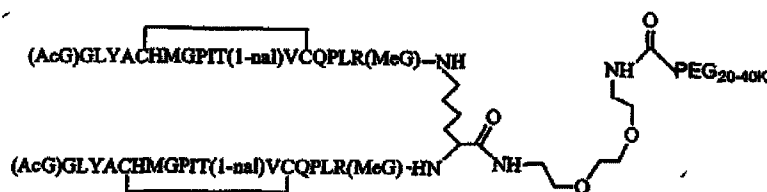


Der hvor spaceren er festet via en karbamatkobling til en aktivert polyetylenglykol
 5 (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:



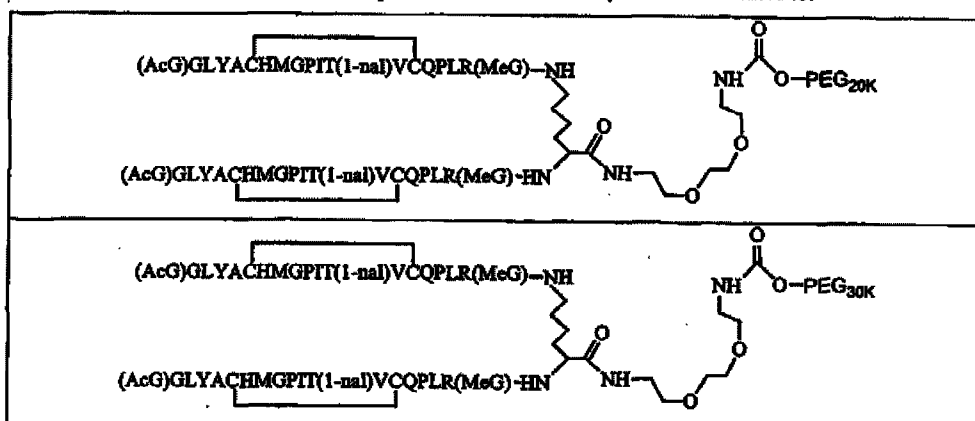
Der hvor spaceren er festet via en amidkobling til en aktivert polyetylenglykol (PEG)-enhet, så kan de nye peptidforbindelsene i oppfinnelsen representeres som følger:

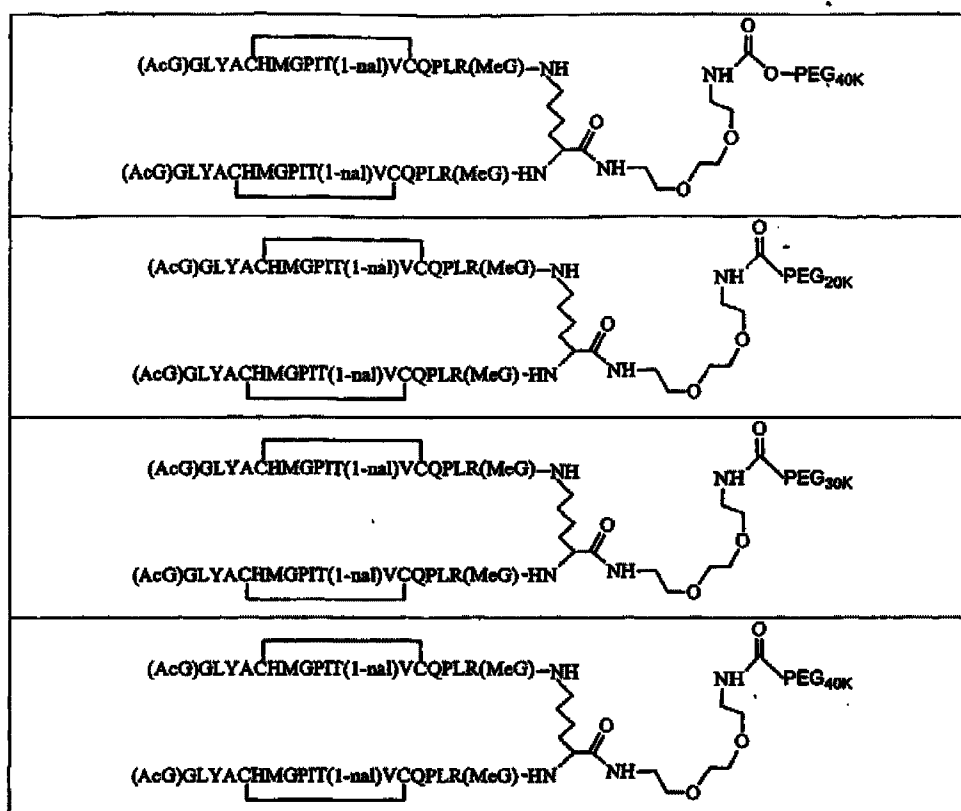
5



Denne dimere strukturen kan skrives [Ac-peptid, disulfid]₂Lys-spacer-PEG_{20-40K} for å betegne et N-terminalt acetylt peptid bundet til både α- og ε-aminogruppene til lysin
 10 hvor hvert peptid inneholder en intramolekyl disulfid sløyfe og et spacermolekyl som danner en kovalent kobling mellom den C-terminale enden av lysin og PEG-enhet, hvor PEG har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

Foretrukne peptiddimerer i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, men er ikke
 15 begrenset til:





- Stereoisomerer (for eksempel D-aminosyrer) til de tyve konvensjonelle aminosyrene, unaturlige aminosyrer slik som α,α -disubstituerte aminosyrer, N-alkylaminosyrer, melkesyrer og andre ukonvensjonelle aminosyrer kan også være passende komponenter for forbindelser i den foreliggende oppfinnelsen. Eksempler på ukonvensjonelle aminosyrer inkluderer, men er ikke begrenset til: β -alanin, 3-pyridylalanin, 4-hydroksyprolin, O-fosfoserin, N-metylglysin, N-acetylserin, N-formylmetionin, 3-metylhistidin, 5-hydroksyllysin, nor-leucin og andre lignende aminosyrer og iminosyrer.
- Andre modifikasjoner er også mulige, inkludert modifikasjon av den aminoterminalen enden, modifikasjon av den karboksyterminalen enden, erstatning av en eller flere av de naturlig forekommende, genetisk kodende aminosyrene med en ikke-konvensjonell aminosyre, modifikasjon av sidekjeden av en eller flere aminosyreresidier, peptidfosforylering og lignende.

15

Peptidsekvensene i den foreliggende oppfinnelsen kan være tilstede alene eller sammen med den N-terminalen og/eller D-terminalen utvidelsen av peptidkjeden. Slike utvidelser kan være naturlig kodede peptidsekvenser valgfritt med eller vesentlig uten ikke-

naturlig forekommende sekvenser; utvidelsene kan inkludere enhver tilleggelse, sletting, punktmutasjon og andre sekvensmodifikasjoner eller kombinasjoner som er ønsket av fagfolk. For eksempel og ikke som begrensning, så kan naturlig forekommende sekvenser være fullengde eller delvis fullengde og de kan inkludere

5 aminosyresubstitusjoner for å tilveiebringe et sete for festing av karbohydrat, PEG, andre polymer og lignende via sidekjedekonjugasjon. I en variasjon så resulterer aminosyresubstitusjonen i humanisering av en sekvens for å gjøre den kompatibel med det humane immunsystemet. Fusjonsproteiner av alle typer blir tilveiebrakt, inkludert

10 immunglobulinsekvenser tilstøtende til eller i nær proksimitet til de EPO-R-aktiverende sekvensene i den foreliggende oppfinnelsen, med eller uten en ikke-immunoglobulin spacersekvens. En type utførelsesform er en immunglobulinkjede som har den EPO-R-aktiverende sekvensen istedenfor den variable (V)-regionen til den tunge og/eller lette kjeden.

15 Tillaging av peptidforbindelsene i oppfinnelsen:

Peptidsyntese

Peptidene i oppfinnelsen kan lages ved klassiske fremgangsmåter kjent i fagfeltet. Disse standard fremgangsmåtene inkluderer eksklusiv fastfase syntese, delvis fastfase syntesefremgangsmåter, fragmentkondensering, klassisk løsningssyntese og

20 rekombinant DNA-teknologi [se for eksempel Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149].

I en utførelsesform så blir peptidmonomerene til en peptiddimer syntetisert individuelt og dimerisert etter syntese.

25

I en annen utførelsesform så blir peptidmonomerene i en dimer koblet ved deres C-terminale ender ved hjelp av en forgrenet, tertiær amidlinker L_K -enhet som har to funksjonelle grupper som er i stand til å tjene som initielle seter for peptidsyntese og en tredje funksjonell gruppe (for eksempel en karboksylgruppe eller en amingruppe) som

30 muliggjør binding til en annen molekyl enhet (for eksempel som kan være tilstede på overflaten av en fast støtte). I dette tilfellet så kan de to peptidmonomerene syntetiseres direkte på to reaktive nitrogengrupper i linker L_K -enheden i en variasjon av den faste fase synteseteknikken. Slike syntese kan være sekvensiell eller samtidig.

35 I en annen utførelsesform så kan de to peptidmonomerene bli syntetisert direkte på to reaktive nitrogengrupper av linker L_K -enheden i en variasjon av den faste fase

synteseteknikken. Slik syntese kan være sekvensiell eller samtidig. I denne utførelsesform så er en lysinlinker (L_K)-enhet som har to aminogrupeer som er i stand til å tjene som initierings seter for peptidsyntese og en tredje funksjonell gruppe (for eksempel karboksylgruppen til et lysin; eller aminogruppen til et lysinamid, et

5 lysinresidie hvor karboksylgruppen er blitt omdannet til en amid enhet $-CONH_2$) som muliggjør bindingen til en annen molekyl enhet (for eksempel som kan være tilstede på overflaten av en fast støtte) anvendt.

Der hvor sekvensiell syntese av peptidkjedene i en dimer på en linker skal utføres, blir

10 to aminfunksjonelle grupper på linkermolekylet beskyttet med forskjellige ortogonalt fjernbare aminbeskyttende grupper. Den beskyttede linker er koblet til en fast støtte via linkerens tredje funksjonelle gruppe. Den første aminbeskyttende gruppen blir fjernet, og det første peptidet i dimeren blir syntetisert på den første avbeskyttende amin enheten. Deretter så blir den andre aminbeskyttende gruppen fjernet og det andre

15 peptidet i dimeren blir syntetisert på den andre avbeskyttede amin enheten. For eksempel så kan den første amino enheten til linkerens beskyttes med Alloc, og den andre med Fmoc. I dette tilfellet så kan Fmoc-gruppen (men ikke Alloc-gruppen) fjernes ved behandling med en mild base [for eksempel 20% piperidin i dimetylformamid (DMF)], og den første peptidkjeden syntetisert. Deretter kan Alloc-gruppen fjernes med et

20 passende reagens [for eksempel $Pd(PPh_3)_4$ -metylmorfolin og kloroform], og den andre peptidkjeden syntetisert. Legg merke til at der hvor forskjellige tiolbeskyttende grupper for cystein anvendes for å kontrollere disulfidbindingsdannelse (som diskutert under), så må denne teknikk anvendes selv der hvor sluttamino syresekvensene til peptidkjedene i en dimer er identiske.

25

Der hvor samtidig syntese av peptidkjedene i en dimer på en linker skal utføres, blir det to aminfunksjonelle gruppene i linkermolekylet beskyttet med den samme fjernbare aminbeskyttende gruppen. Den beskyttede linker er koblet til en fast støtte via linkerens tredje funksjonelle gruppe. I dette tilfellet så blir de to beskyttede

30 funksjonelle gruppene i linkermolekylet samtidig avbeskyttet, og de to peptidkjedene blir samtidig syntetisert på de avbeskyttede aminene. Legg merke til at ved å anvende denne teknikk så vil sekvensene til peptidkjedene i dimeren være identisk og de tiolbeskyttende gruppene for cysteinresidene er alle de samme.

35 En foretrukket fremgangsmåte for peptidsyntese er fastfase syntese. Fastfase peptidsynteseprosedyrer er velkjent i fagfeltet [se for eksempel Stewart Solid Phase

- Peptide Syntheses (Freeman og Co., San Francisco) 1969, 2002/2003 General Catalog from Novabiochem Corp, San Diego, USA; Goodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002]. I fastfasesyntese så blir syntesen vanligvis startet fra den C-terminale enden av peptidet ved å anvende en α -
- 5 aminobeskyttet resin. Et passende startmaterial kan for eksempel lages ved å feste den nødvendige α -aminosyren til en klormetylert resin, en hydroksymetylresin, en polystyrenresin, en benzhydrylaminresin eller lignende. En slik klormetylert resin selges under varenavnet BIO-BEADS SX-1 av Bio Rad Laboratories (Richmond, CA). Tillagingen av hydroksymetylresinet er blitt beskrevet (Bodonszky et al. (1966) Chem.
- 10 Inc. London 38:1597). Benzhydrylamin (BHA)-resinet er blitt beskrevet (Pietta og Marshall (1970) Chem. Commun. 650) og hydrokloridformen er kommersielt tilgjengelig fra Beckman Industries, Inc. (Palo Alto, CA). For eksempel så kan en α -aminobeskyttet aminosyre kobles til en klormetylert resin ved hjelp av en cesiumbikarbonat katalyst, ifølge fremgangsmåten beskrevet av Gisin (1973) Helv. Chim. Acta. 56:1467.
- 15 Etter initiell kobling så blir den α -aminobeskyttende gruppen fjernet for eksempel ved å anvende trifluoreddiksyre (TFA) eller hydroklorisyre (HCl) løsninger i organiske løsemidler ved romtemperatur. Deretter blir α -aminobeskyttede aminosyrer suksessivt koblet til en voksende støttebundet peptidkjede. De α -aminobeskyttende gruppene er
- 20 de som er kjent for å være nyttig i fagfeltet med hensyn på trinnvis syntese av peptider, inkludert: acyl-type beskyttende grupper (for eksempel formyl, trifluoracetyl, acetyl), aromatiske uretan-type beskyttende grupper (for eksempel benzyloksykarboyl (Cbz) og substituert Cbz), alifatiske uretanbeskyttende grupper (for eksempel t-
- butyloksykarbonyl (Boc), isopropyloksykarbonyl, sykloheksyloksykarbonyl) og
- 25 alkyltype beskyttende grupper (for eksempel benzyl-trifenylmetyl), fluorenylmetyloksykarbonyl (Fmoc), allyloksykarbonyl (Alloc) og 1-(4,4-dimetyl-2,6-dioksosykloheks-1-yliden)etyl (Dde).
- De sidekjede beskyttende gruppene (vanligvis etere, estere, trityl, PMC og lignende)
- 30 forblir intakte i løpet av kobling og slippes ikke av i løpet av avbeskyttelsen av den aminoterminalen beskyttende gruppen eller i løpet av kobling. Den sidekjede beskyttende gruppen må være mulig å fjerne ved fullførelsen av syntesen av sluttpeptidet og under reaksjonsbetingelser som ikke vil forandre målpeptidet. De sidekjede beskyttende gruppene for Tyr inkluderer tetrahydropyranyl, tert-butyl, trityl, benzyl, Cbz, Z-Br-Cbz
- 35 og 2,5-diklorbenzyl. De sidekjede beskyttende gruppene for Asp inkluderer benzyl, 2,6-diklorbenzyl, metyl, etyl og sykloheksyl. De sidekjede beskyttende gruppene for Thr og

Ser inkluderer acetyl, benzoyl, trityl, tetrahydropyranyl, benzyl, 2,6-diklorbenzyl og Cbz. De sidekjedebeskyttende gruppene for Arg inkluderer nitro, tosyl (Tos), Cbz, adamantyloksykarbonylmesitoysulfonyl (Mts), 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), 4-metoksy-2,3,6-trimetylbenzensulfonyl (Mtr) eller Boc. De sidekjedebeskyttende gruppene for Lys inkluderer Cbz, 2-klorbenzyloksykarbonyl-(2-Cl-Cbz), 2-brombenzyloksykarbonyl-(2-Br-Cbz), Tos eller Boc.

Etter fjerning av den α -aminobeskyttende gruppen, blir de gjenværende beskyttede aminosyrene koblet trinnvis i den ønskede rekkefølge. Hver beskyttet aminosyre reagerer vanligvis i ca. et 3-gangers overskudd ved å anvende en passende karboksylgruppeaktivator slik som 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HBTU) eller disykloheksylkarbodiimid (DCC) i løsning, for eksempel i metylenklorid (CH_2Cl_2), N-metylpyrrolidon, dimetylformamid (DMF) eller blandinger av dem.

Etter at den ønskede aminosyresekvensen er fullført, blir det ønskede peptidet koblet fra resinstøtten ved behandling med et reagens slik som trifluoreddiksyre (TFA) eller hydrogenfluorid (HF), som ikke bare kløyver peptidet fra resinen, men som også kløyver alle de gjenværende sidekjedebeskyttende gruppene. Når en klormetylert resin anvendes så resulterer hydrogenfluoridbehandling i dannelsen av de frie peptidsyrene. Når benzhydrylaminresinet anvendes, så resulterer hydrogenfluoridbehandling direkte i det frie peptidamidet. Alternativt, når den klormetylerte resinen brukes, så kan det sidekjedebeskyttede peptidet kobles fra ved behandling av peptidresinet med ammoniakk for å gi det ønskede sidekjedebeskyttede amid eller med en alkylamin for å gi en sidekjedebeskyttet alkylamid eller dialkylamid. Sidekjedebeskyttelse ble så fjernet på den vanlige måten med behandling med hydrogenfluorid for å gi de frie amidene, alkylamidene eller dialkylamidene.

Når esterene i oppfinnelsen tillages, så blir resinene som anvendes for å lage peptidsyrene anvendt, og det sidekjedebeskyttede peptidet blir kløyvet med base og den passende alkoholen (for eksempel metanol). Sidekjedebeskyttende grupper blir så fjernet på den vanlige måten ved behandling med hydrogenfluorid for å skaffe tilveie den ønskede esteren.

Disse prosedyrer kan også anvendes for å syntetisere peptider hvor aminosyrer forskjellige fra de 20 naturlig forekommende genetisk kodede aminosyrene blir substituert ved en, to eller flere posisjoner i enhver av forbindelsene i oppfinnelsen. Syntetiske aminosyrer som kan substitueres i peptidene i den foreliggende oppfinnelsen
 5 inkluderer, men er ikke begrenset til, N-metyl, L-hydroksypropyl, L-3, 4-dihydroksyfenylalanyl, δ -aminosyrer slik som L- δ -hydroksylsyl og D- δ -metylalanyl, L- α -metylalanyl, β -aminosyrer og isokinolyl. D-aminosyrer og ikke-naturlig forekommende syntetiske aminosyrer kan også inkorporeres inn i peptidene i den foreliggende oppfinnelsen.

10

Peptidmodifikasjoner

Man kan også modifisere de amino og/eller karboksyterminale endene av peptidforbindelsene i oppfinnelsen til å produsere andre forbindelser i oppfinnelsen. For eksempel så kan den aminoterminalen enden acetyleres med eddiksyre eller et
 15 halogenert derivat av den slik som α -kloreddiksyre, α -bromeddiksyre eller α -jodeddiksyre.

Man kan erstatte de naturlig forekommende sidekjedene til de 20 genetisk kodede aminosyrene (eller de stereoisomere D-aminosyrene) med andre sidekjer, for
 20 eksempel med grupper slik som alkyl, lavere alkyl, sykliske 4-, 5-, 6 til 7-medlemmers alkyl, amid, amid lavere alkyl, amid di(lavere alkyl), lavere alkoksy, hydroksy, karboksy og de lavere esterderivatene av dem, og med 4-, 5-, 6- til 7-medlemmers heterosykliske. Spesielt så kan prolinanaloger hvor ringstørrelsen av prolinresidiet er forandre fra 5 medlemmer til 4, 6 eller 7 medlemmer benyttes. Sykliske grupper kan
 25 være mettet eller umettet, og hvis de er umettet, kan de være aromatiske eller ikke-aromatiske. Heterosykliske grupper inneholder helst et eller flere nitrogen, oksygen og/eller svovelheteroatomer. Eksempler på slike grupper inkluderer furazanyl, furyl, imidazolidinyl, imidazolyl, imidazoliny, isotiazolyl, isoksazolyl, morfolinyl (for eksempel morfolin), oksazolyl, piperazinyl (for eksempel 1-piperazinyl), piperidinyl
 30 (for eksempel 1-piperidyl, piperidino), pyranyl, pyrazinyl, pyrazolidinyl, pyrazolinyl, pyrazolyl, pyridazinyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyrrolidinyl (for eksempel 1-pyrrolidinyl), pyrrolinyl, pyrrolyl, tiadiazolyl, tiazolyl, tienyl, tiomorfolinyl (for eksempel tiomorfolin) og triazolyl. Disse heterosykliske grupper kan være substituerte eller ikke-substituerte. Der hvor en gruppe er substituert så kan substituenten være alkyl, alkoksy, halogen, oksygen eller substituert eller ikke-substituert fenyl.

35

Man kan også lett modifisere peptider ved hjelp av fosforylering og andre fremgangsmåter (for eksempel som beskrevet i Hruby, et al. (1990) Biochem J. 268:249-262).

- 5 Peptidforbindelsene i oppfinnelsen tjener også som strukturelle modeller for ikke-peptidlignende forbindelser med lignende biologisk aktivitet. Fagfolk vil forstå at en rekke teknikker er tilgjengelig for å konstruere forbindelser med den samme eller lignende ønsket biologisk aktivitet som leder peptidforbindelsen, men med mer gunstig aktivitet enn lederen med hensyn til løselighet, stabilitet og mottagelighet for hydrolyse
10 og proteolyse (se Morgan og Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252). Disse teknikker inkluderer å erstatte peptidryggraden med en ryggrad sammensatt av fosfonater, amidater, karbamater, sulfonamider, sekundære aminer og N-metylaminosyrer.

15 *Dannelse av disulfidbindinger*

Forbindelsene i den foreliggende oppfinnelse inneholder to intramolekylære disulfidbindinger. Slike disulfidbindinger kan dannes ved hjelp av oksidering av cysteinresidene til hver peptidmonomer.

- 20 I en utførelsesform så blir kontrollen av cysteinbindingsdannelse utført ved å velge et oksiderende middel av typen og konsentrasjon som er effektiv for å optimalisere dannelsen av den ønskede isomeren. For eksempel så blir oksidering av en peptiddimer til å danne to intramolekylære disulfidbindinger (en av hver peptidkjede) helst oppnådd (over dannelsen av intermolekyldisulfidbindinger) når det oksiderende middelet er
25 DMSO eller jodin (I₂).

- I andre utførelsesformer så er dannelsen av cysteinbindinger kontrollert ved den selektive anvendelsen av tiolbeskyttende grupper i løpet av peptidsyntese. For eksempel der hvor en dimer med to intramolekyl disulfidbindinger er ønsket, så blir den
30 første monomerpeptidkjeden syntetisert med de to cysteinresidene i kjernesekvensen beskyttet med en første tiolbeskyttende gruppe (for eksempel trityl(Trt), allyloksykarbonyl (Alloc) og 1-(4,4-dimetyl-2,6-dioksosekloheks-1-yliden)etyl (Dde) eller lignende), deretter så blir det andre monomere peptidet syntetisert med to cysteinresidier i kjernesekvensen beskyttet med en andre tiolbeskyttende gruppe som er
35 forskjellig fra den første tiolbeskyttende gruppen (for eksempel acetamidometyl (Acm), t-butyl (tBu) eller lignende). Deretter blir de første tiolbeskyttende gruppene fjernet og

påvirker bisulfidsykliseringen av den første monomeren og deretter blir de andre tiolbeskyttende gruppene fjernet og påvirker bisulfidsykliseringen av den andre monomeren.

- 5 Andre utførelsesformer i denne oppfinnelse tilveiebringer analoger av disse disulfidderivatene hvor en av svovelene er blitt erstattet av en CH₂-gruppe eller andre isoter for svovel. Disse analogene kan lages fra forbindelser i den foreliggende oppfinnelsen hvor hver peptidmonomer inneholder minst en C eller homocysteinresidie og en α -amino- γ -smørsyre i stedet for det andre C-residiet, via intramolekyl eller
10 intermolekylutsikiftning, ved å anvende fremgangsmåter som er kjent i fagfeltet (se for eksempel Barker, et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048 og Or, et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149). En fagperson vil lett forstå at denne utskifting også kan finnes sted ved å anvende andre homologer av α -amino- γ -smørsyre og homocystein.
- 15 I tillegg til de foregående sykliseringsstrategier, så kan andre ikke-disulfidpeptid sykliseringsstrategier anvendes. Slike alternative sykliseringsstrategier inkluderer for eksempel amidsykliseringsstrategier så vel som de som involverer dannelsen av tioeterbindinger. Forbindelsene i den foreliggende oppfinnelsen kan dermed eksistere i en syklisert form med enten en intermolekyl amidbinding eller en intramolekyl
20 tioeterbinding. For eksempel så kan et peptid syntetiseres hvor et cystein i kjernesekvensen er erstattet med lysin og det andre cystein er erstattet med glutaminsyre. Deretter så kan en syklisk monomer dannes gjennom en amidbinding mellom sidekjedene av disse to residier. Alternativt så kan et peptid syntetiseres, hvor et cystein i kjernesekvensen blir erstattet med lysin (eller serin). En syklisk monomer
25 kan så dannes gjennom en tioeterbinding mellom sidekjedene til lysin (eller serin) residiet og det andre cysteinresidiet i kjernesekvensen. I tillegg til disulfidsykliseringsstrategier, så kan amidsykliseringsstrategier og tioetersykliseringsstrategier begge lett anvendes for å syklisere forbindelsene i den foreliggende oppfinnelsen. Alternativt så kan den aminoternale enden av peptidet
30 kappes med en α -substituert eddiksyre, hvor α -substituenten er en avgangsgruppe, slik som en α -haloeddiksyre, for eksempel α -kloreddiksyre, α -bromeddiksyre eller α -jodeddiksyre.

Tilleggelsen av forgrenet tertiær amidlinker

- 35 Peptidmonomere kan dimeriseres ved en forgrenet tertiær amidlinkerenhet. I en utførelsesform så blir linkeren inkorporert inn i peptidet under peptidsyntesen. Hvor en

linker L_K -enhet inneholdt to funksjonelle grupper som er i stand til å tjene som initieringssteder for peptidsyntese og en eller flere andre funksjonelle grupper (for eksempel en karboksylgruppe eller en aminogruppe) som muliggjør binding til en eller flere andre molekylenheter, så kan for eksempel linkeren konjugeres til en fast støtte.

- 5 Deretter så kan to peptidmonomerer som syntetiseres direkte på de to reaktive nitrogengruppene av linker L_K -enheten i en variasjon av den faste fase synteseteknikken.

- I alternative utførelsesformer så kan linkeren konjugeres til de to peptidmonomerene i
 10 en peptiddimer etter peptidsyntese. Slik konjugering kan oppnås ved hjelp av fremgangsmåter som er godt etablert i fagfeltet. I en utførelsesform så inneholder linkeren to funksjonelle grupper som er passende for festing til de målfunksjonelle gruppene til de syntetiserte peptidmonomerene. For eksempel så kan en linker som inneholder to karboksylgrupper, enten preaktivert eller i nærværet av et passende
 15 koblingsreagens, reagere med mållysin sidekjedeaminogruppene til hver av de to peptidmonomerene.

For eksempel så kan peptidmonomeren bli kjemisk koblet til den tertiære amidlinkeren,



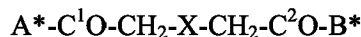
hvor:

- 25 X er $NCO-(CH_2)_2-NH-Y$ og Y er en passende beskyttende gruppe, slik som en t-butyloksykarbonyl (Boc)-beskyttende gruppe;

- A^* er en passende funksjonell gruppe, slik som N-oksylsuksinimid, anvendt for å konjugere C^1 i linkeren til ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet i den første peptidmonomeren; og

- 30 B^* er en passende funksjonell gruppe, slik som N-oksylsuksinimid anvendt for å konjugere C^2 til linkeren til ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet i den andre peptidmonomeren.

- 35 I tillegg så kan for eksempel peptidmonomeren bli kjemisk koblet til den tertiære amidlinkeren,



hvor:

5

X er $NCO-(CH_2)_2-NH-C^3O-$;

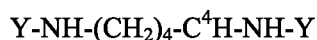
A^* er en passende funksjonell gruppe slik som N-oksysuksinimid, anvendt for å konjugere C^1 i linkeren til ϵ -aminogruppen til det C-terminale lysinresidiet til den første peptidmonomeren; og

10

B^* er en passende funksjonell gruppe, slik som N-oksysuksinimid, anvendt for å konjugere C^2 til linkeren til den ϵ -aminogruppen til den C-terminale lysinresidien til den andre peptidmonomeren; og

15

den tertiære amidlinkeren er kjemisk bundet til spacerenheten,



20 hvor:

C^3 i X er kovalent bundet til C^4 i spaceren; og

Y er en passende beskyttende gruppe slik som en t-butyloksykarbonyl (Boc) beskyttende gruppe.

25

Tillegging av lysinlinker

Peptidmonomerene kan dimeriseres ved en lysinlinker L_K -enhet. I en utførelsesform så blir lysinlinkeren inkorporert inn i peptid under peptidsyntesen. Hvor en lysinlinker L_K -enhet inneholder to funksjonelle grupper som er i stand til å tjene som initieringsseter for peptidsyntese og en tredje funksjonell gruppe (for eksempel en karboksylgruppe eller en aminogruppe) som muliggjør binding til en annen molekylenhet, så kan for eksempel linkeren konjugeres til en fast støtte. Deretter så kan de to peptidmonomerene syntetiseres direkte på de to reaktive nitrogengruppene til lysinlinker L_K -enheten i en variasjon av den faste fase synteseteknikken.

35

I alternative utførelsesformer hvor en peptiddimer dimeriseres ved hjelp av en lysinlinker L_K -enhet så kan nevnte linker konjugeres til de to peptidmonomerene i en peptiddimer etter peptidsyntese. Slik konjugering kan oppnås ved hjelp av fremgangsmåter som er godt etablerte i fagfeltet. I en utførelsesform så inneholder

5 linkerens minst to funksjonelle grupper som er passende for festing de målfunksjonelle gruppene til de syntetiserte peptidmonomerene. For eksempel så kan lysinets to frie aminogrupeer reagere med de C-terminale karboksylgruppene til hver av to peptidmonomerer.

Tillegging av spacer

10 Peptidforbindelsen i oppfinnelsen omfatter videre en spacerenhet. I en utførelsesform så kan spaceren inkorporeres inn i peptidet under peptidsyntese. Hvor en spacer inneholder en fri aminogruppe og en andre funksjonell gruppe (for eksempel en karboksylgruppe eller en aminogruppe) som muliggjør binding til annen molekyl enhet, så kan for eksempel spaceren konjugeres til den faste støtten.

15 I en utførelsesform så blir en spacer som inneholder to funksjonelle grupper fast koblet til den faste støtten via en første funksjonell gruppe. Deretter så blir lysinlinker L_K -enheten som har to funksjonelle grupper som er i stand til å tjene som initierings seter for peptidsyntese og en tredje funksjonell gruppe (for eksempel en karboksylgruppe

20 eller en aminogruppe) som muliggjør binding til en annen molekyl enhet konjugert til spaceren via spacerens andre funksjonelle gruppe og linkerens tredje funksjonelle gruppe. Deretter så kan de to peptidmonomerene syntetiseres direkte på de to reaktive nitrogengruppene til linker L_K -enheten i en variasjon av den faste fasesynteseteknikken. For eksempel så kan en fast støtte koblet spacer med en fri aminogruppe reagere med en

25 lysinlinker via linkerens frie karboksylgruppe.

I alternative utførelsesformer så kan spaceren konjugeres til peptiddimeren etter peptidsyntese. Slik konjugering kan oppnås ved hjelp av fremgangsmåter som er godt etablert i fagfeltet. I en utførelsesform så inneholder linkerens minst en funksjonell

30 gruppe som er passende for festing til den målfunksjonelle gruppen til det syntetiserte peptidet. For eksempel så kan en spacer med en fri aminogruppe reagere med et peptids C-terminale karboksylgruppe. I et annet eksempel så kan en linker med en fri hydroksylgruppe reagere med den frie aminogruppen til en lysinamid.

35 *Festing av polyetylen glykol (PEG)*

I de siste årene så har vannløselige polymerer slik som polyetylenglykol (PEG), blitt anvendt for den kovalente modifiseringen av peptider med terapeutisk og diagnostisk viktighet. Festing av slike polymerer antas å øke biologisk aktivitet, forlenget sirkulasjonstid i blod, redusere immungenisiteten, øke vandig løselighet og øke resistens mot proteasekutting. For eksempel så har kovalent festing av PEG til terapeutiske polypeptider slik som interleukiner (Knauf et al. (1988) J. Biol. Chem. 262:15064; Tsutsumi et al. (1995) J. Controlled Release 33:447), interferoner (Kita et al. (1990) Drug Des. Delivery 6:157), katalase (Abuchowski et al. (1977) J. Biol. Chem. 252:582), superoksiddismutase (Beauchamp, et al. (1983) Anal. Biochem. 131:25) og adenosindeaminase (Chen, et al. (1981) Biochim. Biophys. Acta (660:293), blitt rapportert å forlenge halveringstiden deres in vivo og/eller redusere deres immunogenisitet og antigensitet.

Peptidforbindelsene i oppfinnelsen kan omfatte en polyetylenglykol (PEG) enhet, som er kovalent festet til den forgrenede tertiære amidlinkeren eller spaceren til peptiddimeren via en karbamatkobling eller en via en amidkobling. Et eksempel på PEG som er anvendt i den foreliggende oppfinnelsen er lineær, uforgrenet PEG som har en molekylvekt på ca. 20 kiloDaltons (20K) til ca. 40K (uttrykket "ca" indikerer at i preparater med PEG så vil noen molekyler veier mer og noen mindre enn den stadfestede molekylvekten). Helst så har PEG en molekylvekt på ca. 30K til ca. 40K.

Et annet eksempel på PEG anvendt i den foreliggende oppfinnelsen er lineær PEG som har en molekylvekt på ca. 10K til ca. 60K (uttrykket "ca" indikerer at i fremstillinger av PEG så vil noen molekyler veier mer og noen mindre enn den stadfestede molekylvekten). Helst så har PEG en molekylvekt på ca. 20 til ca. 40K. Mer ønskelig så har PEG en molekylvekt på ca. 20K.

Eksempler på fremgangsmåter for kovalent festing av PEG (PEGylering) er beskrevet under. Disse illustrative beskrivelsene er ikke ment å være begrensende. En fagperson vil forstå at en rekke fremgangsmåter for kovalent festing av en rekke PEG er godt etablert i fagfeltet. Peptidforbindelser som PEG er blitt festet til ved hjelp av en rekke festende fremgangsmåter som er kjent i fagfeltet er omfattet av den foreliggende oppfinnelsen.

For eksempel så kan PEG være kovalent festet til linkeren via en reaktiv gruppe som et aktivert PEG-molekyl kan være bundet til (for eksempel en fri aminogruppe eller

karboksylgruppe). PEG-molekyler kan være festet til aminogrupper ved å anvende metoksyliert PEG ("mPEG") som har forskjellige reaktive enheter. Slike polymerer inkluderer mPEG-suksinimylsuksinat, mPEG-suksinimidylkarbonat, mPEG-imidat, mPEG-4-nitrofenylkarbonat og mPEG-cyanurinsyreklorid. På samme måte så kan

5 PEG-molekyler festet til karboksylgrupper ved å anvende metoksyliert PEG med en fri amingruppe (mPEG-NH₂).

I noen utførelsesformer så inneholder linkeren eller spaceren en terminal aminogruppe (dvs. posisjonert i den terminale enden av spaceren). Denne terminale aminogruppe kan

10 reagere med et passende aktivert PEG-molekyl slik som mPEG-para-nitrofenylkarbonat (mPEG-NPC), for å lage en stabil kovalent karbamatbinding. Alternativt kan denne terminale aminogruppe reagere med et passende aktivert PEG-molekyl slik som en mPEG-suksinimidylbutyrat (mPEG-SBA) eller mPEG-suksinimidylpropionat (mPEG-SPA) som inneholder en reaktiv N-hydroksylsuksinimid (NHS)-gruppe, for å lage en

15 stabil, kovalent karbamatbinding. I andre utførelsesformer så inneholder den linkerreaktive gruppen en karboksylgruppe som er i stand til å bli aktivert for å danne en kovalent binding med et amininneholdende PEG-molekyl under passende reaksjonsbetingelser. Passende PEG-molekyler inkluderer mPEG-NH₂ og passende reaksjonsbetingelser inkluderer karbodiimid-styrt amiddannelse eller lignende.

20

EPO-R-agonistaktivitetsanalyser:

In vitro-funksjonelle analyser

In vitro-kompetitive bindingsanalyser kvantiterer evnen et testpeptid har til å konkurrere med EPO for binding til EPO-R. For eksempel så kan (se for eksempel som beskrevet i

25 US patent nr. 5 773 569), det ekstracellulære domenet av det humane EPO-R (EPO-bindende protein, EBP) rekombinant produseres i *E. coli* og det rekombinante proteinet kan kobles til en fast støtte, slik som en mikrotiterplate eller en syntetisk kule (for eksempel sulfolink kuler fra Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)). Immobilisert EBP ble så innkubert med merket rekombinant EPO, eller med merket rekombinant EPO og

30 et testpeptid. Seriefortynninger av testpeptid blir anvendt for slike eksperimenter. Analysepunkter uten tilsatt testpeptid definerer total EPO-binding til EBP. For reaksjoner som inneholder testpeptid så blir mengden av bundet EPO kvantitert og uttrykt som en prosent av kontroll (total = 100%)-bindingen. Disse verdier er plottet mot peptidkonsentrasjon. IC₅₀-verdien er definert som konsentrasjon av testpeptid som

35 reduserer bindingen av EPO til EBP ved 50% (dvs. 50% hemming av EPO-binding).

En forskjellig in vitro-kompetitiv bindingsanalyse måler lyssignalet som genereres som en funksjon av nærheten til to kuler: en EPO-konjugert kule og en EPO-R-konjugert kule. Kulenærhet dannes ved bindingen av EPO til EPO-R. Et testpeptid som konkurrerer med EPO for binding til EPO-R vil forhindre denne binding, og forårsake
 5 en nedgang i lyseemisjon. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en 50% nedgang i lyseemisjon er definert som IC_{50} -verdien.

Peptidene i den foreliggende oppfinnelse konkurrerer veldig effektivt med EPO for binding til EPO-R. Denne forsterkede funksjon er representert ved deres evne til å
 10 hemme bindingen av EPO ved vesentlig lavere konsentrasjoner av peptid (dvs. de har veldig lave IC_{50} -verdier).

Den biologiske aktivitet og potens av monomere og dimere peptid EPO-R-agonister i oppfinnelsen, som binder spesifikt til EPO-reseptoren, kan måles ved å anvende in
 15 vitro-cellebaserte funksjonelle analyser.

En analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje som uttrykker humant EPO-R og som videre er transfektert med en fos-promoterdrevet luciferase reporterengenkonstruksjon. Ved eksponering for EPO eller en annen EPO-R-agonist responderer slike celler ved å
 20 syntetisere luciferase. Luciferase forårsaker emisjonen av lys ved tilsettelse av dets substratluciferin. Nivået av EPO-R-aktivering i slike celler kan dermed kvantiteres via måling av luciferaseaktivitet. Aktiviteten av et testpeptid blir målt ved å tilsette seriefortynninger av testpeptidet til cellene, som så innkuberes i 4 timer. Etter innkubering så blir luciferinsubstrat tilsatt til cellene og lyseemisjon blir målt.
 25 Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halv-maksimal emisjon av lys nedtegnes som EC_{50} .

Peptidene i den foreliggende oppfinnelsen viser dramatisk øket evne til å fremme EPO-R-signalleringsavhengig luciferase uttrykt i denne analysen. Denne forsterkede
 30 funksjon representeres ved deres evne til å gi halvparten av den maksimale luciferaseaktiviteten ved vesentlig lavere konsentrasjoner av peptid (dvs. at de har veldig lavere EC_{50} -verdier). Denne analyse er en foretrukket fremgangsmåte for å estimere potensen og aktiviteten til et EPO-R agonistpeptid i oppfinnelsen.

35 En annen analyse kan utføres ved å anvende FDC-P1/ER-celler (Dexter, et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047), en godt karakterisert ikke-transformert musebenmarg-

utledet cellelinje som EPO-R er blitt stabilt transfektert inn i. Disse cellene utviser EPO-avhengig proliferering.

I en slik analyse dyrkes cellene til halvveis stasjonær tetthet i nærvær av de nødvendige vekstfaktorene (se for eksempel som beskrevet i US patent 5 773 569). Cellene vaskes
 5 så i PBS og sultes i 16-24 timer i fullmedium uten vekstfaktorene. Etter å ha bestemt viabiliteten til cellene (for eksempel ved trypan blå farging), blir stock-løsninger (i fullmedium uten vekstfaktorene) laget til å gi ca. 10^5 celler per 50 μ l. Seriefortynninger av peptid EPO-R-agonistforbindelsene (vanligvis det frie løsningsfasepeptidet i
 10 motsetning til et fag-bundet eller på annen måte bundet eller immobilisert peptid) som skal testes blir laget i 96-brønners vevsdyrkningsplater i et sluttvolum på 50 μ l per brønn. Celler (50 μ l) blir tilsatt til hver brønn og cellene blir innkubert 24-48 timer, ved dette punktet bør de negative kontrollene dø eller være hvilende. Celleproliferering blir så målt ved hjelp av teknikker kjent i fagfeltet, slik som en MTT-analyse som måler H^3 -
 15 tymidininkorporering som en indikasjon for celleproliferering (se Mosmann (1983) J. Immunol. Methods 65:55-63). Peptider blir evaluert på både den EPO-R-uttrykkende cellelinjen og en parenteral ikke-uttrykkende cellelinje. Konsentrasjonen av testpeptid som er nødvendig for å gi halvparten av den maksimale celleprolifereringen blir nedfelt som EC_{50} .

20 Peptidene i den foreliggende oppfinnelsen viser dramatisk øket evne til å fremme EPO-avhengig cellevekst i denne analyse. Denne forsterkede funksjon er representert ved deres evne til å gi halvparten av den maksimale celleprolifereringsstimuleringsaktiviteten ved vesentlig lavere konsentrasjoner av peptid (dvs. de har veldig lavere EC_{50} -verdier).
 25 Denne analyse er en foretrukket fremgangsmåte for å estimere potensen og aktiviteten til et EPO-R-agonistpeptid i oppfinnelsen.

I en annen analyse blir celle dyrket til stasjonær fase i EPO-supplementert medium, høstet og deretter dyrket i enda 18 timer i medium uten EPO. Celle blir delt inn i 3
 30 grupper med lik celletetthet: en gruppe uten tilsatt faktor (negativ kontroll), en gruppe med EPO (positiv kontroll) og en eksperimentell gruppe med testpeptidet. De dyrkede cellene blir så samlet ved forskjellige tidspunkter, fiksert og farget med en DNA-bindende, fluorescerende farge (for eksempel propidiumjodid eller Hoechst farging, begge tilgjengelige fra Sigma). Fluorescens blir så målt for eksempel ved å anvende et
 35 FACS Scan Flow cytometer. Prosent celler i hver fase av cellyklusen kan så bestemmes for eksempel ved å anvende SOBR-modellen til CellFIT-software (Becton

Dickinson). Celler behandlet med EPO eller et aktivt peptid vil vise en høyere andel celler i S-fase (som bestemt ved øket fluorescens som en indikator på økt DNA-innhold) i forhold til den negative kontrollgruppen.

- 5 Lignende analyser kan utføres ved å anvende FDCP-1 (se for eksempel Dexter et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047) eller TF-1 (Kitamura et al. (1989) Blood 73:375-380) cellelinjer. FDCP-1 er en vekstfaktor avhengig musemultipotensiell primitiv hematopoietisk avkomstcellelinje som kan proliferere, men ikke differensiere, når den blir tilsatt WEHI-3-kondisjonert medium (medium som inneholder IL-3, ATCC nr. 10 TIB-68). For slike eksperimenter så blir FDCP-1-cellelinjen transfektert med det humane eller muse EPO-R for å produsere henholdsvis FDCP-1-hEPO-R eller FDCP-1-mEPO-R-cellelinjer som kan proliferere, men ikke differensiere i nærværet av EPO. TF-1, en EPO-avhengig cellelinje, kan også anvendes for å måle effektene av peptid EPO-R-agonister på cellulær proliferering.
- 15 I enda en annen analyse så kan prosedyren som er satt fram i Krystal (1983) Exp. Hematol 11:649-660 for en mikroanalyse basert på H^3 -tymidininkorporering inn i miltceller benyttes for å sikre evnen av forbindelsene i den foreliggende oppfinnelsen krav til å tjene som EPO-agonister. I korthet så blir B6C3F₁-mus injisert daglig i 2 dager med fenylydrazin (60 mg/kg). På den tredje dagen så blir miltcellene fjernet og 20 deres evne til å proliferere i løpet av en 24-timers periode fastslått ved å anvende en MTT-analyse.

- Bindingen av EPO til EPO-R i en erythropoietinresponsiv cellelinje induserer tyrosinfosorylering for både reseptoren og flere intracellulære proteiner, inkludert Shc, 25 vav og JAK2-kinase. Derfor så måler en annen in vitro-analyse evnen peptidene i oppfinnelsen har til å indusere tyrosinfosorylering på EPO-R og nedstrøms intracellulær signaloverføringsproteiner. Aktive peptider, identifisert ved bindings- og prolifereringsanalyser beskrevet over, utviser et fosforyleringsmønster som nesten er identisk til mønsteret til EPO i erythropoietinresponsive celler. For denne analyse så blir 30 FDC-P1/ER-celler (Dexter, et al. (1980) J Exp Med 152:1036-47) opprettholdt i EPO-supplementert medium og vekst til stasjonær fase. Disse celler ble så dyrket i medium uten EPO i 24 timer. Et definert antall slike celler ble så innkubert med testpeptid i ca. 10 min ved 37°C. En kontrollprøve med celler med EPO ble også kjørt med hver analyse. De behandlede cellene blir så høstet ved sentrifugering, resuspendert i SDS- 35 lysisbuffer og utsatt for SDS polyakrylamid gelelektroforese. De elektroforiserte proteinene i gelen ble overført til nitrocellulose, og de fosfotyrosininnholdende

proteinene på blottet ble visualisert ved hjelp av standard immunologiske teknikker. Blottet kan for eksempel probes med et anti-fosfotyrosin antistoff (for eksempel muse-anti-fosfotyrosin IgG fra Upstate Biotechnology, Inc.), vasket og deretter probet med et sekundært antistoff (for eksempel peroksidasemerket geite-anti-mus IgG fra Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)). Deretter så kan fosfotyrosininneholdende proteiner visualiseres ved hjelp av standardteknikker inkludert kolorimetriske, kjemiluminiscens eller fluorescerende analyser. For eksempel kan en kjemiluminiscensanalyse utføres ved å anvende ECL Western Blotting Systemet fra Amersham.

En annen cellebasert in vitro-analyse som kan anvendes for å undersøke aktiviteten av peptidene i den foreliggende oppfinnelsen er en kolonianalyse, som anvender musebenmarg eller humane, perifere blodceller. Musebenmarg kan skaffes til veie fra lårbeinet hos mus, mens en prøve humant, perifert blod kan skaffes tilveie fra en frisk donor. I tilfellet med perifert blod så blir mononukleære celler først isolert fra blodet, for eksempel ved sentrifugering gjennom en Ficoll-Hypaque gradient (Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)). For denne analyse så blir en telling av kjerner utført for å etablere antallet og konsentrasjonen av celler med kjerner i den originale prøven. Et definert antall celler blir platet på metylcellulose ifølge produsentens instruksjoner (Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)). En eksperimentell gruppe blir behandlet med et testpeptid, en positiv kontrollgruppe blir behandlet med EPO og en negativ kontrollgruppe mottar ikke behandling. Antallet voksende kolonier for hver gruppe blir så talt etter definerte perioder med innkubering, vanligvis 10 dager og 18 dager. Et aktivt peptid vil fremme kolonidannelse.

Andre in vitro-biologiske analyser som kan anvendes for å demonstrere aktiviteten av forbindelsene i den foreliggende oppfinnelsen er utlevert i Greenberger et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935 (EPO-avhengig hematopoietisk avkomst cellelinje), Quelle og Wojchowski (1991) J. Biol. Chem. 266:609-614 (proteintyrosinfosforylering i B6Sut.EP-celler); Dusanter-Fourt, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:10670-10678 (tyrosinfosforylering av EPO-reseptor i humane EPO-responsive celler); Quelle et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:17055-17060 (tyrosinfosforylering av et cytosolisk protein, pp 100 i FDC-ER-celler); Worthington, et al. (1987) Exp. Hematol. 15:85-92 (kolorimetrisk analyse for hemoglobin); Kaiho og Miuno (1985) Anal. Biochem. 149:117-120 (deteksjon av hemoglobin med 2,7-diaminofluoren); Patel et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:21300-21302 (uttrykk av c-

myb); Witthuhn, et al. (1993) Cell 74:227-236 (assosiering og tyrosinfosforylering av JAK2); Leonard, et al. (1993) Blood 82:1071-1079 (ekspresjon av GATA-transkripsjonsfaktorer); og Ando, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9571-9575 (regulering av G₁-trasisjon ved syklende D2 og D3).

5

Et instrument designet av Molecular Devices Crop., kjent som et mikrofysiometer, har vært rapportert å være vellykket for anvendelse for måling av effekten av agonister og antagonist på forskjellige reseptorer. Basisen for dette apparat er målingen av forandringene i surgjøringsgraden av det ekstracellulære mediet som respons for reseptoraktivering.

10

In vivo-funksjonelle analyser

En in vivo-funksjonell analyse som kan anvendes for å undersøke potensen til et testpeptid er den polycytemiske ekshypoksiske musebioanalysen. For denne analyse blir mus utsatt for en alternerende betingelsesyklus i flere dager. I denne syklus så alternerer musene mellom perioder med hypobare betingelser og omgivelsesstrykk betingelser. Deretter blir musene opprettholdt ved omgivelsestrykk i 2-3 dager før administrering av testprøver. Testpeptidprøver eller EPO-standard i tilfeller med positiv kontrollmus blir injisert subkutan inn i de kondisjonerte musene. Radiomerket jern (for eksempel Fe⁵⁹) ble gitt 2 dager senere, og blodprøver ble tatt 2 dager etter administrering av radioaktivt merket jern. Hemoatokritt og radioaktive målinger ble så bestemt for hver blodprøve ved hjelp av standard teknikker. Blodprøver fra mus injisert med aktive testpeptider vil vise større radioaktivitet (som skyldes binding av Fe⁵⁹ av erythrocythemoglobin) enn mus som ikke mottok testpeptider eller EPO.

20

25

En annen in vivo-funksjonell analyse som kan anvendes for å undersøke potensen til et testpeptid er retikulocyttanalysen. For denne analyse så blir normale ubehandlede mus subkutan injisert på tre etterfølgende dager med enten EPO eller testpeptid. På den tredje dagen blir musene også intraperitonealt injisert med jerndekstran. På dag fem blir blodprøver samlet fra musene. Prosenten (%) av retikulocytter i blodet blir bestemt ved tiazol oransjefarging og flowcytometeranalyse (retic-telleprogram). I tillegg blir hematokritt manuelt bestemt. Prosenten av korrigerte retikulocytter ble bestemt ved å anvende den følgende formelen:

30

35

$$\%RETIC_{korrigert} = \%RETIC_{observert} \times (\text{hematokritt}_{\text{individuell}} / \text{hematokritt}_{\text{normal}})$$

Aktive testforbindelser vil vise en øket %RETIC_{korrigert}-nivå i forhold til mus som ikke mottok testpeptider eller EPO.

Anvendelse av EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen

- 5 Peptidforbindelsene i oppfinnelsen er nyttige in vitro som redskaper for å forstå den biologiske rollen til EPO, inkludert evalueringen av de mange faktorene trodd å influere og bli influert av produksjonen av EPO og bindingene av EPO til EPO-R (for eksempel mekanismen for EPO/EPO-R-signaltransduksjon/reflektoraktivering). De foreliggende peptidene er også nyttige for utviklingen av andre forbindelser som binder seg til EPO-
10 R fordi de foreliggende forbindelser tilveiebringer viktig struktur-aktivitetforholdsinformasjon som fasiliterer den utvikling.

- Basert på deres evne til å binde til EPO-R så kan videre peptidene i den foreliggende oppfinnelsen anvendes som reagenser for å detektere EPO-R på levende celler; fikserte
15 celler; i biologiske væsker; i vevshomogenater; i rensede, naturlige biologiske materialer; osv. Ved å merke slike peptider så kan man for eksempel identifisere celler som har EPO-R på deres overflater. Basert på deres evne til å binde EPO-R så kan i tillegg peptidene i den foreliggende oppfinnelsen anvendes i in situ-farging, FACS (fluorescensaktivert celledatering) analyse, Western blotting, ELISA (enzymkoblet
20 immunsorbent analyse) osv. Basert på deres evne til å binde til EPO-R så kan i tillegg peptidene i den foreliggende oppfinnelsen anvendes i reseptorrensing, eller i å rense celler som uttrykker EPO-R på deres overflate (eller innsiden av permeabiliserte celler).

- Peptidene i oppfinnelsen kan også benyttes som kommersielle reagenser for forskjellige medisinske forsknings og diagnostiske former. Slike anvendelser kan inkludere, men er ikke begrenset til:

- (1) anvendelse som en kalibreringsstandard for å kvantitere aktiviteter av kandidat EPO-R-agonister i en rekke funksjonelle analyser;
- 30 (2) anvendelse som blokkeringsreagenser i tilfeldig peptidscreening, dvs. ved å se etter nye familier med EPO-R-peptidligander, så kan peptidene anvendes til å blokkere gjenvinnelse av EPO-peptider i den foreliggende oppfinnelsen;

- (3) anvendelse i ko-krystallisering med EPO-R, dvs. krystaller av peptidene i den foreliggende oppfinnelsen bundet til EPO-R kan dannes, og muliggjør bestemmelse av reseptor/peptidstruktur ved hjelp av røntgenkrystallografi;
- 5 (4) anvendelse for å måle kapasiteten erytrocyttforløperceller har til å indusere globinsyntese og hem-komplekssyntese, og til å øke antallet ferritinreseptorer, ved å initiere differensering;
- (5) anvendelse for å opprettholde prolifereringen og veksten av EPO-avhengige
10 cellelinjer, slik som FDCP-1-mEPO-R og TF-1-cellelinjene;
- (6) anvendelse relatert til å merke peptidene i oppfinnelsen med en radioaktiv kromofor; og
- 15 (7) annen forsknings og diagnostisk benyttelse hvor EPO-R helst aktiveres eller hvor slik aktivering med letthet kan kalibreres mot en kjent kvantitet av en EPO-R-agonist og lignende.

I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen så blir fremgangsmåter for å
20 behandle og produsere et medikament tilveiebrakt. Peptidforbindelser i oppfinnelsen kan gis til varmblodige dyr, inkludert mennesker, for å stimulere bindingen av EPO til EPO-R in vivo. Den foreliggende oppfinnelsen omfatter dermed fremgangsmåter for terapeutisk behandling av forstyrrelser assosiert med en mangel på EPO, disse fremgangsmåter omfatter å gi et peptid av oppfinnelsen i mengder som er tilstrekkelig
25 til å stimulere EPO-R og dermed forbedre symptomene som er assosiert med en mangel på EPO in vivo. For eksempel så vil peptidene i denne oppfinnelsen finne anvendelse i behandlingen av nyreutilstrekkelighet og/eller terminalstadium for nyrefeil/dialyse; anemi assosiert med AIDS; anemi assosiert med kroniske inflammatoriske sykdommer (for eksempel reumatoid artritt og kronisk bowel inflammasjon) og autoimmun sykdom;
30 og for å booste det røde blodcelleantallet til en pasient før kirurgi. Andre sykdomstilstander, forstyrrelser og tilstander med hematologisk irregularitet som kan behandles ved å gi peptidene i denne oppfinnelse inkluderer: β -talassemi; cystisk fibrose; graviditet og menstruelle forstyrrelser; tidlig anemi til prematuritet; ryggmargsskade; romfart; akutt blodtap, aldring; slag, iskemi (både CNS og hjerte); og
35 forskjellige neoplastiske sykdomstilstander som følges av unormal erytropoiese.

I andre utførelsesformer så kan peptidforbindelsene i oppfinnelsen anvendes for behandlingen av forstyrrelser som ikke er karakterisert ved lave eller manglede røde blodceller, for eksempel som en forbehandling før transfusjoner. I tillegg så kan administrering av forbindelsene i denne oppfinnelse resultere i en nedgang i

5 blødningstid og dermed i den finne anvendelse i administreringen til pasienten før kirurgi eller for indikasjoner hvor blødning er forventet å finne sted. I tillegg så vil forbindelsene i denne oppfinnelse finne anvendelse i aktiveringen av megakaryocytter.

Fordi EPO har vært vist å ha en mitogen og kjemotaktisk effekt på vaskulære

10 endotelceller, så vel som en effekt på sentrale kolinerge neuroner (se for eksempel Amagnostou, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5978-5982 og Konishi, et al. (1993) Brain Res. 609:29-35) så vil forbindelsene i denne oppfinnelse også finne anvendelse for behandlingen av en rekke vaskulære forstyrrelser, slik som: å fremme sårheling; og fremme vekst av kolatterale, koronare blodkar (slik som de som kan finne

15 sted etter hjerteinfarkt); traumebehandling; og postvaskulær podedbehandling. Forbindelsene i denne oppfinnelse vil også finne anvendelse for behandlingen av en rekke neurologiske forstyrrelser, generelt karakterisert ved lave absoluttnivåer av acetylkolin eller lave relative nivåer av acetylkolin sammenlignet med andre neuroaktive substanser, for eksempel neurotransmitter.

20

Farmasøytiske sammensetninger

I enda et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen så blir farmasøytiske sammensetninger av de ovenfor nevnte EPO-R-agonist peptidforbindelsene tilveiebrakt.

25 Tilstander som forbedres eller moduleres ved administreringen av slike sammensetninger inkluderer de som er indikert over. Slike farmasøytiske sammensetninger kan være for administrering ved orale, parenterale (intramuskulær, intraperitoneal, intravenøs (IV) eller subkutan injeksjon), transdermale (enten passivt eller ved å anvende iontoforese eller elektroporering), transmukosale (nasal, vaginal,

30 rektal eller sublingual) ruter for administrering eller ved å anvende bionedbrytbare innskudd og kan formuleres i doseformer som er passende for hver administreringsrute. Omfattet av oppfinnelsen er vanligvis farmasøytiske sammensetninger som omfatter effektive mengder av et EPO-R-agonistpeptid eller derivatprodukter, av oppfinnelsen sammen med farmasøytisk akseptable fortynnere, konserveringsmidler, oppløsere,

35 emulgatorer, adjuvanter og/eller bærere. Slike sammensetninger inkluderer fortynnere med forskjellig bufferinnhold (for eksempel Tris-HCl, acetat, fosfat), pH og ionestyrke;

tilleggsstoffer slik som detergenter og oppløsningsmidler (for eksempel Tween 20, Tween 80, Polysorbat 80), anti-oksideranter (for eksempel askorbinsyre, natriummetabisulfitt); konserveringsmidler (for eksempel Timersol, benzylalkohol) og fuktsvellingssubstanser (for eksempel laktose, mannitol); inkorporering av materiale i bestemte preparater med polymere forbindelser slik som polymelkesyre, polyglykolsyre osv. eller inn i liposomer. Hylauronsyre kan også anvendes. Slike sammensetninger kan influere den fysikalske tilstanden, stabiliteten, hastigheten for in vivo-frigjøring og hastigheten for in vivo-rensing av de foreliggende proteinene og derivatene. Se for eksempel Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) sidene 1435-1712. Sammensetningene kan lages i flytende form eller de kan være i tørt pulver (for eksempel lyofilisert) form.

Oral levering

Overveid for anvendelse her er orale, faste doseringsformer som er beskrevet generelt i Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. utg. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA 18042) i kapittel 89. Faste doseringsformer inkluderer tabletter, kapsler, piller, trokeer eller sugetabletter, "cacheer", pelleter, pulvere eller granulater. Liposomale eller proteinlignende innkapslinger kan også anvendes for å formulere de foreliggende sammensetningene (som for eksempel proteinoide mikrosferer rapportert i US patentnr. 4 925 673). Liposomale innkapslinger kan anvendes og liposomene kan være utledet med forskjellige polymerer (for eksempel US patentnr. 5 013 556). En beskrivelse av mulige faste doseringsformer for terapeutikaene er gitt av Marshall, K. i: *Moderen Pharmaceutics* utgitt av G.S. Banker og C.T. Rhodes, kap. 10, 1979. Generelt vil formuleringen inkludere EPO-R-agonistpeptidene (eller kjemisk modifiserte former av dem) og uaktive ingredienser som tillater beskyttelse mot mageomgivelsen, og frigjør det biologisk aktive materialet i tarmen.

Også overveid for anvendelse her er flytende doseringsformer for oral administrering, inkludert farmasøytisk akseptable emulsjoner, løsninger, suspensjoner og siruper, som kan inneholde andre komponenter inkludert ikke-aktive fortynnere; adjuvanter slik som bløtemidler, emulgatorer og suspenderingsmidler; og søtnings, smaks og luktnmidler.

Peptidene kan være kjemisk modifisert slik at oral levering av derivatet er effektivt. Den kjemiske modifikasjonen som er overveid er generelt festingen av minst en enhet til komponentmolekylet i seg selv, hvor nevnte enhet tillater (a) å hemme proteolyse; og (b) opptak i blodstrømmen fra magen eller tarmen. Også ønsket er økningen i den totale

stabiliteten av komponenten eller komponentene og økning i sirkulasjonstid i kroppen. Som diskutert over så er PEGylering en foretrukket, kjemisk modifisering for farmasøytisk anvendelse. Andre enheter som kan anvendes inkluderer: propylenglykol, kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol, karboksymetylcellulose, dekstran,
 5 polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, polyprolin, poly-1,3-dioksolan og poly-1,3,6-tioksokan (se for eksempel Abuchowski og Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" i Enzymes as Drugs. Hocenberg og Roberts, red. (Wiley-Interscience: New York, NY) s. 367-383; og Newark, et al. (1982) J. Appl Biochem. 4:185-189).

- 10 For orale formuleringer så kan lokaliseringen for frigjøring være magen, tynntarmen (duodenum, jejunum eller ileum), eller tykktarmen. En fagperson har tilgjengelig formuleringer som ikke vil løse seg i magen, men vil heller frigjøre materialet i duodenum eller andre steder i tarmen. Helst så vil frigjøringen unngå de skadelige effektene til magemiljøet enten ved å beskytte peptidet (eller derivater) eller ved å
 15 frigjøre peptidet (eller derivater) etter magemiljøet, slik som i tarmen.

For å sikre full mageresistens så er en overtrekking som er impermeabel for minst pH 5,0 essensiell. Eksempler på flere vanlige ikke-aktive ingredienser som anvendes som enteriske overtrekkinger er celluloseacetattrimellitat (CAT),
 20 hydroksypropylmetylcelluloseftalat (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, polyvinylacetatftalat (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, celluloseacetatftalat (CAP), Eudragit L, Eudragit S og Shellac. Disse overtrekningene kan anvendes som blandede filmer.

- 25 En overtrekking eller en blanding av overtrekninger kan også anvendes på tabletter som ikke er ment som beskyttelse mot magen. Disse kan inkludere sukkerovertrekninger, eller overtrekninger som gjør tabletten lettere å svelge. Kapsler kan bestå av et hardt skall (slik som gelatin) for levering av tørr terapeutika (dvs. pulver), for flytende former så kan et myk gelatinskall anvendes. Skallmaterialet til "cacheer" kunne være tykk
 30 stivelse eller annet spisbart papir. For piller, sugetabletter, støpte tabletter eller tabletriturater, så kan fuktig masseteknikker anvendes.

Peptidet (eller derivatet) kan inkluderes i formuleringen som fine multipartikler i formen av granulater eller pelleter med partikkelstørrelse på ca. 1 mm. Formuleringen
 35 av materialet for kapseladministrering kunne også være som et pulver, lett kompresserte plugger og selv som tabletter. Disse terapeutika kunne lages ved kompresjon.

Fargestoffer og/eller smaksmidler kan også inkluderes. For eksempel så kan peptidet (eller derivater) formuleres (slik som ved liposom eller mikrosfer innkapsling) og deretter videre plasseres innen et spisbart produkt, slik som en nedkjølt drikk som
5 inneholder fargestoffer smaksmidler.

Man kan fortynne eller øke volumet av peptidet (eller derivatet) med et ikke-aktivt materiale. Disse fortynnere kunne inkludere karbohydrater, spesielt mannitol, α -laktose, anhydrert laktose, cellulose, sukrose, modifiserte dekstraner og stivelse.
10 Visse uorganiske salter kan også anvendes som fyllstoff, inkludert kalsiumtrifosfat, magnesiumkarbonat og natriumklorid. Noen kommersielt tilgjengelige fortynnere er Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress and Avicell.

Disintegranter kan inkluderes i formuleringen av terapeutikaene til en fast
15 doseringsform. Materialer anvendt som disintegranter inkluderer, men er ikke begrenset til stivelse, inkludert den kommersielle disintegranten basert på stivelse, Explotab. Natriumstivelsesglykolat, Amberlite, natriumkarboksymetylcellulose, ultramylopektin, natriumalginat, gelatin, oransje skall, sur karboksymetylcellulose, naturlig svamp og bentonitt kan alle anvendes. Disintegrantene kan også være uløselige kationiske
20 utbyttingsresiner. Pulveriserte gummier kan anvendes som disintegranter og som bindere og kan inkludere pulveriserte gummier slik som agar, Karaya og tragakant. Alginsyre og dets natriumsalt er også nyttig som disintegranter. Bindere kan anvendes for å holde peptid (eller derivat)-middelet sammen for danne en hard tablett og å inkludere materialer for naturlige produkter slik som akasia, tragakant,
25 stivelse og gelatin. Andre inkluderer metylcellulose (MC), etylcellulose (EC) og karboksymetylcellulose (CMC). Polyvinylpyrrolidon (PVP) og hydroksypropylmetylcellulose (HPMC) kunne begge anvendes i alkoholløsninger for å granulere peptidet (eller derivatet).

30 Et anti-sklimiddel kan inkluderes i formuleringen av peptidet (eller derivatet) for å hindre klistring i løpet av formuleringsprosessen. Smøremidler kan anvendes som et lagt mellom peptidet (eller derivatet) og "die" vegg, og disse kan inkludere, men er ikke begrenset til; stearinsyre inkludert magnesium- og kalsiumsalter, polytetrafluoretylen (PTFE), flytende parafin, vegetabiliske oljer og vokser. Løselige smøremidler kan også
35 anvendes slik som natriumlaurylsulfat, magnesiumlaurylsulfat, polyetylglykol med forskjellige molekylvekter, Karbovoks 4000 og 6000.

Glidemidler som kan forbedre strømningsegenskapene av medikamentet i løpet av formulering og for å hjelpe rearrangement i løpet av kompresjon kan tilsettes. Glidemidlene kan inkludere stivelse, talkum, pyrogent silika og hydrert silikoaluminat.

5

- For å hjelpe til med oppløsningen av peptidet (eller derivatet) i det vandige miljøet så kan et overflateaktivt stoff tilsettes som et bløtgjøringsmiddel. Overflateaktive stoffer kan inkludere anioniske detergenter slik som natriumlaurylsulfat, dioktylnatriumsulfosuksinat og dioktylnatriumsulfonat. Kationiske detergenter kan anvendes og kunne inkludere benzalkoniumklorid eller benzetiomiumklorid. Listen av potensielle ikke-ioniske detergenter som kunne inkluderes i formuleringen som overflateaktive stoffer er leuromakrogol 400, polyoksyl 40 stearat, polyoksyetylenhydrogenert kastorolje 10, 50 og 60, glyserolmonostearat, polysorbat 20, 40, 60, 65 og 80, sukkrosefettysreester, metylcellulose og karboksymetylcellulose.
- Disse overflateaktive stoffene kunne være tilstede i formuleringen av proteinet eller derivatet enten alene eller som en blanding i forskjellige forhold.

15

Tilleggsstoffer som potensielt øker opptak av peptidet (eller derivatet) er for eksempel fetttsyrene oleinsyre, linoleinsyre og linolensyre.

20

- Kontrollerte frigjørings oralformuleringer kan være ønskelig. Peptidet (eller derivatet) kunne inkorporeres inn i en uvirksom matriks som tillater frigjøring ved enten diffusjon eller lekkemekanismer, for eksempel gummier. Langsomt degenererende matrikser kan også inkorporeres inn i formuleringen. Noen enteriske overtrekninger har også en forsinket frigjøringseffekt. En annen form for en kontrollert frigjøring er ved hjelp av en fremgangsmåte basert på det Oros-terapeutiske systemet (Alza Corp.), dvs. medikamentet er innelukket i en semipermeabel membran som tillater at vann kommer inn og dytter medikamentet ut gjennom en liten smal åpning som skyldes osmotiske effekter.

25

30

- Andre overtrekninger kan anvendes for formuleringen. Disse inkluderer en rekke sukkere som kunne påføres i en overtrekningspanne. Peptidet (eller derivatet) kunne også bli gitt en fillovertrukket tablett og materialene anvendt i dette tilfellet er delt i to grupper. Den første er de ikke-enteriske materialene og inkluderer metylcellulose, etylacellulose, hydroksyetylcellulose, metylhydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose,

35

natriumkarboksymetylcellulose, povidon og polyetylenglykoler. Den andre gruppen består av de enteriske materialene som vanligvis er estere av ftalinsyre.

- En blanding av materialer kan anvendes for å tilveiebringe den optimale
 5 filmovertrekkingen. Filmovertrekking kan utføres i en panneovertrekker eller i et fluidisert pulverbad eller ved kompresjonsovertrekking.

Parenteral levering

- Preparater ifølge denne oppfinnelse for parenteral administrering inkluderer sterile,
 10 vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner eller emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsninger eller verktøy er propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabiliske oljer slik som olivenolje og maisolje, gelatin og injiserbare organiske estere slik som etyloleat. Slike doseringsformer kan også inneholde adjuvanter slik som konserveringsmidler, bløtgjøringsmidler, emulgatorer, og fordelingsmidler. De kan for
 15 eksempel steriliseres ved filtrering gjennom et filter som holder tilbake bakterier, ved å inkorporere steriliseringsmidler inn i sammensetningen, ved å bestråle sammensetningene, eller ved å varme opp sammensetningene. De kan også produseres ved å anvende sterilt vann eller noe annet sterilt injiserbart medium, rett før anvendelse.

20 *Rektal eller vaginal levering*

Sammensetninger for rektal eller vaginal administrering er helst stikkpiller som kan inneholde i tillegg til den aktive substansen, bindemidler slik som kakaosmør og en stikkpillevoks. Sammensetninger for nasal eller sublingual administrering ble også laget med standard bindemidler som er velkjent i fagfeltet.

25 *Lungelevering*

- Også overveid her er lungelevering for EPO-R-agonistpeptidene (eller derivatene av dem). Peptidet (eller derivater) blir levert til lungene hos et pattedyr mens det inhalerer og krysser over lungeepitelet som ligger inntil blodstrømmen (se for eksempel Adjei, et al. (1990) *Pharmaceutical Research* 7:565-569; Adjei, et al. (1990) *Int. J. Pharmaceutics*
 30 63:135-144 (leuprolidacetat); Braquet, et al. (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13(sup5):143-146 (endotelin-1); Hubbard, et al. (1989) *Annals of Internal Medicine*, vol. III, s. 206-212 (α 1-antitrypsin); Smith, et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α -1-proteinase); Oswein, et al. (1990) "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II* Heystone, Colorado (rekombinant humant veksthormon); Debs, et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferon- γ og tumornekrosefaktor α); og US patentnr. 5 284 656 til Platz, et al. (granulocyt

kolonistimulerende faktor). En fremgangsmåte og sammensetning for lungelevering av medikamenter for systemisk effekt er beskrevet i US patentnr. 5 451 569 til Wong, et al.

Overveid for anvendelse i utføringen av denne oppfinnelse er en rekke mekaniske
5 innretninger designet for lungelevering av terapeutiske produkter, inkludert, men ikke begrenset til støvere, dosert doseinhalatorer, og pulverinhalatorer, som alle er familiære for fagfolk. Noen spesifikke eksempler på kommersielt tilgjengelige innretninger som er passende for utførelsen av denne oppfinnelse er Ultravent forstøveren (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); Acorn II forstøveren (Marquest Medical Products, Englewood,
10 CO); Ventolindosert doseinhalator (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC) og Spinhaler pulverinhalatoren (Fisons Corp., Bedford, MA).

Alle slike innretninger krever anvendelsen av formuleringer som er passende for fordelingen av peptid (eller derivat). Vanligvis så er hver formulering spesifikk for
15 typen innretning som brukes og kan involvere anvendelsen av et passende drivstoff materiale, i tillegg til de vanlige fortynnerne, adjuvantene og/eller bærerne som er nyttige i terapi. Også anvendelsen av liposomer, mikrokapsler eller mikrosfærer, inklusjonskomplekser eller andre typer bærere er overveid. Kjemisk modifiserte peptider kan også lages i forskjellige formuleringer avhengig av typen kjemisk
20 modifikasjon eller typen innretning som brukes.

Formuleringer som er passende for anvendelse med en forstøver, enten jet eller ultrasonisk, vil vanligvis omfatte peptid (eller derivat) som er løst i vann ved en konsentrasjon på ca. 0,1 til 25 mg biologisk aktivt protein per ml løsning.
25 Formuleringen kan også inkludere en buffer og en enkel sukker (for eksempel for proteinstabilisering og regulering av osmotisk trykk). Forstøvningsformuleringen kan også inneholde et overflateaktivt stoff for å redusere og hindre overflateindusert aggregering av peptidet (eller derivatet) forårsaket av atomisering av løsningen når det dannes aerosol.

30 Formuleringer for anvendelse med en dosert doseinhalator innretning vil det vanligvis et fint oppdelt pulver som inneholder peptidet (eller derivatet) suspendert i et drivstoff ved hjelp av et overflateaktivt stoff. Drivstoffet kan være ethvert konvensjonelt materiale som bruke for dette formål, slik som en klorfluorkarbon, et hydroklorfluorkarbon, et
35 hydrofluorkarbon, eller et hydrokarbon inkludert triklorfluormetan, diklordifluormetan, diklortetrafluoretanol og 1,1,1,2-tetrafluoretan, eller kombinasjoner av dem. Passende

overflateaktive stoffer inkluderer sorbitantrioleat og soyalecitin. Oleinsyre kan også være nyttig som et overflateaktivt stoff.

Formuleringer for å fordele fra en pulverinhalatorinnretning vil omfatte et fint oppdelt
5 tørt pulver som inneholder peptid (eller derivat) og kan også inkludere et
fuktsvellingsmiddel, slik som laktose, sorbitol, sukrose eller mannitol i mengder som
fasiliterer fordeling av pulvere fra innretningen, dvs. 50 til 90 vekt% av formuleringen.
Peptidet (eller derivatet) bør mest fordelaktig være laget i partikulær form med en
gjennomsnittlig partikkelstørrelse på mindre enn 10 µm (eller mikron), mest ønskelig
10 0,5 til 5 µm, for mest effektiv levering til den distale lungen.

Nasal levering

Nasal levering av EPO-R agonistpeptidene (eller derivatene) er også overveid. Nasal
levering tillater passasjen av peptidet til blodstrømmen direkte etter administrering av
15 det terapeutiske produktet til nesen, uten nødvendigheten for deponering av produktet i
lungen. Formuleringer for nasal levering inkluderer de med dekstran eller
syklodekstran.

Doseringer

20 For alle peptidforbindelsene, ettersom videre studier blir utført, så vil informasjon
komme frem med hensyn på passende doseringsnivåer for behandling av forskjellig
betingelser i forskjellige pasienter, og vanlige fagpersoner, vil ved å betrakte den
terapeutiske sammenhengen, alderen og den generelle helsen til mottageren, være i
stand til å sikre passende dosering. Den valgte doseringen er avhengig av den ønskede
25 terapeutiske effekten, på administreringsruten, og på varigheten på av behandlingen
som er ønskelig. Generelle doseringsnivåer på 0,001 til 10 mg/kg kroppsvekt daglig
blir gitt til pattedyr. For intravenøs injeksjon eller infusjon så kan vanligvis dosen være
lavere. Doseringsskjemaet kan variere avhengig av halveringstiden i sirkulasjonen og
formuleringen som anvendes.

30

Peptidene i den foreliggende oppfinnelsen (eller deres derivater) kan gis i sammenheng
med en eller flere tilleggsaktive ingredienser eller farmasøytiske sammensetninger.

Eksempler

35 Den foreliggende oppfinnelsen blir nå beskrevet ved hjelp av de følgende eksemplene.
Anvendelsen av disse og andre eksempler, hvor som helst i spesifikasjonen er imidlertid

kun illustrative, og på ingen måte begrensende for omfanget og betydningen av oppfinnelsen eller av noen eksemplifisert form. På samme måte så er oppfinnelsen ikke begrenset til noe bestemt foretrukket utførelsesform som er beskrevet her. Mange modifikasjoner og variasjoner av oppfinnelsen kan faktisk være tydelig for fagfolk ved
 5 å lese denne spesifikasjonen, og kan gjøres uten å avvike fra dens ånd og omfang. Oppfinnelsen er derfor begrenset bare til vilkårene i de vedlagte kravene, sammen med det fulle omfanget av ekvivalenter som kravene er berettiget til.

Eksempel 1: Syntese av EPO-R-agonistpeptiddimerer ved fastfasesyntese

10

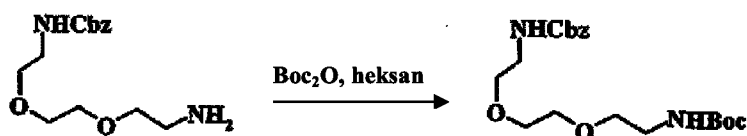
Trinn 1 – Syntese av Cbz-TAP:

En løsning som inneholder det kommersielt tilgjengelige diaminet ("TAP" fra Aldrich Chemical Co.) (10 g, 67,47 mmol) i anhydrert DCM (100 ml) ble nedkjølt til 0°C. En løsning med benzyklorformat (4,82 ml, 33,7 mmol) i anhydrert DCM (50 ml) ble tilsatt
 15 langsomt gjennom en dryppetrakt i løpet av en periode på 6-7 timer, temperaturen av reaksjonsblandingen ble opprettholdt ved 0°C gjennom hele tiden, deretter ble reaksjonsblandingen varmet opp til romtemperatur (~25°C). Etter enda 16 timer ble DCM fjernet under vakuum og det gjenværende fordelt mellom 3N HCl og eter. De vandige lagene ble samlet og nøytralisert med 50% aq. NaOH til pH 8-9 og ekstrahert
 20 med etylacetat. Etylacetatlaget ble tørket over anhydrert Na₂SO₄, deretter konsentrert under vakuum for å tilveiebringe det råe mono-Cbz-TAP (5 g, ca. 50% utbytte). Denne forbindelse ble anvendt i den neste reaksjonen uten videre rensing.



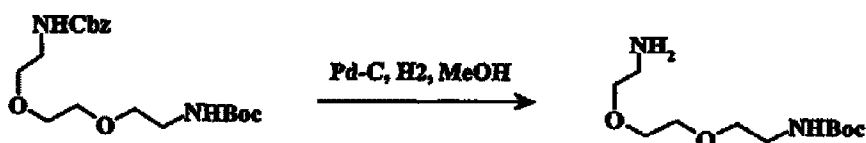
25 Trinn 2 – Syntese av Cbz-TAP-Boc:

Til en veldig rørt suspensjon av Cbz-TAP (5 g, 17,7 mmol) i heksan (25 ml) ble det tilsatt Boc₂O (3,86 g, 17,7 mmol) og suspensjonen rørte videre ved rt over natt. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med DCM (25 ml) og vasket med 10% aq. sitronsyre (2 x), vann (2 x) og saltløsning. Det organiske laget ble tørket over anhydrert Na₂SO₄
 30 og konsentrert under vakuum. Det råe produktet (utbytte 5 g) ble anvendt direkte i den neste reaksjonen.



Trinn 3 – Syntese av Boc-TAP:

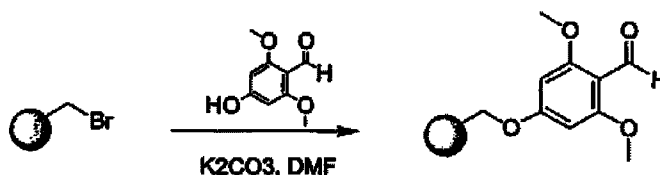
Det råe produktet fra den tidligere reaksjonen ble løst i metanol (25 ml) og hydrogenert i nærvær av 5% Pd på karbon (5% w/W) under ballongtrykk i 16 timer. Blandingen ble
 5 filtrert, vasket med metanol og filtratet konsentrert in vacuo for å tilveiebringe det råe H-TAP-Boc-produktet (utbytte 3,7 g). Det totale cirka produktet av Boc-TAP etter Trinnene 1-3 var 44% (beregnet basert på mengde Cbz-Cl som var anvendt).



10 Trinn 4- Syntese av TentaGel-linker:

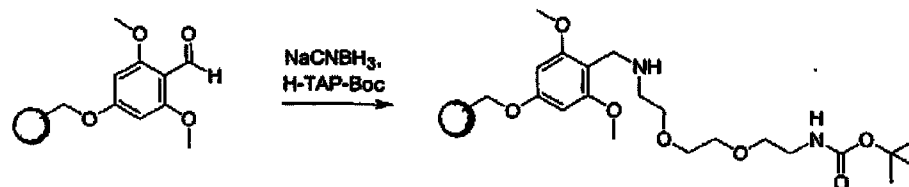
TentaGelbromid (2,5 g, 0,48 mmol/g, fra Rapp-polymer (Tyskland), fenollinker (5 ekvivalent og K_2CO_3 (5 ekvivalent) ble blandet i 20 ml DFM til 70°C i 14 timer. Etter nedkjøling til romtemperatur ble resinet vasket (0,1 N HCl, vann, ACN, DMF, MeOH) og tørket for å gi en ravfarget resin.

15



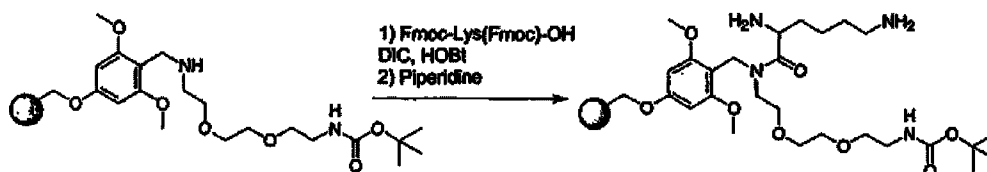
Trinn 5 – Syntese av TentaGel-linker-TAP(Boc):

2,5 g av resinet ovenfor og H-TAP-Boc (1,5 g, 5 ekv.) og is-AcOH (34 μ l, 5 ekv.) ble tatt i en blanding på 1:1 MeOH-THF og ristet over natt. En 1M løsning av
 20 natriumcyanborhydrid (5 ekv.) i THF ble tilsatt til dette og ristet i enda 7 timer. Resinet ble filtrert, vasket (DMF, THF, 0,1 N HCl, vann, MeOH) og tørket. En liten mengde av resinet ble benzoylert med Bz-Cl og DIEA i DCM og kløyyvet med 70% TFA-DCM og sjekket ved LCMS og HPLC.



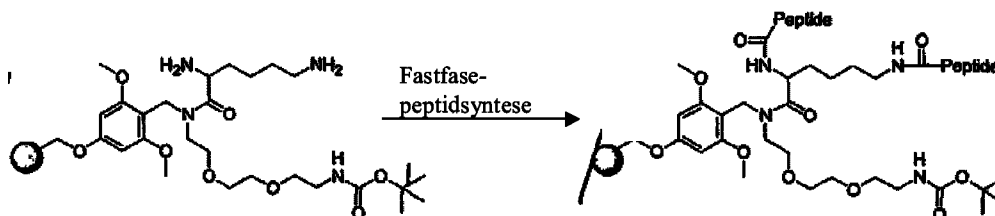
Trinn 6 – Syntese av TentaGel-linker-TAP-Lys:

Resinet ovenfor ble behandlet med en aktivert løsning av Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (laget fra 5 ekv. aminosyre og 5 ekv. HATU løst ved 0,5M i DMF, etterfulgt av tilsetning av 10 ekv. DIEA) og fikk lov til forsiktig å riste i 14 timer. Resinet ble vasket (DMF, THF, DCM, MeOH) og tørket for å gi det beskyttede resinet. Gjenværende amingrupper ble kappet ved å behandle resinet med en løsning av 10% eddikanhydrid, 20% pyridin i DCM i 20 minutter, etterfulgt av vasking som over. Fmoc-gruppene ble fjernet ved forsiktig risting av resinet i 30% piperidin i DMF i 20 minutter, etterfulgt av vasking (DMF, THF, DCM, MeOH) og tørking.



Trinn 7 – Syntese av TentaGel-Linker-TAP-Lys(Peptid)₂:

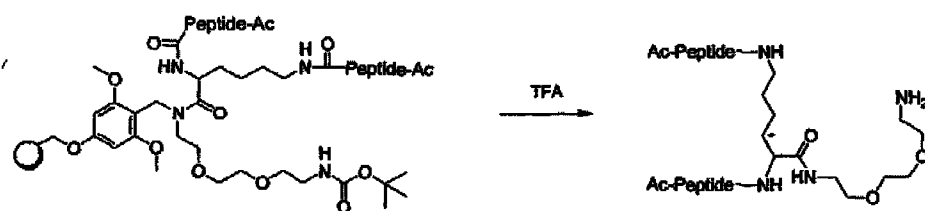
Resinet ovenfor ble utsatt for repeterte sykluser med Fmoc-aminosyrekoblinger med HBTU/HOBt-aktivering og Fmoc-fjerning med piperidin for å bygge begge peptidkjedene samtidig. Dette ble lett utført på en ABI 433 automatisert peptidsyntesemaskin tilgjengelig fra Applied Biosystems, Inc. Etter at den siste Fmoc ble fjernet, så ble de terminale amingrupperne acylert med eddikanhydrid (10 ekv.) og DIEA (20 ekv.) i DMF i 20 minutter, etterfulgt av vasking som over.



Trinn 8 – Kløyving fra resin:

Resinet ovenfor ble suspendert i en løsning med TFA (82,5%), fenol (5%), etanditiol (2,5%), vann (5%) og tioanisol (5%) i 3 timer ved romtemperatur. Alternative kløvyngscoctailer slik som TFA (95%), vann (2,5%) og triisopropylsilan (2,5%) kan også anvendes. TFA-løsningen ble nedkjølt til 5°C og helt inn i Et₂O for å presipitere

5 peptidet. Filtrering og tørking under redusert trykk ga det ønskede peptidet. Rensing via preparativ HPLC med en C18-kolonne ga det rene peptidet.



Trinn 9 – Oksidering av peptider for å danne intramolekyl disulfidbindinger:

10 Peptiddimeren ble løst i 20% DMSO/vann (1 mg tørr vekt peptid/ml) og fikk lov til å stå ved romtemperatur i 36 timer. Peptidet ble renset ved å lade reaksjonsblandingen på en C18-HPLC-kolonne (Waters Delta-Pak C18, 15 mikron partikkelstørrelse, 300 ångstrøm porestørrelse, 40 mm x 200 mm lengde), etterfulgt av en lineær ACN/vann/0,01% TFA-gradient fra 5 til 95% ACN i løpet av 40 minutter. Lyofilisering

15 av fraksjonene som inneholdt det ønskede peptidet ga produktet som et fluffy, hvitt faststoff.



Dimert peptid (XYZ) som inneholder
reduserte cysteinresidier

Dimert peptid (XYZ) som inneholder
oksiderte disulfidbindinger

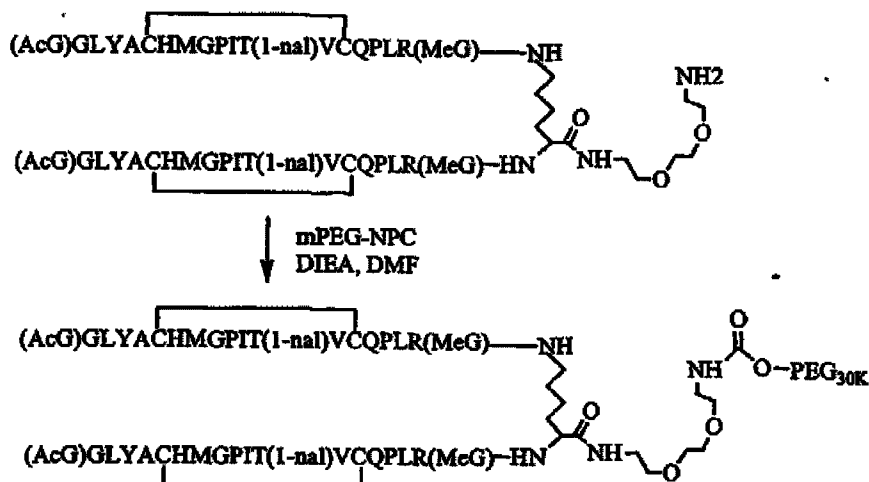
20

Trinn 10 – PEGylering av den terminale –NH₂-gruppen:

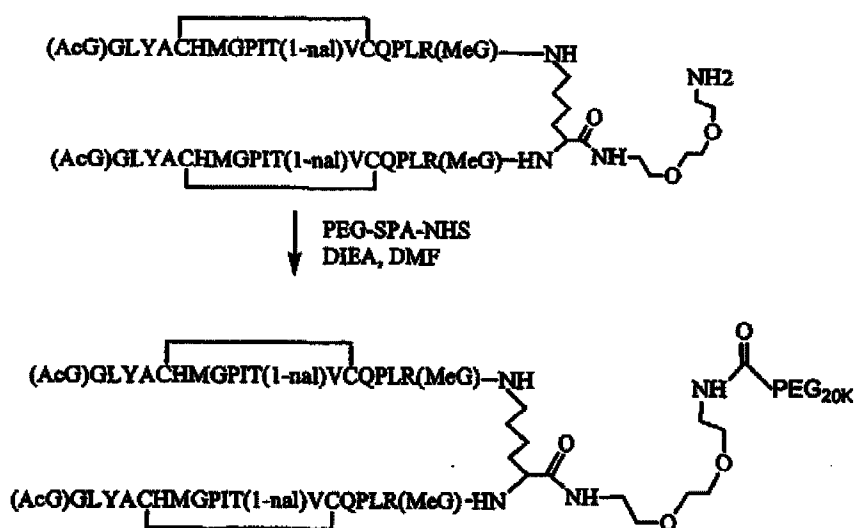
PEGylering via en karbamatbinding: Peptiddimeren ble blandet med 1,5 ekv. (mol-basis) aktiverte PEG-typer (mPEG-NPC fra NOF Corp. Japan) i tørr DMF for å få en

25 klar løsning. Etter 5 minutter så ble 4 ekv. DIEA tilsatt til den ovenfor nevnte løsning. Blandingen ble rørt ved omgivelsestemperatur i 14 timer, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid ble bekreftet ved MALDI-masse. Det

rensede peptidet ble også utsatt for rensing via kationer utbyttekromatografi som skissert under.



- 5 **PEGylering via en amidbinding:** Peptiddimeren blir blandet med 1,5 ekv. (mol-basis) av 1 ekv. aktivert PEG-type (PEG-SPA-NHS fra Shearwater Corp, USA) i tørr DMF for å få en klar løsning. Etter 5 minutter ble 10 ekv. DIEA tilsatt til den ovenfor nevnte løsning. Blandingen ble rørt ved omgivelsestemperatur i 2 timer, etterfulgt av rensing med C18-reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid ble bekreftet ved MALDI-masse. Det rensede peptid ble også utsatt for rensing via kationer utbyttekromatografi som skissert under:



Trinn 11 – Ionebytterensing:

Flere utbyttstøtter ble overveid for deres evne til å separere det ovenfor nevnte peptid-PEG-konjugatet fra ikke-reagert (eller hydrolysert) PEG, i tillegg til deres evne til å bevare de startende dimere peptidene. Ionebytteresin (2-3 g) ble ladet på en 1 cm

5 kolonne etterfulgt av omdannelsen til natriumformen (0,2 N NaOH ladet på kolonne inntil eluatet var pH 14, ca. 5 kolonnevolumer), og deretter til hydrogenformen (eluert med enten 0,1 N HCl eller 0,1 M HOAc inntil eluatet tas ladnings-pH, ca. 5 kolonnevolumer), etterfulgt av vasking med 25% ACN/vann inntil pH 6. Enten så ble peptidet før konjugering eller peptid-PEG-konjugatet løst i 25% ACN/vann (10 mg/ml)

10 og pH justert til <3 med TFA og deretter ladet på kolonnen. Etter vasking med 2-3 kolonnevolumer 25% ACN/vann og oppsamling av 5 ml fraksjoner, ble peptidet frigjort fra kolonnen ved eluering med 0,1 M NH₄OAc i 25% ACN/vann, igjen oppsamling av 5 ml fraksjoner. Analyse via HPLC avslørte hvilke fraksjoner som inneholdt det ønskede peptid. Analyse med en Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) indikerte at når

15 peptidet blir holdt igjen på kolonnen og ble eluert med NH₄OAc-løsningen (vanligvis mellom fraksjonene 4 og 10) så ble ikke noe ikke-konjugert PEG observert som en kontaminant. Når peptidet ble eluert i den initielle vaskebufferen (vanligvis de første 2 fraksjonene), ble ingen separasjon av ønsket PEG-konjugat og overskudd PEG observert.

20

De følgende kolonnene holdt vellykket igjen både peptidet og peptid-PEG-konjugatet, og rensset vellykket peptid-PEG-konjugatet fra det ikke-konjugerte peptidet:

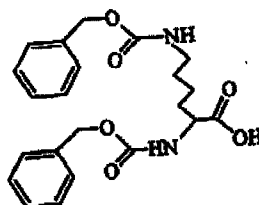
Tabell 1: Ionebytteresiner

Støtte	Kilde
Mono S HR 5/ sterk kationutbyttet pre-ladet kolonne	Amersham Biosciences
SE53 Cellulose, mikrogranulær sterk kationutbytte støtte	Whatman
SP Sefarose raskt strømming sterkt kationutbytte støtte	Amersham Biosciences

25

Eksempel 2: Syntese av EPO-R agonistpeptiddimerer ved fragmentkondensering**Trinn 1 – Syntese av (Cbz)₂-Lys:**

Lysin reagerer under standard betingelser med en løsning av benzyklorformat for å skaffe tilveie lysin beskyttet ved sine to aminogrupeer med en Cbz-gruppe.



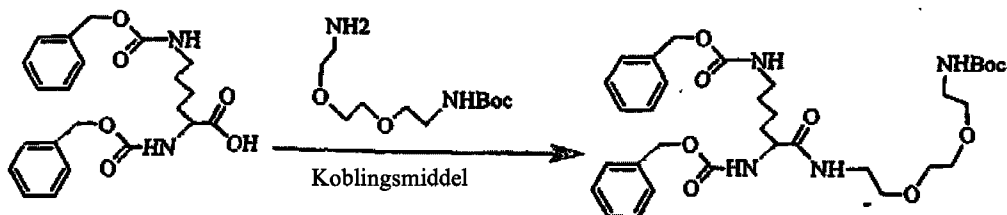
5 Trinn 2 – Syntese av Boc-TAP:

Boc-TAP er syntetisert som beskrevet i Trinnene 1 til 3 i Eksempel 1.

Trinn 3 – Kobling av (Cbz)₂-Lys og Boc-TAP:

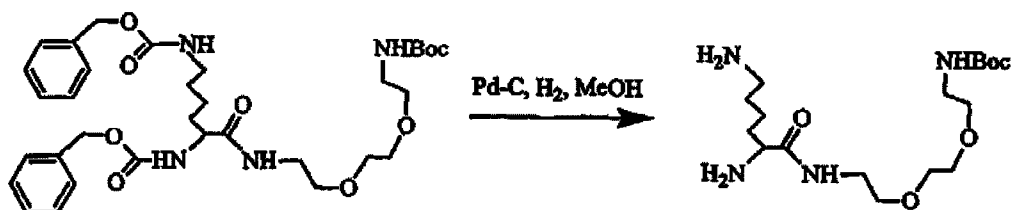
(Cbz)₂-Lys og Boc-TAP blir koblet under standard koblingsbetingelser for å skaffe

10 tilveie (Cbz)₂-Lys-TAP-Boc.



Trinn 4 – Lys-TAP-Boc:

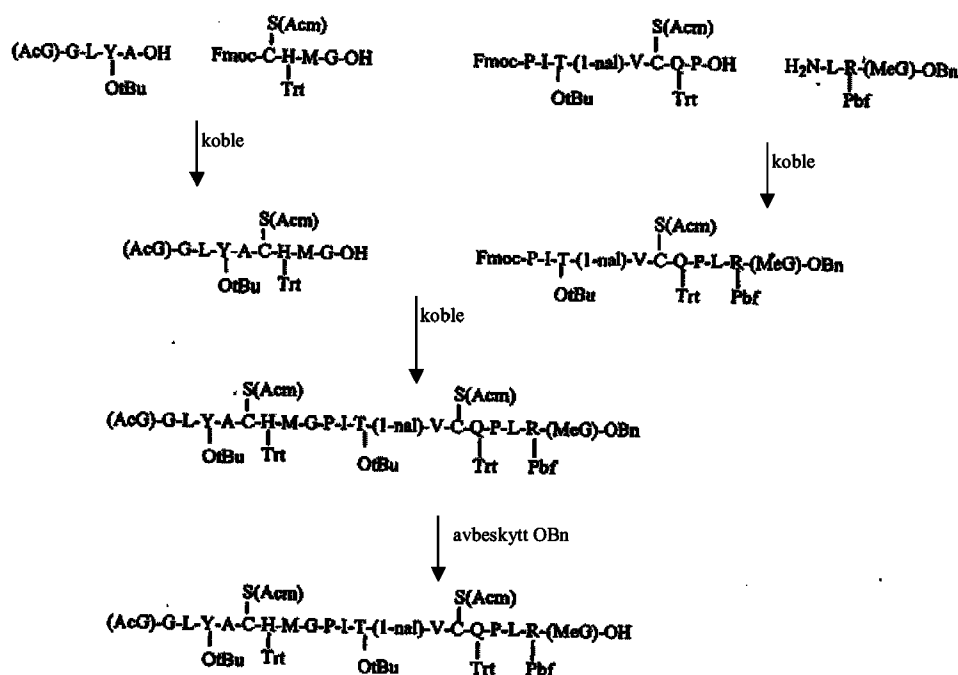
Det rå produktet fra den tidligere reaksjonen blir løst i metanol (25 ml) og hydrogenert i nærvær av 5% Pd på karbon (5% w/W) under ballongtrykk i 16 timer. Blandingen blir filtrert, vasket med metanol og filtratet konsentrert in vacuo for å tilveiebringe det rå Lys-TAP-Boc-produktet.



20 Trinn 5 – Syntese av peptidmonomerer ved fragmentkondensering:

Fire peptidfragmenter av peptidmonomersekvensen blir syntetisert ved hjelp av standard teknikker. Disse delvis beskyttede fragmentene ble så utsatt for to uavhengige runder med kobling. I den første runden så blir den N-terminale halvdelen av monomeren

dannet ved å koble av peptidfragmentene, mens den C-terminale halvdelene av monomeren blir dannet ved å koble de andre to peptidfragmentene. I den andre koblingsrunden så blir de N-terminale og C-terminale halvdelene koblet for å danne den fullstendig beskyttede monomeren. Monomeren blir så OBn-avbeskyttet ved hjelp av standard teknikker.



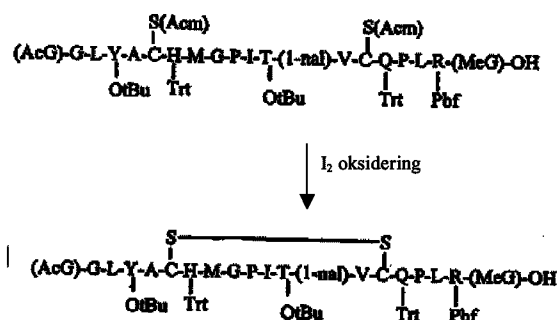
10

Trinn 6 – Oksidering av peptidmonomerer for å danne intermolekyl disulfidbindinger:

De OBn-avbeskyttede, kondenserte peptidmonomerene ble så oksidert med under jodid til å danne intermolekylidisulfidbindinger mellom de Acm-beskyttede cysteinresidiene til monomerene.

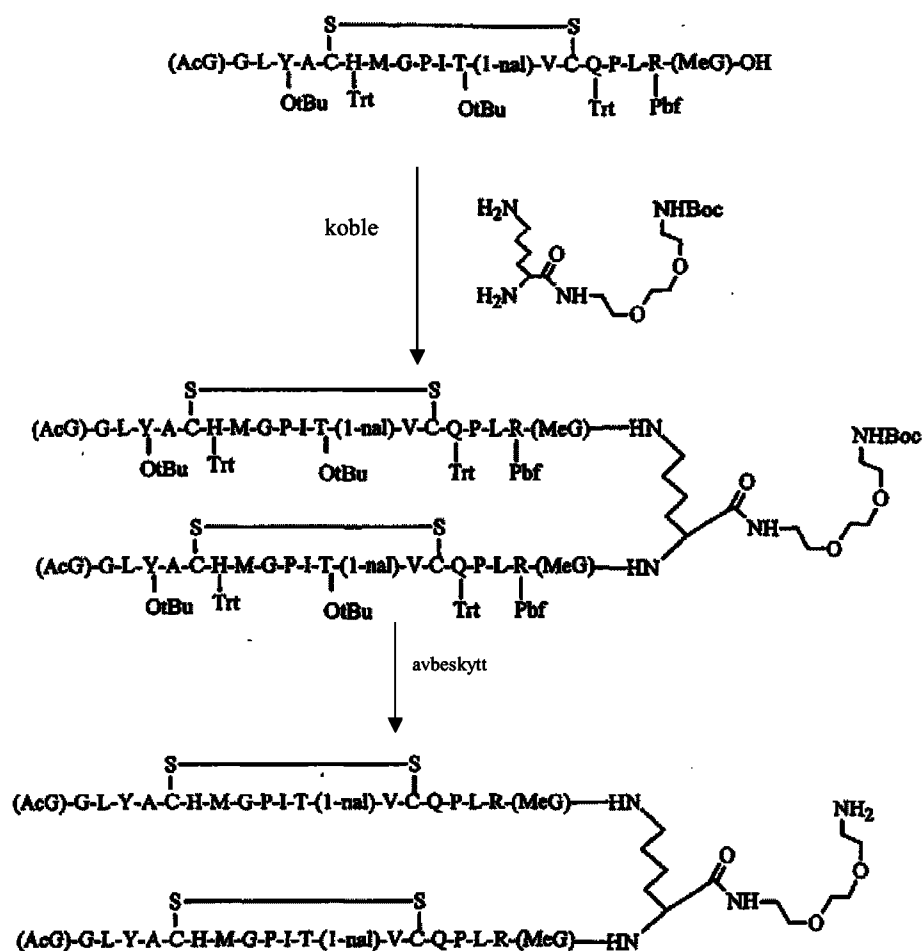
15

74



Trinn 7 – Kobling av Lys-TAP-Boc til oksiderte OBn-avbeskyttede monomerer for å danne en peptiddimer:

- Lys-TAP-Boc ble koblet til et to-gangers molart overskudd av de oksiderte OBn-
 5 avbeskyttede monomerene under standard betingelser for å danne en peptiddimer.
 Peptiddimeren blir så avbeskyttet under standard betingelser.



Trinn 8 – PEGylering av beskyttet dimer:

Den avbeskyttede peptiddimeren blir så PEGylert som beskrevet i Trinn 10 i Eksempel 1.

5

Trinn 9 – Ionebytterensing:

Den PEGylerte peptiddimeren blir så rensset som beskrevet i Trinn 11 i Eksempel 1.

Eksempel 3: In vitro aktivetsanalyser

- 10 Dette eksempel beskriver forskjellige in vitro-analyser som er nyttige i å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. Resultatene for disse analysene demonstrerer at de nye peptidene i denne oppfinnelsen binder seg til EPO-R og aktiverer EPO-R-signallering. Videre så viser resultatene for disse analyser at de nye peptidsammensetningene utviser en overraskende økning i EPO-R-bindingsaffinitet og
- 15 biologisk aktivitet sammenlignet med EPO-etterligningspeptider som tidligere er blitt beskrevet.

- EPO-R-agonistpeptiddimerer blir laget ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt i Eksempel 1 eller Eksempel 2. Potensen til disse peptiddimerer blir evaluert ved å anvende en
- 20 rekke in vitro aktivetsanalyser, inkludert, en reporteranalyse, en prolifereringsanalyse, en kompetitiv bindingsanalyse, og en C/BFU-e-analyse. Disse fire analysene er beskrevet i videre detalj under.

Resultater av disse in vitro-aktivetsanalysene er oppsummert i Tabell 2.

25

1. Reporteranalyse

- Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje utledet reporter celle, Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux. Denne reporter cellelinje uttrykker en kimer reseptor som omfatter den ekstracellulære delen av den humane EPO-reseptor og den intracellulære
- 30 delen av den humane GCSF-reseptoren. Denne cellelinje er videre transfektert med en fos-promoter-drevet luciferase reporter gen konstruksjon. Aktivisering av denne kimere reseptor gjennom tilsetting av erytropoietiske midler resulterer i uttrykket av luciferase reporter genen, og derfor produksjonen av lys ved tilsetting av luciferasesubstratet luciferin. Nivået av EPO-R-aktivisering i slike celler kan dermed kvantiteres via måling
- 35 av luciferaseaktivitet.

- Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux cellene er dyrket i DMEM/F12-medium (Gibco) supplementert med 10% fetalt bovint serum (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 supernatant (supernatanten fra en kultur med WEHI-3-celler, ATCC # TIB-68) og penicillin/streptomycin. Ca. 18 timer før analysen, blir cellene sultet ved å overføre dem til DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-supernatant. På dagen for analyse så blir cellen vasket en gang med DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant), deretter blir 1×10^6 celler per ml dyrket i nærværet av en kjent konsentrasjon av testpeptid, eller med EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) som en positiv kontroll, i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). Seriefortynninger av testpeptidet blir samtidig testet i denne analyse. Analyseplater blir innkubert i 48 timer ved 37°C i en 5% CO₂-atmosfære, hvorefter luciferin (Steady-Glo; Promega, Madison, WI) blir tilsatt til hver brønn. Etter en 5-minutters innkubering blir lyseemisjon målt på et Packard Topcount Luminometer (Packard Instrument Co., Downers Grove, III).
- Lystellinger blir plottet relativt til testpeptidkonsentrasjon og analysert ved å anvende GraphPad software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halvmaksimal emisjon av lys er nedtegnet som EC50 (se Tabell 2: Reporter EC50).

2. Prolifereringsanalyse

- Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje, Baf3, transfektert til å uttrykke humant EPO-R. Prolifisering av den resulterende cellelinjen BaF3/Gal4/Elk/EPOR er avhengig av EPO-R-aktivering. Graden av celleprolifisering kvantiteres ved å anvende MTT, hvor signalet i MTT-analysen er proporsjonal med antallet levende celler.
- BaF3/Gal4/Elk/EPOR cellene blir dyrket i spinnerflasker i DMEM/F12-medium (Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone) og 2% WEHI-3-supernatant (ATCC # TIB-68). Dyrkede celler sultes over natt i en spinnerflaske ved en celletetthet på 1×10^6 celler/ml, i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-supernatant. De sultede cellene blir så vasket to ganger med Dulbeccos PBS (Gibco) og resuspendert til en tetthet på 1×10^6 celler /ml i DMEM/F12 supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). 50 µl alikvoter (~50 000 celler) av cellesuspensjonen blir så utplatet i triplikat i 96-brønners analyseplater. 50 µl alikvoter med seriefortynninger av test-EPO etterligningspeptider, eller 50 µl EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) eller AranespTM (darbepoeitin alfa, en EPO-R-agonist kommersielt tilgjengelige fra Amgen) i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant I) ble tilsatt til de 96-brønners analyseplatene

(sluttvolum i brønn på 100 μ l). For eksempel så kan 12 forskjellige fortynninger testes hvor sluttkonsentrasjonen av testpeptid (eller kontroll EPO-peptid) er i området fra 810 pM til 0,0045 pM. De utplatede cellene blir så innkubert i 48 t ved 37°C. Deretter blir 10 μ l MTT (Roche Diagnostics) tilsatt til hver dyrkningsbrønn og deretter får det

5 inkubere i 4 timer. Reaksjonen blir så stoppet ved å tilsette 10% SDS + 0,01 N HCl. Platene ble så innkubert over natt ved 37°C. Absorbans for hver brønn ved en bølgelengde på 595 nm blir så målt ved hjelp av spektrofotometri. Plott av absorbanslesingene mot testpeptidkonsentrasjon blir konstruert og EC50 beregnet ved å anvende GraphPad software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i halv-

10 maksimal absorbans er nedtegnet som EC50 (se Tabell 2: Proliferering EC50).

3. Kompetitiv bindingsanalyse

Kompetitive bindingsberegninger ble gjort ved å anvende en analyse hvor et lyssignal dannes som en funksjon av nærheten av to kuler: en streptavidin donorkule som bærer

15 en biotinyllert EPO-R-bindende peptidtracer og en akseptorkule som har bundet EPO-R. Lys dannes ved ikke-stråle energioverføring, i løpet av dette blir et enkelt oksygen frigjort fra en første kule ved eliminering, og kontakt med det frigjørende enkle oksygenet forårsaker den andre kulen å emitte lys. Disse kulesettene er kommersielt tilgjengelige (Packard). Kulenærhet dannes ved bindingen av den EPO-R-bindende

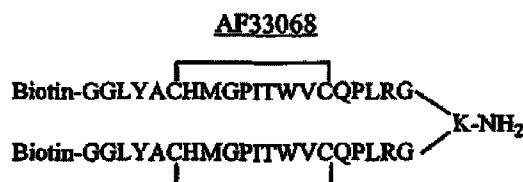
20 peptidtracer til EPO-R. Et testpeptid som konkurrerer med EPO-R-bindingspeptidtracer for binding til EPO-R vil forhindre denne binding å forårsake en nedgang i lysemisjon.

I mer detalj så er fremgangsmåten som følger: Tilsett 4 μ l seriefortynninger av test EPO-R-agonistpeptidet, eller positive eller negative kontroller, til brønner i en 384

25 brønners plate. Deretter, tilsett 2 μ l/brønn reseptor/kulecoctail. Reseptorkulecoctail består av: 15 μ l 5 mg/ml streptavidin donorkuler (Packard), 15 μ l 5 mg/ml monoklonalt antistoff ab 179 (dette antistoff gjenkjenner delen av det humane placentale alkalisk fosfataseproteiner som finnes i det rekombinante EPO-R), protein A overtrukne akseptorkuler (protein A vil binde seg til ab179 antistoffet; Packard), 112,5 μ l av en

30 1:6,6 fortynning av rekombinant EPO-R (produsert i kinesiske hamster ovarieceller som et fusjonsprotein til en del av det humane placentale alkaliske fosfataseproteinet som inneholder ab179 målepitopen) og 670,5 μ l Alphaquest buffer (40 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM $MgCl_2$; 0,1% BSA, 0,05% Tween 20). Knips for å blande. Tilsett 2 μ l/brønn av den biotinyllerte EPO-R-bindende peptidtraceren, AF33068 (30 nM sluttkonsentrasjon).

35 AF33068, et EPO-R-bindende peptid (se Tabell 3 "Reporter EC50 (pm)"), lages ifølge fremgangsmåtene beskrevet i Eksempel 1.



Sentrifuger 1 minutt for å blande. Forsegl platene med Packard Top Seal og pakk inn i
 5 folie. Innkuber over natt ved romtemperatur. Etter 18 timer leses lyseemisjon ved å
 anvende en AlphaQuest leser (Packard). Plott lyseemisjon mot konsentrasjon av peptid
 og analysert med Graph Pad eller Excel.

Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en 50% nedgang i lyseemisjon i forhold til
 10 den som er observert uten testpeptid blir nedtegnet som IC₅₀ (se Tabell 2: AQIC₅₀).

4. *C/BFU-e-analyse*

EPO-R-signalering stimulerer differensieringen av benmarg stamceller til proliferende
 røde blodcelle forløpere. Denne analyse måler evnen testpeptidene har til å stimulere
 15 prolifereringen og differensieringen av røde blodcelle forløpere fra primære, humane
 benmargs pluripotent stamceller.

Til denne analysen så blir seriefortynninger med testpeptid laget i IMDM-medium
 (Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone). Disse seriefortynninger eller positive
 20 kontroll EPO-peptid, blir så tilsatt til metylcellulose for å gi et sluttvolum på 1,5 ml.
 Metylcellulosen og peptidblandingen blir så vortekset kraftig. Alikvoter (100 000
 celler/ml) av humane, benmargsutledede CD34+ celler (Poietics/Cambrex) tines. De
 tinede cellene blir forsiktig tilsatt til 0,1 ml av 1 mg/ml DNase (stamceller) i et 50 ml
 rør. Deretter blir 40-50 ml IMDM-medium tilsatt forsiktig til cellene: mediet blir tilsatt
 25 dråpe for dråpe langs siden av det 50 ml røret i de første 10 ml, og deretter så blir det
 gjenværende volumet med medium langsomt fordelt langs siden av røret. Cellene blir
 så spunnet ved 900 rpm i 20 minutter og mediet forsiktig fjernet ved forsiktig
 aspirering. Cellene resuspenderes i 1 ml IMDM-medium og celletetthet per ml telles på
 hemocytometerobjektglass (10 µl alikvot av celleduspensjon på objektglass, og
 30 celletetthet er det gjennomsnittlige tallet x 10 000 celler/ml). Cellene blir så fortynnet i
 IMDM-medium til en celletetthet på 15 000 celler/ml. En 100 µl av fortynnede celler
 blir så tilsatt til hver 1,5 ml metylcellulose pluss peptidprøve (sluttcellekonsentrasjon i

analysemedium er 1 000 celler/ml), og blandingen blir vortekset. Få boblene i blandingen til å forsvinne og deretter aspirer 1 ml ved å anvende en nål med avkuttet ende. Tilsett 0,25 ml aspirert blanding for hver prøve til hver av de 4 brønnene i en 24-brønners plate (Falcon brand). Innkuber plateblandingene ved 37°C under 5% CO₂ i en

5 humid inkubator i 14 dager. Skår for tilstedeværelsen av erytroidkolonier ved å anvende et fasemikroskop (5X-10X objektiv, sluttforstørrelse på 100X). Konsentrasjonen av testpeptid hvor antall dannede kolonier er 90% av maksimum, i forhold til den som blir observert med EPO-positiv kontroll, blir nedtegnet som EC90 (se Tabell 2: C/BFU-e EC90).

10

5. Radioaktiv ligandkompetitiv bindingsanalyse

En alternativ radioaktiv ligand kompetitiv bindingsanalyse kan også anvendes for å måle IC₅₀-verdier av peptider i denne oppfinnelsen. Denne analyse måler bindinger av ¹²⁵I-EPO til EPOr. Analysen blir helst utført i henhold til den følgende

15 eksempelprotokollen:

A. Materialer

Rekombinant humant EPO-R/Fc kimer	• Identifikasjon: Rekombinant, humant EPO-R/Fc kimer • Leverandør: R&D Systems (Minneapolis, MN, US) • Katalognr.: 963-ER • Lott nr.: EOK033071 • Lagring: 4°C
Jodinert, rekombinant humant erytropoietin	• Identifikasjon: (3[¹²⁵I]jodtyrosyl)erytropoietin, humant rekombinant, høyspesifikk aktivitet, 370 kBq, 10 µCi • Leverandør: Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, US) • Katalognr.: IM219-10 µCi • Lott nr.: • Lagring: 4°C
Protein-G Sefarose	• Identifikasjon: Protein-G Sefarose 4 rask strømning • Leverandør: Amersham

	Biosciences (Piscataway, NJ, US) • Katalognr.: 17-0618-01 • Lott nr.: • Lagring: 4°C
Analysebuffer	• Fosfatbufret saltvann (PBS), pH 7,4, inneholder 0,1% bovint serumalbumin og 0,1% natriumazid • Lagring: 4°C

B. Bestemmelse av passende reseptorkonsentrasjon

Et 50 µg rør med lyofilisert, rekombinant EPOr ekstracellulært domene fusert til Fc-delen av humant IgG1 rekonstitueres i 1 ml analysebuffer. For å bestemme den

5 korrekte mengden reseptor til anvendelse i denne analysen, blir 100 µl seriefortynninger av denne reseptortillaging kombinert med ca. 20 000 cpm i 200 µl jodinert, rekombinant, humant erytropoietin (^{125}I -EPO) i 12 x 75 mm polypropylen testrør. Rørene får påsatt lokk og blir forsiktig blandet ved 4°C over natt på en LabQuake roterende rister.

10

Den neste dagen blir en 50 µl av en 50% slammet løsning av Proteing-G Sefarose tilsatt til hvert rør. Rørene ble så innkubert i 2 timer ved 4°C med forsiktig blanding. Rørene ble så sentrifugert i 15 min ved 4 000 RPM (3 297 x G) for å pelletere protien-G sefarose. Supernatantene ble forsiktig fjernet og kastet. Etter vasking 3 ganger med 1

15 ml 4°C analysebuffer, ble pelletene talt i en Wallac Wizard gammateller. Resultatene ble så analysert og fortynningen som kreves for å nå 50% av den maksimale bindingsverdien ble beregnet.

20

C. IC_{50} bestemmes for peptid

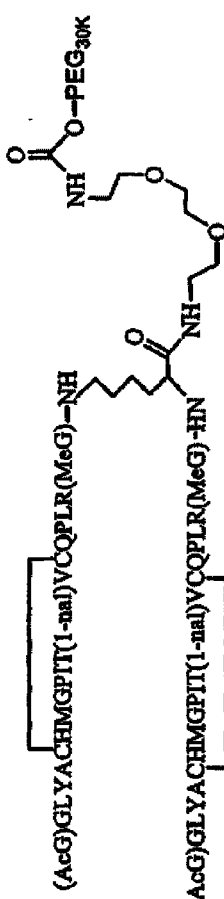
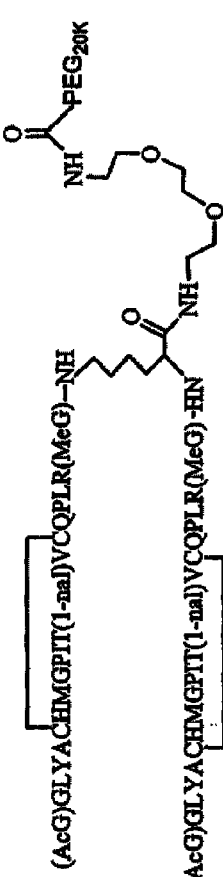
For å bestemme IC_{50} til AF37702, blir 100 µl seriefortynninger av peptidet kombinert med 100 µl rekombinant erytropoietinreseptor (100 pg/rør) i 12 x 75 mm polypropylen testrør. Deretter blir 100 µl jodinert, rekombinant humant erytropoietin (^{125}I -EPO) tilsatt til hvert rør og rørene blir satt lokk på og blandet forsiktig ved 4°C over natt.

25

Den neste dagen blir bundet ^{125}I -EPO kvantitert som beskrevet over. Resultatene blir analysert og IC_{50} -verdi beregnet ved å anvende Graphpad Prism versjon 4.0 fra

GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA). Analysen repeteres to eller flere ganger for hvert peptid som er testet, for en total på 3 eller mer replikatet IC₅₀-bestemmelser.

Tabell 2: In vitro-aktivitetsanalyser for peptiddimerer

Forbindelse- betegnelse	Peptiddimer	Reporter EC5 (pM)	Proliferering EC 50 (nM)	IC50 (pM)	C/BFU-e EC90 (nM)
AF35645		---	---	110	2,2
AF35527		150	72	---	2,7

Eksempel 4: In vivo aktivitetsanalyse

Dette eksempel beskriver forskjellige in vivo-analyser som er nyttige for å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. EPO-R-agonistpeptiddimerer ble laget i henhold til fremgangsmåter tilveiebrakt i Eksempel 1 eller Eksempel 2. In vivo-aktiviteten til disse peptidmonomerene og dimerer blir evaluert ved å anvende en rekke analyser, inkludert en polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse og en retikulocyt analyse. Disse to analyser er beskrevet i videre detalj under.

10 1. *Polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse*

Testpeptider blir undersøkt for in vivo-aktivitet i den polycytemiske ekshypoksiske muse-bioanalysen adaptert fra fremgangsmåten som er beskrevet av Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067. Denne analyse undersøker evnen et testpeptid har til å fungere som en EPO-etterligner: dvs. til å aktivere EPO-R og å inducere ny rød blodcellesyntese. Rød blodcellesyntese blir kvantitert basert på inkorporering av radioaktivt merket jern i hemoglobin til de syntetiserte røde blodceller.

BDF1-mus får akklimatisere seg til omgivelsesbetingelser i 7-10 dager. Kroppsvekt blir bestemt for alle dyr og lav-vektsdyr (<15 gram) ble ikke anvendt. Mus blir utsatt for suksessive betingelsessykluser i et hypobart kammer i totalt 14 dager. Hver 24 timers syklus består av 18 timer ved $0,40 \pm 0,02\%$ atmosfæretrykk og 6 timer ved omgivelsestrykk. Etter at musene er tilpasset betingelsene så blir de opprettholdt ved omgivelsestrykk i enda 72 timer før dosering.

25 Testpeptider eller rekombinante humane EPO-standarder blir fortynnet i PBS + 0,1% BSA verktøy (PBS/BSA). Peptidmonomer stokkløsninger ble først løst opp i dimetylsulfoksid (DMSO). Negative kontrollgrupper inkluderer en gruppe mus injisert med PBS/BSA alene, og en gruppe injisert med 1% DMSO. Hver dose gruppe inneholder 10 mus. Mus blir injisert subkutan (i nakkehuden) med 0,5 ml av den passende prøven.

48 timer etter prøveinjeksjon blir musene gitt en intraperitoneal injeksjon på 0,2 ml Fe^{59} (Dupont, NEN), for en dose på ca. $0,75 \mu\text{Ci}/\text{mus}$. Musekroppsvekt blir bestemt 24 timer etter administrering av Fe^{59} og musene blir tatt livet av 48 timer etter Fe^{59} -administrering. Blod ble samlet for hvert dyr ved hjertepunktering og hematokritt blir bestemt (heparin ble anvendt som antikoagulant). Hver blodprøve (0,2 ml) blir

analysert for Fe^{59} inkorporering ved å anvende en Packard gammateller. Mus som ikke responderer (dvs. de mus som har radioaktiv inkorporering som er mindre enn den negative kontrollgruppen) blir eliminert fra det passende datasettet. Mus som har hematokrittverdier på mindre enn 53% av den negative kontrollgruppen blir også
 5 eliminert.

Resultater er utledet fra sett på 10 dyr for hver eksperimentelle dose. Den gjennomsnittlige mengden av radioaktivitet inkorporert (telling per minutt (CPM)) i blodprøver fra hver gruppe blir beregnet.

10

2. *Retikulocyt analyse*

Normale BDFI-mus blir dosert (0,5 ml, injisert subkutan) på tre etterfølgende dager med enten EPO-kontroll eller testpeptid. Ved dag tre ble mus også dosert (0,1 ml, injisert intraperitonealt) med jerndekstran (100 mg/ml). På dag fem blir mus
 15 anestetisert med CO_2 og blodd i hjel ved hjertepunktur. Prosent (%) retikulocytter i hver blodprøve blir bestemt ved tiazol oransjefarging og flowcytometer analyse (retic-tellingsprogram). Hematokritt blir manuelt bestemt. Den korrigerte prosenten retikulocytter blir bestemt ved å anvende den følgende formelen:

$$20 \quad \% \text{RETIC}_{\text{korrigert}} = \% \text{RETIC}_{\text{observert}} \times (\text{Hematokritt}_{\text{individuell}} / \text{Hematokritt}_{\text{normal}})$$

3. *Hematologisk analyse*

Normale CD1-mus blir dosert med 4 ukentlige bolusintravenøse injeksjoner av enten EPO-positiv kontroll, testpeptid eller verktøy. Et område med positive kontroll og
 25 testpeptiddoser, uttrykt som mg/kg blir testet ved å variere konsentrasjonen av den aktive forbindelsen i formuleringen. Volumet injisert er 5 ml/kg.

Verktøykontrollgruppen omfatter 12 dyr, mens 8 dyr er i hver av de gjenværende dosegruppene. Daglig viabilitet og ukentlige kroppsvekter blir nedtegnet.

30 De doserte musene faster og de blir deretter antestisert med inhalert isofluran og terminale blodprøver blir samlet via punktering av hjertet eller abdominal aorta på Dag 1 (for verktøy kontrollmus) og på dagene 15 og 29 (4 mus/gruppe/dag). Blodet blir overført til Vacutainer® varemerkerør. Foretrukket antikoagulant er etylendiamintetraeddiksyre (EDTA).

35

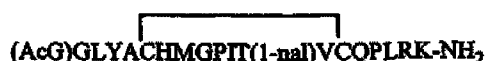
Blodprøver blir evaluert for endepunktsmåling av rød blodsyntese og fysiologi slik som hematokritt (Hct), hemoglobin (Hgb) og totalt erytrocyttmål (RBC) ved å anvende automatiserte, kliniske analysatorer som er velkjente i fagfeltet (for eksempel de som er laget av Coulter, Inc.).

5

Eksempel 5: Syntese av EPO-R-agonistpeptid homodimerer av peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1)

10 **Trinn 1 – Syntese av peptidmonomerer:**

Peptidmonomerer blir syntetisert ved å anvende standard Fmoc-kjemi på en ABI 431A peptidsyntesemaskin ved å anvende TG-RAM resin (0,18 mmol/g Rapp polymer, Tyskland). For syntesen av peptidmonomerer med en amidert karboksyterminal ende, blir det fullstendig sammenstilte peptider kløvet fra resinet med 82,5% TFA, 5% vann, 15 6,25% anisol, 6,25% etanditiol. Det avbeskyttede produktet blir filtrert fra resinet og presipitert med dietyleter. Etter nøye tørking, blir produktet renset med C18 reversfase høyutførelses flytende kromatografi med en gradient av acetonitril/vann i 0,1% trifluoreddiksyre. Strukturen av peptidet blir bekreftet ved hjelp av elektrospy massespektrometri. Peptidet ble løst i en 1:1 løsning av DMSO:vann ved en 20 konsentrasjon på 1 mg/ml for å påvirke disulfidannelse. Produktet blir renset ved C18 reversfase høyutførelses flytende kromatografi med en gradient av acetonitril/vann i 0,1% trifluoreddiksyre. Peptidmonomeren kan illustreres som følger:

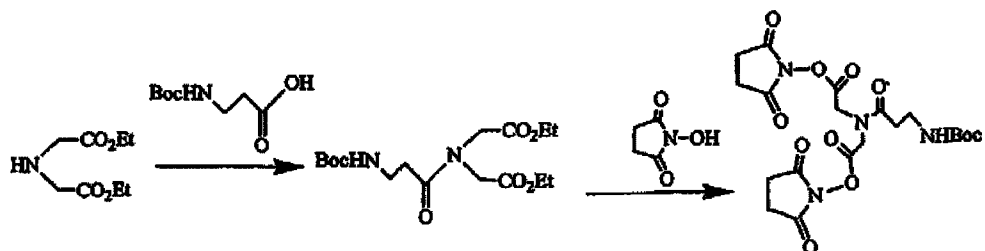


25

Trinn 2 – Syntese av den trifunksjonelle linkeren:

Til en løsning med dietyliminoacetat (10,0 g, 52,8 mmol) og Boc-beta-alanin (10,0 g, 52,2 mmol) i 100 ml DCM ble det tilsatt diisopropylkarbodiimid (8,0 ml, 51,1 mmol) i løpet av 10 minutter ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble varmet til ~10 30 grader løpet av tilsetningen, deretter nedkjølt tilbake til romtemperatur i løpet av 20 minutter. Reaksjonsblandingen fikk lov til å røre over natt og den presipiterte diisopropylureaen ble filtrert av. Løsemiddelet ble fjernet under redusert trykk for å gi en gummi, og det gjenværende løst i etylacetat og igjen filtrert for å fjerne det tilleggsprecipiterte ureaet. Den organiske fasen ble plassert i en separeringstrakt, vasket 35 (mettet NaHCO₃, saltløsning, 0,5 N HCl, saltløsning), tørket (MgSO₄), filtrert og

konsentrert under redusert trykk for å gi diesterproduktet som en fargeløs olje. Diesteren ble tatt opp i en 1:1 blanding av MeOH:THF (100 ml) og til dette ble det tilsatt vann (25 ml), og deretter NaOH (5 g, 125 mmol). pH ble målt til å være over 10. Reaksjonsblandingen ble rørt ved romtemperatur i 2 timer og deretter surgjort til pH 1 med 6N HCl. Den vandige fasen ble mettet med NaCl og ekstrahert 4 ganger med etylacetat. Den kombinerte, organiske fasen ble vasket (saltløsning), tørket (MgSO₄), og konsentrert under redusert trykk for å gi et hvitt halvfast stoff. Det faste stoffet ble løst i 50 ml DCM og til dette ble det tilsatt 300 ml heksan for å lage en hvit slamløsning. Løsemiddel ble fjernet under redusert trykk for å gi diacidet som et hvitt faststoff (14,7 g, 91,5% utbytte i 2 trinn). Til en løsning av diacidet (1 g, 3,29 mmol) i 20 ml DMF ble det tilsatt N-hydroksysuksinimid (770 mg, 6,69 mmol) og diisopropylkarbodiimid (1,00 ml, 6,38 mmol) og 4-dimetylaminoipyridin (3 mg, 0,02 mmol). Reaksjonsblandingen ble rørt over natt og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk. Det gjenværende ble tatt opp i etylacetat og filtrert for å fjerne det presipiterte urea. Den organiske fasen ble plassert i en separeringstrakt, vasket (mettet NaHCO₃, saltløsning, 0,5 N HCl, saltløsning), tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi di-NHS esterproduktet som et hvitt faststoff (1,12 g, 68% utbytte).



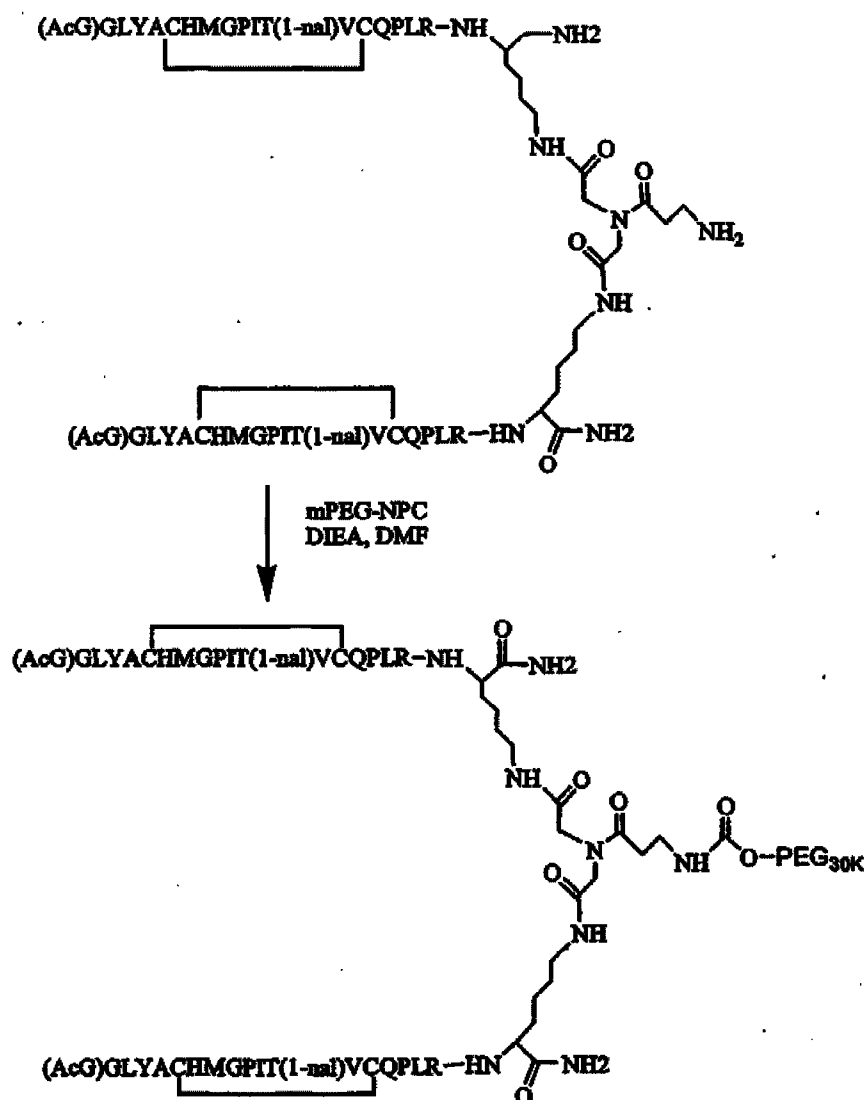
20

Trinn 3 – Kobling av den trifunksjonelle linkeren til peptidmonomerene:

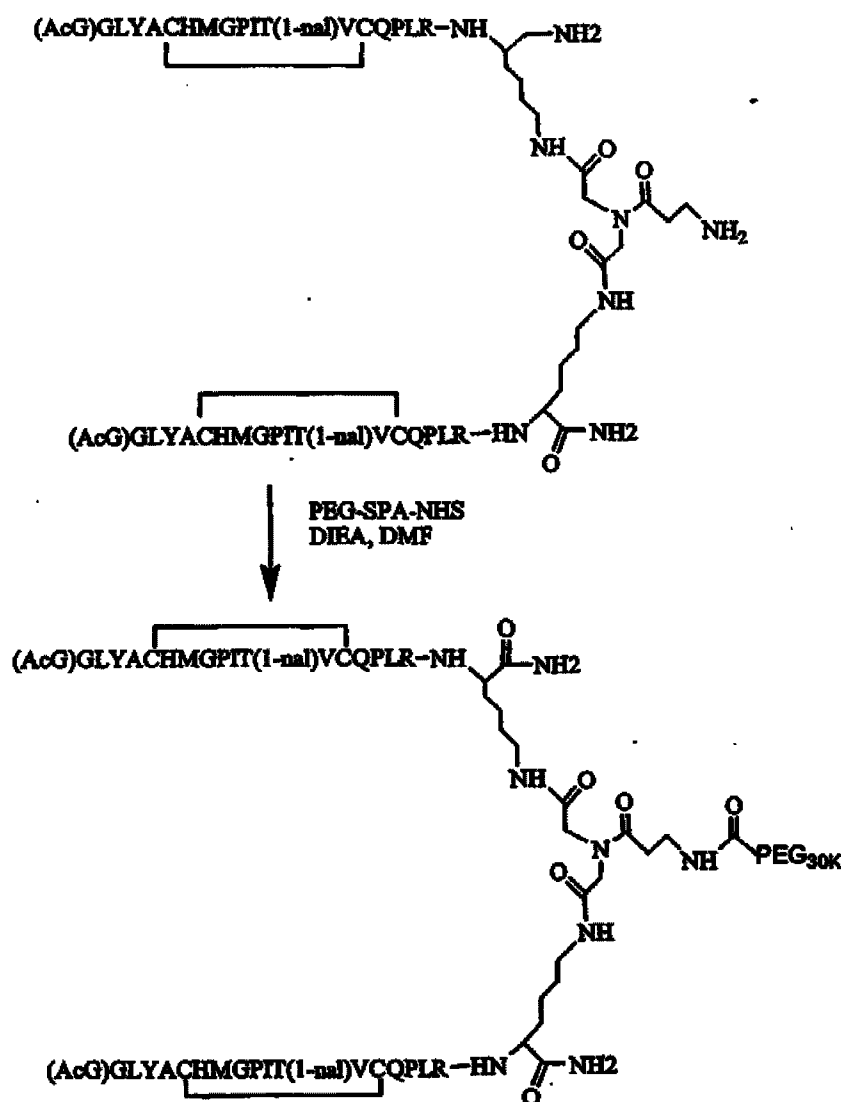
For kobling til linkeren, blir 2 ekv. peptid blandet med 1 ekv. trifunksjonell linker i tørr DMF og gir en klar løsning, 5 ekv. av DIEA ble tilsatt etter 2 minutter. Blandingen ble rørt ved omgivelsestemperatur i 14 timer. Løsemiddelet ble fjernet under redusert trykk og det råe produktet ble løst i 80% TFA i DCM i 30 min for å fjerne Boc-gruppen, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av dimeren ble bekreftet ved elektropray massespektrometri. Denne koblingsreaksjonen fester linkeren til nitrogenatomet i ε-aminogruppen til lysinresidiet i hver monomer.

Trinn 4 – PEGylering av peptiddimeren:

PEGylering via en karbamatbinding: Peptiddimeren blandes med en lik mengde (molbasis) aktiverte PEG-typer (mPEG-NPC fra NOF Corp. Japan) i tørr DMF for å gi en klar løsning. Etter 5 minutter blir 4 ekv. DIEA tilsatt til den ovennevnte løsning. Blandingen røres ved omgivelsestemperatur i 14 timer, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid blir bekreftet ved MALDI-masse. Det rensede peptidet ble også utsatt for rensing via kationer utbyttekromatografi som skissert under.



PEGylering via en amidbinding: Peptiddimeren blandes med en lik mengde (molbasis) aktiverte PEG-arter (PEG-SPA-NHS fra Shearwater Corp, USA) i tørr DMF for å gi en klar løsning. Etter 5 minutter blir 10 ekv. DIEA tilsatt til den ovenfor nevnte løsning. Blandingen røres ved omgivelsestemperatur i 2 timer, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid ble bekreftet ved MALDI-masse. Det rensede peptidet ble også utsatt for rensing via kation utbyttekromatografi som skissert under.



Trinn 5 – Ionebytterensing av peptider:

- 10 Flere utbyttestøtter ble overveid for deres evne til å separere det ovenfor nevnte peptid-PEG-konjugatet fra ikke-reagert (eller hydrolysert) PEG, i tillegg til deres evne til å

- holde igjen til start de dimere peptidene. Ionebytteresinen (2-3 g) ble ladet på en 1 cm kolonne, etterfulgt av omdannelse til natriumformen (0,2 N NaOH ladet på kolonne inntil eluatet var pH 14, ca. 5 kolonnevolumer), og deretter til hydrogenformen (eluert enten med 0,1 N HCl eller 0,1 N HOAc inntil eluatet traff ladnings-pH, ca. 5
- 5 kolonnevolumer), etterfulgt av vasking med 25% ACN/vann inntil pH 6. Enten så ble peptidet før konjugering eller peptid-PEG-konjugatet løst i 25% ACN/vann (10 mg/ml) og pH justert til <3 med TFA, deretter ladet på kolonnen. Etter vasking med 2-3 kolonnevolumer med 25% ACN/vann og oppsamling av 5 ml fraksjoner, ble peptidet frigjort fra kolonnen ved eluering med 0,1 M NH₄OAc i 25% ACN/vann, igjen
- 10 oppsamling av 5 ml fraksjoner. Analyse via HPLC viste hvilke reaksjoner som inneholdt det ønskede peptidet. Analyse med en Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) indikerte at når peptidet ble holdt tilbake på kolonnen og ble eluert med NH₄OAc-løsningen (vanligvis mellom fraksjonene 4 og 10), så ble ikke noe ikke-konjugert PEG observert som en kontaminant. Når peptidet ble eluert i den initiale
- 15 vaskebufferen (vanligvis de første 2 fraksjonene), ble ingen separasjon av ønsket PEG-konjugat og overskudd PEG observert.

De følgende kolonnene holdt vellykket tilbake både peptider og peptid-PEG-konjugatet, og rensset vellykket peptid-PEG-konjugatet fra det ikke-konjugerte peptidet:

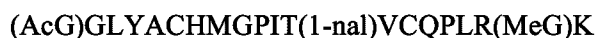
20

Tabell 3: Ionebytteresiner

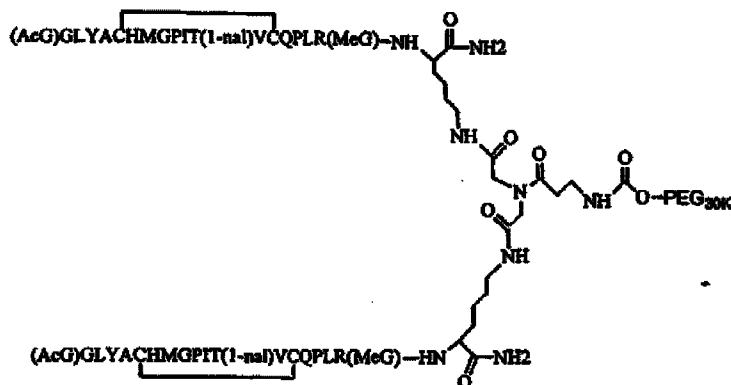
Støtte	Kilde
Mono S HR 5/5 sterk kationutbytte pre-ladet kolonne	Amersham Biosciences
SE53 Cellulose, mikrogranulær sterk kationutbyttestøtte	Whatman
SP Sefarose raskt strømming sterkt kationutbyttestøtte	Amersham Biosciences

- Eksempel 6: Syntese av EPO-R-agonistpeptid homodimerer til peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1)**
- 25

EPO-R-agonistpeptid homodimerer til peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 2) blir syntetisert som beskrevet i Eksempel 1, unntatt at i Trinn 1 så er de syntetiserte peptidmonomerene:

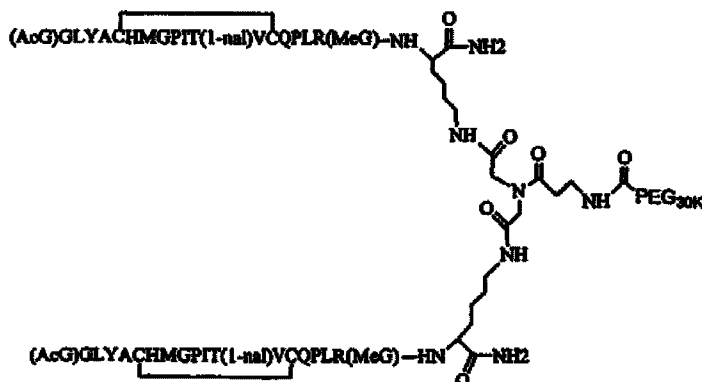


Der hvor PEG er festet til linkerens via en karbamatkobling, så kan sluttproduktet av denne syntese illustreres strukturelt som følger:



5

Der hvor PEG er festet til linkerens via en amidkobling, så kan sluttproduktet av denne syntese illustreres strukturelt som følger:



10 Eksempel 7: In vitro aktivitetsanalyser

Dette eksempel beskriver forskjellige in vitro-analyser som er nyttige for å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. Resultatene for disse analysene demonstrer at de nye peptidene i denne oppfinnelse binder seg til EPO-R og aktiverer EPO-R signalering. Videre så viser resultatene for disse analyser at de nye peptidsammensetningene utviser en overraskende økning i EPO-R bindingsaffinitet og biologisk aktivitet sammenlignet med EPO-etterligningspeptider som tidligere er blitt beskrevet.

15

EPO-R-agonistpeptidmonomerer og dimerer blir laget ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt i Eksempel 1 eller Eksempel 2. Potensen til disse peptiddimerer blir evaluert ved å anvende en rekke in vitro aktivitetsanalyser, inkludert: en reporteranalyse, en prolifereringsanalyse, en kompetitiv bindingsanalyse og en C/BFU-e-analyse. Disse fire analyser er beskrevet i videre detalj under.

Resultatene av disse in vitro aktivitetsanalyser er oppsummert i Tabell 2.

1. *Reporteranalyse*

- 10 Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje utledet reporter celle, Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux. Denne reporter cellelinje uttrykker en kimer reseptor som omfatter den ekstracellulære delen av den humane EPO-reseptoren og den intracellulære delen av den humane GCSF-reseptoren. Denne cellelinje blir videre transfektert med en fos-promoter-drevet luciferase reporter gen konstruksjon. Aktivisering av denne kimere
- 15 reseptor gjennom tilsetning av erytropoietisk middel resulterer i uttrykket av luciferase reporter genen, og derfor produksjonen av lys ved tilsetning av luciferasesubstratet, luciferin. Nivået av EPO-R-aktivisering i slike celler kan dermed kvantiteres via måling av luciferaseaktivitet.
- 20 Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux-cellene er dyrket i DMEM/F12-medium (Gibco) supplementert med 10% fetalt bovint serum (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 supernatant (supernatanten fra en kultur med WEHI-3-celler, ATCC # TIB-68) og penicillin/streptomycin. Ca. 18 timer før analysen, blir cellene sultet ved å overføre dem til DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-
- 25 supernatant. På dagen for analyse blir cellene vasket en gang med DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant), deretter blir 1×10^6 celler per ml dyrket i nærværet av en kjent konsentrasjon av testpeptid, eller med EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) som en positiv kontroll, i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). Seriefortynninger av
- 30 testpeptidet blir samtidig testet i denne analyse. Analyseplater blir innkubert i 4 timer ved 37°C i en 5% CO₂-atmosfære, deretter blir luciferin (Steady-Glo; Promega, Madison, Wi) tilsatt til hver brønn. Etter en 5-minutters innkubering blir lyseemisjon målt på et Packard Topcount Luminometer (Packard Instrument Co., Downers Grove, Ill). Lystellinger blir plottet relativt til testpeptidkonsentrasjon og analysert ved å
- 35 anvende GraphPad software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halv-maksimal emisjon av lys er nedtegnet som EC50.

2. Prolifereringsanalyse

Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje, Baf3, som er transfektert til å uttrykke humant EPO-R. Prolifisering av den resulterende cellelinjen

- 5 BaF3/Gal4/Elk/EPOR er avhengig av EPO-R-aktivering. Graden av celleprolifisering blir kvantitert ved å anvende MTT, hvor signalet i MTT-analysen er proporsjonalt til antallet viable celler.

BaF3/Gal4/Elk/EPOR-cellene blir dyrket i spinnerflasker i DMEM/F12-medium

(Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone) og 2% WEHI-3-supernatant (ATCC #

- 10 TIB-68). Dyrkede celler sultes over natt i en spinnerflaske ved en celletetthet på 1×10^6 celler/ml, i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-supernatant. De sultede cellene blir så vasket to ganger med Dulbeccos PBS (Gibco) og resuspendert til en tetthet på 1×10^6 celler/ml i DMEM/F12 supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). 50 µl alikvoter (~50 000 celler) av

- 15 cellesuspensjonen blir så utplatet i triplikat i 96-brønners analyseplater. 50 µl alikvoter av seriefortynningsserier av test-EPO etterligningspeptider, eller 50 µl EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) eller AranespTM (darbepoeitin alfa, en EPO-R-agonist kommersielt tilgjengelige fra Amgen) i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant) ble tilsatt til de 96-brønners analyseplatene

- 20 (sluttvolum i brønn på 100 µl). For eksempel så kan 12 forskjellige fortynninger testes hvor sluttkonsentrasjonen av testpeptid (eller kontroll EPO-peptid) er i området fra 810 pM til 0,0045 pM. De utplatede cellene blir så innkubert i 48 t ved 37°C. Deretter blir 10 µl MTT (Roche Diagnostics) tilsatt til hver kulturplatebrønn og deretter får de lov å innkubere i 4 timer. Reaksjonen blir så stoppet ved å tilsette 10% SDS + 0,01 N HCl.

- 25 Platene ble så innkubert over natt ved 37°C. Absorbans i hver brønn ved en bølgelengde på 595 nm blir så målt ved hjelp av spektrofotometri. Plott av absorbanslesningene mot testpeptidkonsentrasjon blir konstruert og EC50 beregnet ved å anvende GraphPad software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halv-maksimal absorbans er nedtegnet som EC50.

30

3. Kompetitiv bindingsanalyse

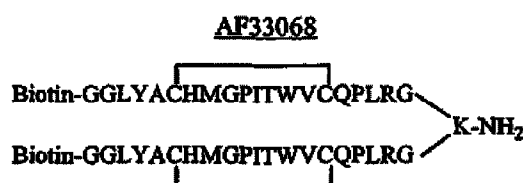
Kompetitive bindingsberegninger ble gjort ved å anvende en analyse hvor et lyssignal genereres som en funksjon av nærheten av to kuler: en streptavidin donorkule som

bærer en biotinyleret EPO-R-bindingspeptidtracer og en akseptorkule som har bundet på

- 35 seg EPO-R. Lys dannes ved ikke-strålings energioverføring, når et enkelt oksygen frigjøres fra en første kule ved eliminering, og kontakt med det frigjorte enkle oksygenet

forårsaker at den andre kulen emitterer lys. Disse kulesettene er kommersielt tilgjengelige (Packard), kulenærhet blir dannet ved bindingen av den EPO-R-bindende peptidtraceren til EPO-R. Et testpeptid som konkurrerer med EPO-R-bindingspeptidtraceren for binding til EPO-R vil forhindre denne binding og forårsake
 5 en nedgang i lyseemisjon.

I mer detalj så er fremgangsmåten som følger: Tilsett 4 µl seriefortynninger av test-EPO-R-agonistpeptidet, eller positive eller negative kontroller, til brønner i en 384 brønners plate. Deretter, tilsett 2 µl/brønn med reseptor/kulecoctail.
 10 Reseptorkulecoctail består av: 15 µl 5 mg/ml streptavidin donorkuler (Packard), 15 µl 5 mg/ml monoklonalt antistoff ab179 (dette antistoff gjenkjenner delen av det humane, placentale, alkalisk fosfataseproteinet som finnes i det rekombinante EPO-R), protein A-overtrukne akseptorkuler (protein A vil binde seg til ab179 antistoffet; Packard), 112,5 µl av en 1:6,6 fortynning av rekombinant EPO-R (produsert i kinesiske hamster
 15 ovarieceller som et fusjonsprotein til en del av det humane, placentale, alkalisk fosfataseproteinet som finnes i ab179 målepitopen) og 607,5 µl Alphaquest buffer (40 mM HEPES, pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 0,1% BSA, 0,05% Tween 20). Knips for å blande. Tilsett 2 µl/brønn av den biotinylerede EPO-R-bindingspeptidtraceren, AF33068 (30 nM sluttkonsentrasjon). AF33068, et EPO-R-bindende peptid (se Tabell 3 "Reporter EC50
 20 (pm)"), lages ifølge fremgangsmåten som er beskrevet i Eksempel 1.



Sentrifuger 1 minutt for å blande. Forsegl platen med Packard Top forsegling og pakk
 25 inn i folie. Innkuber over natt ved romtemperatur. Etter 18 timer leses lyseemisjon ved å anvende en AlphaQuest leser (Packard). Plott lyseemisjon mot konsentrasjon av peptid og analyser med Graph Pad eller Excel.

Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en 50% nedgang i lyseemisjon, i forhold
 30 til den som er observert uten testpeptid, nedtegnes som IC50.

4. C/BFU-e-analyse

EPO-R-signalering stimulerer differensieringen av benmarg stamceller til proliferende røde blodcelleforløpere. Denne analyse måler evnen testpeptidene har til å stimulere prolifereringen og differensieringen av røde blodcelleforløpere fra primære, humane benmargs pluripotente stamceller.

5

For denne analysen blir seriefortynninger av testpeptid gjort i IMDM-medium (Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone). Disse seriefortynninger eller positivt kontroll EPO-peptid, blir så tilsatt til metylcellulose for å gi et sluttvolum på 1,5 ml.

- Metylcellulosen og peptidblandingen blir så vortekset kraftig. Alikvoter (100 000
 10 celler/ml) med humane benmargsutledede CD34+ celler (Poietics/Cambrex) tines. De tinede cellene blir forsiktig tilsatt til 0,1 ml 1 mg/ml DNase (stamceller) i et 50 ml rør. Deretter blir 40-50 ml IMDM-medium tilsatt forsiktig til cellene: mediet tilsattes dråpe for dråpe langs siden av det 50 ml røret for de første 10 ml, og deretter blir det gjenværende volumet med medium langsomt fordelt langs siden av røret. Cellene blir
 15 så spunnet ved 900 rpm i 20 minutter og mediet forsiktig fjernet ved forsiktig aspirering. Cellene resuspenderes i 1 ml IMDM-medium og celletetthet per ml telles på hemacytometer objektglass (10 µl alikvot av celleduspensjon på objektglasset, og celletetthet er det gjennomsnittlige tall x 10 000 celler/ml). Cellene blir så fortynnet i IMDM-medium til en celletetthet på 15 000 celler/ml. 100 µl fortynnete celler blir så
 20 tilsatt til hver 1,5 ml metylcellulose pluss peptidprøve (sluttcellekonsentrasjon i analysemedium er 1 000 celler/ml), og blandingen blir vortekset. Tillat at boblene i blandingen forsvinner og aspirer så 1 ml ved å anvende nål med avkuttet ende. Tilsett 0,25 ml aspirert blanding fra hver prøve til hver av 4 brønner i en 24-brønners plate (Falcon varemerke). Innkuber de utplatede blandingene ved 37°C under 5% CO₂ i en
 25 humid inkubator i 14 dager. Skår for tilstedeværelsen av erytroidkolonier ved å anvende et fasemikroskop (5X-10X objektiv, sluttforstørrelse på 100X). Konsentrasjonen av testpeptidet hvor antall dannede kolonier er 90% av maksimum, i forhold til den som blir observert med den EPO-positiv kontrollen, blir nedtegnet som EC90 (se Tabell 2: C/BFU-e EC90).

30

Eksempel 8: In vivo aktivitetsanalyser

Dette eksempel beskriver forskjellige in vivo-analyser som er nyttige i å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. EPO-R-agonistpeptidmonomerer og dimerer lages ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt i

- 5 Eksempel 1. In vivo-aktiviteten til disse peptidmonomerer og dimerer blir evaluert ved å anvende en rekke analyser, inkludert en polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse og en retikulocyt analyse. Disse to analyser er beskrevet videre i detalj under.

1. *Polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse*

- 10 Testpeptider blir undersøkt for in vivo-aktivitet i den polycytemiske ekshypoksiske muse-bioanalysen adaptert fra fremgangsmåten som er beskrevet av Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067. Denne analyse undersøker evnen et testpeptid har til å fungere som en EPO-etterligner: dvs. til å aktivere EPO-R og å indusere syntese av nye røde blodceller. Rød blodcellesyntese blir kvantitert basert på
15 inkorporering av radioaktivt merket jern i hemoglobin i de syntetiserte røde blodceller.

- BDF1-mus får akklimatisere seg til omgivelsesbetingelser i 7-10 dager. Kroppsvekter blir bestemt for alle dyr og dyr med lav vekt (<15 gram) blir ikke anvendt. Mus blir utsatt for etterfølgende betingelsessykluser i et hypobart kammer i totalt 14 dager. Hver
20 24 timers-syklus består av 18 timer ved $0,40 \pm 0,02\%$ atmosfæretrykk og 6 timer ved omgivelsestrykk. Etter kondisjoneringen blir musene holdt ved et omgivelsestrykk i enda 72 timer før dosering.

- Testpeptider eller rekombinante humane EPO-standarder blir fortynnet i PBS + 0,1%
25 BSA-verktøy (PBS/BSA). Peptidmonomer stokkløsninger ble først løst i dimetylsulfoksid (DMSO). Negative kontrollgrupper inkluderer en gruppe mus som er injisert med PBS/BSA alene, og en gruppe injisert med 1% DMSO. Hver dosegruppe inneholder 10 mus. Mus blir injisert subkutan (i nakkehuden) med 0,5 ml av den passende prøven.

- 30 48 timer etter prøveinjeksjon blir musene gitt en intraperitoneal injeksjon med 0,2 ml Fe^{59} (Dupont, NEN), for en dose på ca. $0,75 \mu\text{Ci}/\text{mus}$. Musekroppsvekter blir bestemt 24 timer etter administrering av Fe^{59} og musene blir tatt livet av 48 timer etter Fe^{59} -administrering. Blod blir tatt fra hver prøve ved hjertepunktering og hematokritt blir
35 bestemt (heparin ble anvendt som antikoagulant). Hver blodprøve (0,2 ml) blir analysert for Fe^{59} -inkorporering ved å anvende en Packard gammateller. Ikke-

responsive mus (dvs. de mus som har radioaktiv inkorporering som er mindre enn den negative kontrollgruppen) blir eliminert fra det passende datasettet. Mus som har hematokrittverdier på mindre enn 53% av den negative kontrollgruppen blir også eliminert.

5

Resultater er utledet fra sett på 10 dyr fra hver eksperimentell dose. Den gjennomsnittlige mengden av radioaktivitet inkorporert (telling per minutt (CPM)) i blodprøver fra hver gruppe blir beregnet.

10 2. *Retikulocyt analyse*

Normale BDF1-mus blir dosert (0,5 ml, injisert subkutan) på tre etterfølgende dager med enten EPO-kontroll eller testpeptid. Ved dag tre blir mus også dosert (0,1 ml, injisert intraperitonealt) med jerndekstran (100 mg/ml). På dag fem blir mus anestetisert med CO₂ og tatt livet av ved hjertepunktering. Prosent (%) retikulocytter
15 for hver blodprøve blir bestemt ved tiazol oransjefarging og flowcytometer analyse (retic-tellingsprogram). Hematokritt blir manuelt bestemt. Den korrigerte prosenten med retikulocytter er bestemt ved å anvende den følgende formelen:

$$\%RETIC_{korrigert} = \%RETIC_{observert} \times (\text{Hematokritt}_{\text{individuell}} / \text{Hematokritt}_{\text{normal}})$$

20

3. *Hematologisk analyse*

Normale CD1-mus blir dosert med 4 ukentlige bolusintravenøse injeksjoner med enten EPO-positiv kontroll, testpeptid eller verktøy. Et område for positive kontroll og testpeptiddoser, uttrykt som mg/kg blir testet ved å variere konsentrasjonen av den aktive forbindelsen i formuleringen. Volumet injisert er 5 ml/kg.
25 Verktøykontrollgruppen omfatter 12 dyr, mens det er 8 dyr i hver av de gjenværende dosegruppene. Daglig viabilitet og ukentlige kroppsvekter blir nedtegnet.

De doserte musene fastes og blir så antestisert med å inhalere isofluran og terminale
30 blodprøver blir samlet ved hjelp av hjertepunktering eller punktering av abdominal aorta på Dag 1 (for verktøy kontrollmus) og på dagene 15 og 29 (4 mus/gruppe/dag). Blodet blir overført til Vacutainer® varemerkerør. Foretrukket antikoagulant er etylendiamintetraeddiksyre (EDTA).

35 Blodprøver blir evaluert for endepunktsmåling av rød blodsyntese og fysiologi slik som hematokritt (Hct), hemoglobin (Hgb) og total erytrocyttall (RBC) ved å anvende

automatiserte, kliniske analysatorer som er velkjente i fagfeltet (for eksempel de som er laget av Coulter, Inc.).

Eksempel 9: Syntese av EPO-R-agonistpeptid homodimerer til peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK (Sekv. Id. nr. 1)

Trinn 1 – Syntese av peptidmonomerer:

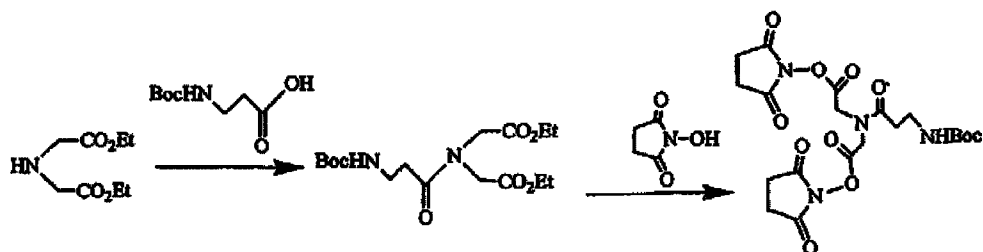
Peptidmonomerer syntetiseres ved å anvende standard Fmoc-kjemi på en ABI 431A peptidsyntesemaskin, ved å anvende TG-RAM resin (0,18 mmol/g Rapp polymer, Tyskland). For syntesen av peptidmonomerer med en amidert karboksyterminal ende, blir det fullstendig sammenstilte peptider kløvet fra resinnet med 82,5% TFA, 5% vann, 6,25% anisol, 6,25% etanditiol. Det avbeskyttede produktet filtreres fra resinnet og presipiteres med dietyleter. Etter nøye tørking, blir produktet renset med C18 reversfase høyutførelses flytende kromatografi med en gradient av acetonitril/vann i 0,1% trifluoreddiksyre. Strukturen av peptidet blir bekreftet ved hjelp av elektropray massespektrometri. Peptidmonomerene kan illustreres som følger:



Trinn 2 - Syntese av den trifunksjonelle linkeren:

Til en løsning med dietyliminoacetat (10,0 g, 52,8 mmol) og Boc-beta-alanin (10,0 g, 52,2 mmol) i 100 ml DCM ble det tilsatt diisopropylkarbodiimid (8,0 ml, 51,1 mmol) i løpet av 10 minutter ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble varmet til ~10 grader i løpet av tilsetningen, deretter kjølt tilbake til romtemperatur i løpet av 20 minutter. Reaksjonsblandingen fikk stå og røre over natt og den presipiterte diisopropylureaen ble filtrert av. Løsemiddelet ble fjernet under redusert trykk for å gi en gummi, og det gjenværende løst i etylacetat og igjen filtrert for å fjerne tilleggsprecipitert urea. Den organiske fasen ble plassert i en separeringstrakt, vasket (mettet NaHCO₃, saltløsning, 0,5 N HCl, saltløsning), tørket (MgSO₄), filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi diesterproduktet som en fargeløs olje. Diesteren ble tatt opp i en 1:1 blanding av MeOH:THF (100 ml) og til denne ble det tilsatt vann (25 ml), og så NaOH (5 g, 125 mmol). pH ble målt til å være større enn 10. Reaksjonsblandingen rørte ved romtemperatur i 2 timer og deretter ble den surgjort til pH 1 med 6N HCl. Den vandige fasen ble mettet med NaCl og ekstrahert 4 ganger med etylacetat. Den kombinerte, organiske fasen ble vasket (saltløsning), tørket (MgSO₄) og konsentrert under redusert trykk til å gi et hvitt halvfast stoff. Det faste stoffet ble løst i

- 50 ml DCM og til dette ble det tilsatt 300 ml heksan for å lage en hvit slamløsning. Løsemiddel ble fjernet under redusert trykk for å gi diacidet som et hvitt faststoff (14,7 g, 91,5% utbytte for 2 trinn). Til en løsning av diacidet (1 g, 3,29 mmol) i 20 ml DMF ble det tilsatt N-hydroksysuksinimid (770 mg, 6,69 mmol) og diisopropylkarbodiimid (1,00 ml, 6,38 mmol) og 4-dimetylaminopyridin (3 mg, 0,02 mmol).
- Reaksjonsblandingen ble rørt over natt og løsningsmiddelet fjernet under redusert trykk. Det gjenværende ble tatt opp i etylacetat og filtrert for å fjerne det presipiterte urea. Den organiske fasen ble plassert i en separeringstrakt, vasket (mettet NaHCO_3 , saltløsning, 0,5 N HCl, saltløsning), tørket (MgSO_4), filtrert og konsentrert under redusert trykk for å gi di-NHS esterproduktet som et hvitt faststoff (1,12 g, 68% utbytte).



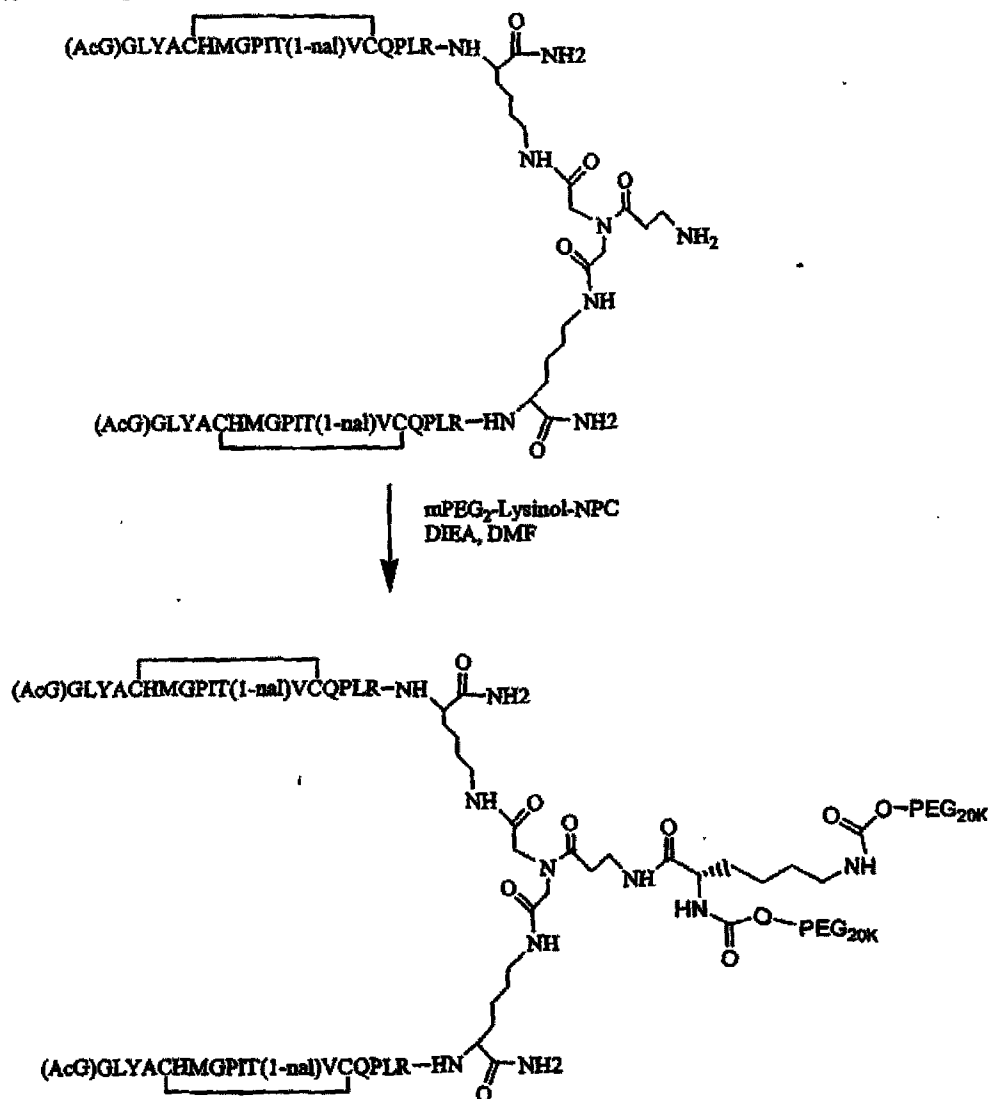
Trinn 3 – Kobling av den trifunksjonelle linkeren til peptidmonomerene:

- For kobling til linkeren, blir 2 ekv. peptid blandet med 1 ekv. trifunksjonell linker i tørr DMF til å gi en klar løsning og 5 ekv. av DIEA ble tilsatt etter 2 minutter. Blandingen røres ved omgivelsestemperatur i 14 timer. Løsemiddelet ble fjernet under redusert trykk og det råe produktet ble løst i 80% TFA i DCM i 30 min for å fjerne Boc-gruppen, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av dimeren ble bekreftet ved elektropray massespektrometri. Denne koblingsreaksjonen fester linkeren til nitrogenomet til ϵ -aminogruppen til lysinresidiet i hver monomer.

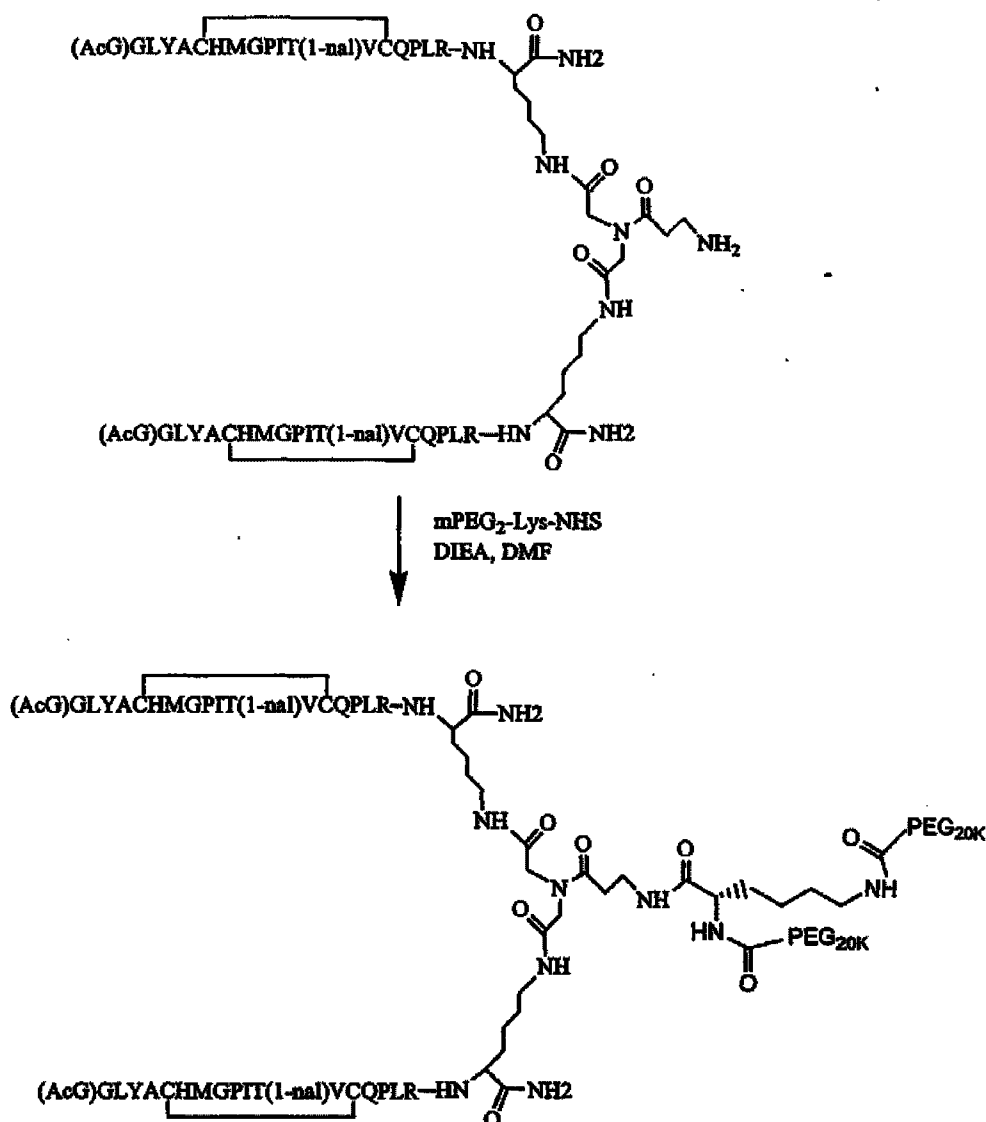
Trinn 5 – PEGylering av peptiddimeren:

PEGylering via en karbamatbinding:

- 5 Peptiddimeren og PEG-typerne (mPEG₂-lysinoI-NPC) blandes i et 1:2 molart forhold i tørr DMF for å gi en klar løsning. Etter 5 minutter blir 4 ekv. DIEA tilsatt til den ovenfor nevnte løsning. Blandingen røres ved omgivelsestemperatur i 14 t, etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid blir bekreftet ved MALDI-masse. Det rensede peptidet ble også utsatt for rensing via kation utbyttekromatografi som skissert under.



PEGylering via en amidbinding: Peptiddimeren og PEG-typene (mPEG₂-Lys-NHS fra Shearwater Corp, USA) ble blandet i et 1:2 molart forhold i tørr DMF for å gi en klar løsning. Etter 5 minutter blir 10 ekv. DIEA tilsatt til den ovenfor nevnte løsningen. Blandingen blir rørt ved omgivelsestemperatur i 2 timer etterfulgt av rensing med C18 reversfase HPLC. Strukturen av PEGylert peptid ble bekreftet ved MALDI-masse. Det rensede peptidet ble også utsatt for rensing via kation utbyttekromatografi som skissert under.



10 **Trinn 6 – Ionebytterensing av peptider:**

- Flere utbyttestøtter ble overveid for deres evne til å separere det ovenfor nevnte peptid-PEG-konjugatet fra ikke-reagert (eller hydrolysert) PEG, i tillegg til deres evne til å bevare de startdimere peptidene. Ionebytteresinen (2-3 g) ble ladet på en 1 cm kolonne, etterfulgt av omdannelse til natriumformen (0,2 N NaOH ladet på kolonne inntil eluatet var pH 14, ca. 5 kolonnevolumer), og deretter til hydrogenformen (eluert enten med 0,1 N HCl eller 0,1 M HOAc inntil eluatet traff ladnings-pH, ca. 5 kolonnevolumer), etterfulgt av vasking med 25% ACN/vann inntil pH 6. Enten så ble peptidet før konjugering eller peptid-PEG-konjugatet løst i 25% ACN/vann (10 mg/ml) og pH justert til <3 med TFA, deretter ladet på kolonnen. Etter vasking med 2-3 kolonnevolumer med 25% ACN/vann og oppsamling av 5 ml fraksjoner, ble peptidet frigjort fra kolonnen ved eluering med 0,1 M NH₄OAc i 25% ACN/vann, igjen oppsamling av 5 ml fraksjoner. Analyse via HPLC viste hvilke fraksjoner som inneholdt det ønskede peptidet. Analyse med en Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD) indikerte at når peptidet ble holdt tilbake på kolonnen og ble eluert med NH₄OAc-løsning (vanligvis mellom fraksjonene 4 og 10), så ble ingen ikke-konjugert PEG observert som en kontaminant. Når peptidet ble eluert i den initielle vaskebufferen (vanligvis de første 2 fraksjonene), ble ingen separering av ønsket PEG-konjugat og overskudd PEG observert.
- De følgende kolonnene beholdt vellykket både peptid og peptid-PEG-konjugatet og rensset vellykket peptid-PEG-konjugatet fra det ikke-konjugerte peptidet:

Tabell 5: Ionebytteresiner

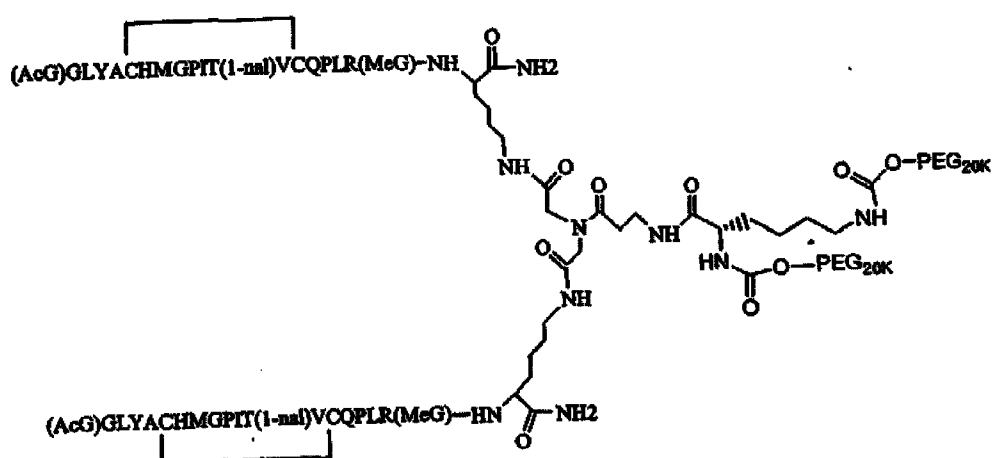
Støtte	Kilde
Mono S HR 5/5 sterk kationutbytte pre-ladet kolonne	Amersham Biosciences
SE53 Cellulose, mikrogranulær sterk kationutbyttestøtte	Whatman
SP Sefarose raskt strømming sterkt kationutbyttestøtte	Amersham Biosciences

- Eksempel 10: Syntese av EPO-R-agonistpeptid homodimerer til peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)K (Sekv. Id. nr. 1)**

EPO-R-agonistpeptid homodimerer til peptidmonomerer som har aminosyresekvensen (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)K (Seku. Id. nr. 2) blir syntetisert som beskrevet i Eksempel 1, unntatt at i Trinn 1 så er de syntetiserte peptidmonomerene:

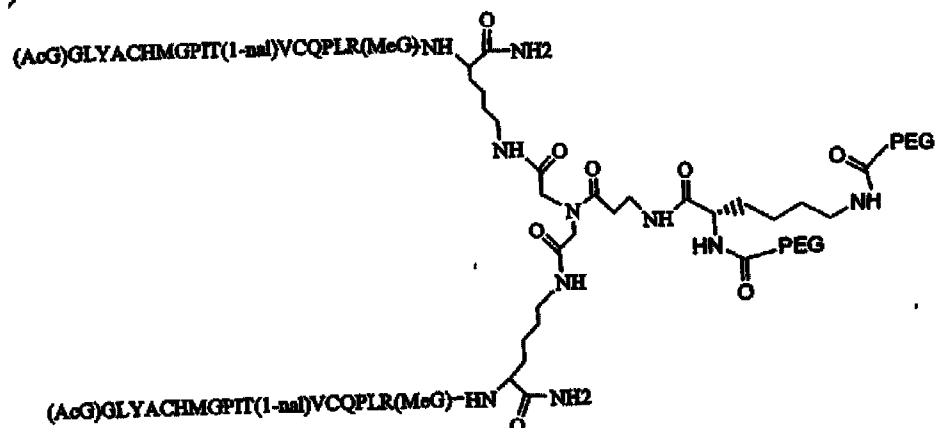


Der hvor PEG er festet til spaceren via karbamatkoblinger, så kan sluttproduktet av denne syntese illustreres strukturelt som følger:



10

Der hvor PEG er festet til spaceren via amidkoblinger, så kan sluttproduktet av denne syntese illustreres strukturelt som følger:



15 Eksempel 7: In vitro aktivitetsanalyser

Dette eksempel beskriver forskjellige in vitro-analyser som er nyttige i å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. Resultatene for disse analysene demonstrer at de nye peptidene i oppfinnelse binder seg til EPO-R og aktiverer EPO-R signalering. Videre så viser resultater for disse analyser at de nye
 5 peptidsammensetningene utviser en overraskende økning i EPO-R bindingsaffinitet og biologisk aktivitet sammenlignet med EPO-etterligningspeptider som tidligere er blitt beskrevet.

EPO-R-agonistpeptidmonomerer og dimerer lages ifølge fremgangsmåter tilveiebrakt i
 10 Eksempel 1 eller Eksempel 2. Potensen til disse peptiddimerer blir evaluert ved å anvende en rekke in vitro aktivitetsanalyser, inkludert: en reporteranalyse, en prolifereringsanalyse, en kompetitiv bindingsanalyse og en C/BFU-e-analyse. Disse fire analyser er beskrevet i videre detalj under.

15 Resultatene av disse in vitro aktivitetsanalyser er oppsummert i Tabell 2.

1. Reporteranalyse

Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje utledet reporter celle, Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux. Denne reporter cellelinje uttrykker en kimer reseptor som
 20 omfatter den ekstracellulære delen av den humane EPO-reseptoren og den intracellulære delen av den humane GCSF-reseptoren. Denne cellelinje blir videre transfektert med en fos-promoter-drevet luciferase reporter gen konstruksjon. Aktivering av denne kimere reseptor gjennom tilsetning av erytropoietisk middel resulterer i ekspresjonen av luciferase reporter genen, og derfor produksjonen av lys ved tilsetning av
 25 luciferasesubstratet, luciferin. Nivået av EPO-R-aktivering i slike celler kan dermed kvantiteres via måling av luciferaseaktivitet.

Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux-cellene dyrkes i DMEM/F12-medium (Gibco) supplementert med 10% fetalt bovint serum (FBS; Hyclone), 10% WEHI-3 supernatant
 30 (supernatanten fra en kultur med WEHI-3-celler, ATCC # TIB-68) og penicillin/streptomycin. Ca. 18 timer før analysen, blir cellene sultet ved å overføre dem til DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-supernatant. På dagen for analyse blir cellene vasket en gang med DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant), deretter blir 1×10^6 celler
 35 per ml dyrket i nærværet av en kjent konsentrasjon med testpeptid, eller med EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) som en positiv kontroll, i DMEM/F12-medium

supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). Seriefortynninger av testpeptidet blir samtidig testet i denne analyse. Analyseplater innkuberes i 4 timer ved 37°C i en 5% CO₂-atmosfære, deretter blir luciferin (Steady-Glo; Promega, Madison, Wi) tilsatt til hver brønn. Etter en 5-minutters innkubering blir lyseemisjon målt på et
 5 Packard Topcount Luminometer (Packard Instrument Co., Downers Grove, Ill). Lystellinger blir plottet relativt til testpeptidkonsentrasjon og analysert ved å anvende GraphPad software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halv-maksimal emisjon av lys er nedtegnet som EC50.

10 2. *Prolifereringsanalyse*

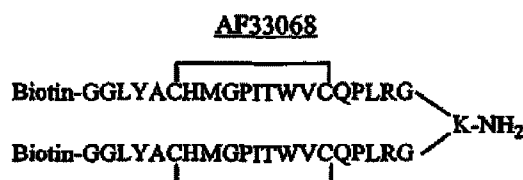
Denne analyse er basert på en muse pre-B-cellelinje, Baf3, transfektert til å uttrykke humant EPO-R. Prolifisering av den resulterende cellelinjen BaF3/Gal4/Elk/EPOR er avhengig av EPO-R-aktivering. Graden av celleprolifisering blir kvantitert ved å anvende MTT, hvor signalet i MTT-analysen er proporsjonalt til antallet viable celler.

15 BaF3/Gal4/Elk/EPOR-cellene dyrkes i spinnerflasker i DMEM/F12-medium (Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone) og 2% WEHI-3-supernatant (ATCC # TIB-68). Dyrkede celler sultes over natt i en spinnerflaske ved en celletetthet på 1×10^6 celler/ml, i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS og 0,1% WEHI-3-supernatant. De
 20 sultede cellene blir så vasket to ganger med Dulbeccos PBS (Gibco) og resuspendert til en tetthet på 1×10^6 celler/ml i DMEM/F12 supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant). 50 µl alikvoter (~50 000 celler) av celleduspensjonen blir så utplatet i triplikat i 96-brønners analyseplater. 50 µl alikvoter av fortynningsserier med test-EPO etterligningspeptider, eller 50 µl EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis,
 25 MN) eller AranespTM (darbepoeitin alfa, en EPO-R-agonist kommersielt tilgjengelig fra Amgen) i DMEM/F12-medium supplementert med 10% FBS (ingen WEHI-3-supernatant) ble tilsatt til de 96-brønners analyseplatene (sluttvolum per brønn er 100 µl). For eksempel så kan 12 forskjellige fortynninger testes hvor sluttkonsentrasjonen av testpeptid (eller kontroll EPO-peptid) er i området fra 810 pM til 0,0045 pM. De
 30 utplatede cellene blir så innkubert i 48 t ved 37°C. Deretter blir 10 µl MTT (Roche Diagnostics) tilsatt til hver kulturplatebrønn og deretter får de lov å innkubere i 4 timer. Reaksjonen blir så stoppet ved å tilsette 10% SDS + 0,01 N HCl. Platene ble så innkubert over natt ved 37°C. Absorbans av hver brønn ved en bølgelengde på 595 nm blir så målt ved spektrofotometri. Plott av absorbanslesningene mot
 35 testpeptidkonsentrasjon blir konstruert og EC50 beregnet ved å anvende GraphPad

software. Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en halv-maksimal absorbans blir nedtegnet som EC50.

3. *Kompetitiv bindingsanalyse*

- 5 Kompetitive bindingsberegninger ble gjort ved å anvende en analyse hvor et lyssignal genereres som en funksjon av nærheten av to kuler: en streptavidin donorkule som bærer en biotinyllert EPO-R-bindende peptidtracer og en akseptorkule som har bundet til seg EPO-R. Lys dannes ved ikke-strålings energioverføring, når et enkelt oksygen blir frigjort fra en første kule ved eliminering, og kontakt med det frigjorte enkle oksygenet
- 10 forårsaker at den andre kulen emitterer lys. Disse kulesett er kommersielt tilgjengelige (Packard). Kulenærhet dannes ved bindingen av den EPO-R-bindende peptidtraceren til EPO-R. Et testpeptid som konkurrerer med EPO-R-bindingspeptidtraceren for binding til EPO-R vil forhindre denne binding og forårsake en nedgang i lysemisjon.
- 15 I mer detalj så er fremgangsmåten som følger: Tilsett 4 µl seriefortynninger av test-EPO-R-agonistpeptidet, eller positive eller negative kontroller, til brønner i en 384 brønners plate. Deretter, tilsett 2 µl/brønn reseptor/kulecoctail. Reseptorkulecoctail består av: 15 µl 5 mg/ml streptavidin donorkuler (Packard), 15 µl 5 mg/ml monoklonalt antistoff ab179 (dette antistoff gjenkjenner delen av det humane, placentale, alkaliske
- 20 fosfataseproteinet som finnes i det rekombinante EPO-R), protein A-overtrukne akseptorkuler (protein A vil binde seg til ab179 antistoffet; Packard), 112,5 µl av en 1:6,6 fortynning med rekombinant EPO-R (produsert i kinesiske hamster ovarieceller som et fusjonsprotein til en del av det humane, placentale, alkalisk fostataseproteinet som finnes innen ab179 målepitopen) og 607,5 µl Alphaquest buffer (40 mM HEPES,
- 25 pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 0,1% BSA, 0,05% Tween 20). Knips for å blande. Tilsett 2 µl/brønn av den biotinyllerte EPO-R-bindingspeptidtraceren, AF33068 (30 nM sluttkonsentrasjon). AF33068, et EPO-R-bindende peptid (se Tabell 3 "Reporter EC50 (pm)"), lages ifølge fremgangsmåtene beskrevet i Eksempel 1.



Sentrifuger 1 minutt for å blande. Forsegl platen med Packard Top forsegling og pakk inn i folie. Innkuber over natt ved romtemperatur. Etter 18 timer lese lyseemisjon ved å anvende en AlphaQuest leser (Packard). Plott lyseemisjon mot konsentrasjon av peptid og analyser med Graph Pad eller Excel.

5

Konsentrasjonen av testpeptid som resulterer i en 50% nedgang i lyseemisjon, i forhold til den som er observert uten testpeptid, nedtegnes som IC50.

4. C/BFU-e-analyse

- 10 EPO-R-signalering stimulerer differensieringen av benmarg stamceller til proliferende røde blodcelleforløpere. Denne analyse måler evnen testpeptidene har til å stimulere prolifereringen og differensieringen av røde blodcelleforløpere fra primære, humane benmargs pluripotente stamceller.

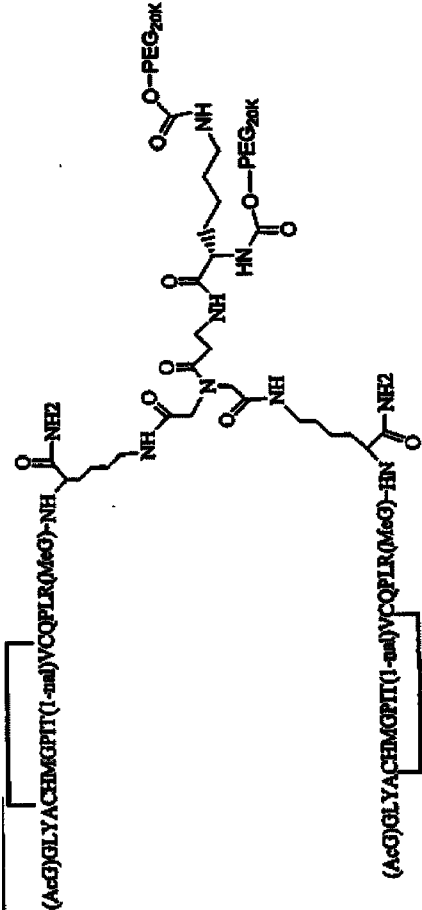
- For denne analysen blir seriefortynninger av testpeptid gjort i IMDM-medium (Gibco) supplementert med 10% FBS (Hyclone). Disse seriefortynninger eller positivt kontroll EPO-peptid, blir så tilsatt til metylcellulose for å gi et sluttvolum på 1,5 ml.

- Metylcellulosen og peptidblandingen blir så vortekset kraftig. Alikvoter (100 000 celler/ml) med humane benmargsutledede CD34+ celler (Poietics/Cambrex) tines. De tinede cellene blir forsiktig tilsatt til 0,1 ml av 1 mg/ml DNase (stamceller) i et 50 ml
- 20 rør. Deretter blir 40-50 ml IMDM-medium tilsatt forsiktig til cellene: mediet blir tilsatt dråpe for dråpe langs siden av det 50 ml røret for de første 10 ml, og deretter blir det gjenværende volumet langsomt fordelt langs siden av røret. Cellene blir så spunnet ved 900 rpm i 20 minutter og mediet forsiktig fjernet ved forsiktig aspirering. Cellene resuspenderes i 1 ml IMDM-medium og celletetthet per ml telles på hemacytometer

- 25 objektglass (10 µl alikvot med celleduspensjon på objektglasset, og celletetthet er den gjennomsnittlige telling x 10 000 celler/ml). Cellene blir så fortynnet i IMDM-medium til en celletetthet på 15 000 celler/ml. 100 µl fortynnede celler blir så tilsatt til hver 1,5 ml metylcellulose pluss peptidprøve (sluttcellekonsentrasjon i analysemedium er 1 000 celler/ml), og blandingen blir vortekset. Tillat at boblene i blandingen forsvinner og aspirer så 1 ml ved å anvende nål med avkuttet ende. Tilsett 0,25 ml aspirert blanding fra hver prøve til hver av 4 brønner i en 24-brønners plate (Falcon varemerke).

- Innkuber de utplatede blandingene ved 37°C under 5% CO₂ i en humid inkubator i 14 dager. Skår for tilstedeværelsen av erytroidkolonier ved å anvende et fasemikroskop (5X-10X objektiv, sluttforstørrelse på 100X). Konsentrasjonen av testpeptidet hvor
- 35 antall dannede kolonier er 90% av maksimum, i forhold til den som blir observert med den EPO-positiv kontrollen, blir nedtegnet som EC90 (se Tabell 2: C/BFU-e EC90).

Tabell 6: In vitro aktivitätsanalyser for peptiddimerer

Forbindelse- betegnelse	Peptiddimer	Reporter EC50 (pM)	Proliferering EC 50 (nM)	Radioligand IC50 (pM)	C/BFU-e EC90 (nM)
AF37702		195	165	111	3

Eksempel 12: In vivo aktivitetsanalyser

Dette eksempel beskriver forskjellige in vivo-analyser som er nyttige for å evaluere aktiviteten og potensen til EPO-R-agonistpeptider i oppfinnelsen. EPO-R-agonistpeptidmonomerer og dimerer lages ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt i Eksempel 1. In vivo-aktiviteten til disse peptidmonomerer og dimerer evalueres ved å anvende en rekke analyser, inkludert en polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse og en retikulocyt analyse. Disse to analyser er beskrevet videre i detalj under.

1. *Polycytemisk ekshypoksisk muse-bioanalyse*

Testpeptider blir analysert for in vivo-aktivitet i den polycytemiske ekshypoksiske muse-bioanalysen adaptert fra fremgangsmåten som er beskrevet av Cotes and Bangham (1961), Nature 191: 1065-1067. Denne analyse undersøker evnen et testpeptid har til å fungere som en EPO-etterligner: dvs. til å aktivere EPO-R og å indusere syntese av nye røde blodceller. Rød blodcellesyntese blir kvantitert basert på inkorporering av radioaktivt merket jern i hemoglobin i de syntetiserte røde blodceller.

BDF1-mus får akklimatisere seg til omgivelsesbetingelser i 7-10 dager. Kroppsvekter blir bestemt for alle dyr og dyr med lav vekt (<15 gram) blir ikke anvendt. Mus blir utsatt for etterfølgende betingelsessykluser i et hypobart kammer i totalt 14 dager. Hver 24 timers-syklus består av 18 timer ved $0,40 \pm 0,02\%$ atmosfæretrykk og 6 timer ved omgivelsestrykk. Etter kondisjoneringen blir musene holdt ved et omgivelsestrykk i enda 72 timer før dosering.

Testpeptider eller rekombinante humane EPO-standarder blir fortynnet i PBS + 0,1% BSA-verktøy (PBS/BSA). Peptidmonomer stokkløsninger ble først løst i dimetylsulfoksid (DMSO). Negative kontrollgrupper inkluderer en gruppe mus injisert med PBS/BSA alene, og en gruppe injisert med 1% DMSO. Hver dosegruppe inneholder 10 mus. Mus blir injisert subkutan (i nakkehuden) med 0,5 ml av den passende prøven.

48 timer etter prøveinjeksjon blir musene gitt en intraperitoneal injeksjon med 0,2 ml Fe^{59} (Dupont, NEN), for en dose på ca. $0,75 \mu\text{Curi/mus}$. Musekroppsvekter blir bestemt 24 timer etter administrering av Fe^{59} og musene blir tatt livet av 48 timer etter Fe^{59} -administrering. Blod blir samlet fra hvert dyr ved hjertepunktering og hematokritt blir bestemt (heparin ble anvendt som antikoagulant). Hver blodprøve (0,2 ml) blir analysert for Fe^{59} -inkorporering ved å anvende en Packard gammateller. Mus som ikke responderer (dvs. de mus som har radioaktiv inkorporering som er mindre enn den

negative kontrollgruppen) blir eliminert fra det passende datasettet. Mus som har hematokrittverdier som er mindre enn 53% av den negative kontrollgruppen blir også eliminert.

Resultater er utledet fra sett på 10 dyr for hver eksperimentell dose. Den gjennomsnittlige mengden av radioaktivitet inkorporert (telling per minutt (CPM)) i blodprøver fra hver gruppe blir beregnet.

2. *Retikulocyt analyse*

Normale BDF1-mus blir dosert (0,5 ml, injisert subkuttant) på tre etterfølgende dager med enten EPO-kontroll eller testpeptid. Ved dag tre blir mus også dosert (0,1 ml, injisert intraperitonealt) med jerndekstran (100 mg/ml). På dag fem blir mus anestetisert med CO₂ og blødd i hjel ved hjertepunktering. Prosent (%) retikulocytter for hver blodprøve blir bestemt ved tiazol oransjefarging og flowcytometer analyse (retic-tellingsprogram). Hematokritt blir manuelt bestemt. Den korrigerte prosent med retikulocytter er bestemt ved å anvende den følgende formelen:

$$\%RETIC_{korrigert} = \%RETIC_{observert} \times (\text{Hematokritt}_{\text{individuell}} / \text{Hematokritt}_{\text{normal}})$$

3. *Hematologisk analyse*

Normale CD1-mus blir dosert med 4 ukentlige bolusintravenøse injeksjoner med enten EPO-positiv kontroll, testpeptid eller verktøy. Et område med positive kontroller og testpeptiddoser, uttrykt som mg/kg blir testet ved å variere konsentrasjonen av den aktive forbindelsen i formuleringen. Volumet injisert er 5 ml/kg.

Verktøykontrollgruppen omfatter 12 dyr, mens det er 8 dyr i hver av de gjenværende dosegruppene. Daglig viabilitet og ukentlige kroppsvekter blir nedtegnet.

De doserte mus blir fastet og deretter antestisert med inhalert isofluran og terminale blodprøver blir samlet ved hjelp av hjertepunktering eller punktering av abdominal aorta på Dag 1 (for verktøy kontrollmus) og på dagene 15 og 29 (4 mus/gruppe/dag). Blodet blir overført til Vacutainer® varemerkerør. Foretrukket antikoagulant er etyldiamintetraeddiksyre (EDTA).

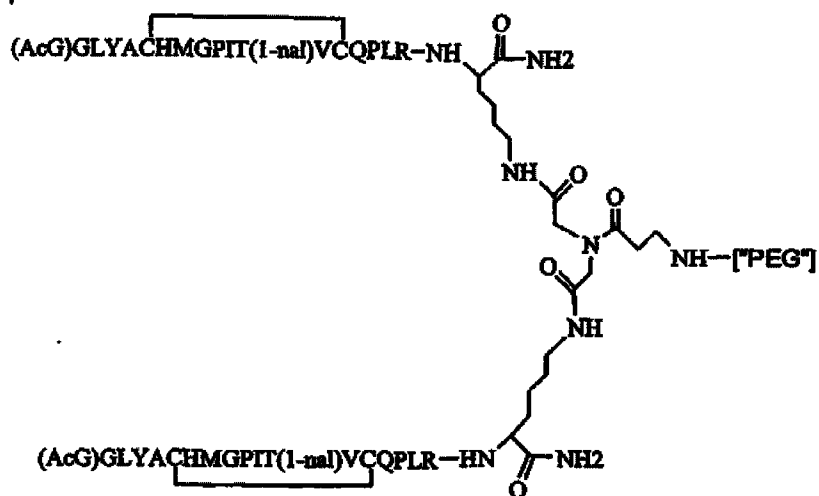
Blodprøver blir evaluert for endepunktsmåling av rød blodsyntese og fysiologi slik som hematokritt (Hct), hemoglobin (Hgb) og total erytrocyttall (RBC) ved å anvende

automatiserte, kliniske analysatorer som er velkjente i fagfeltet (for eksempel de som er laget av Coulter, Inc.).

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R),
k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en
peptiddimer som har formelen:

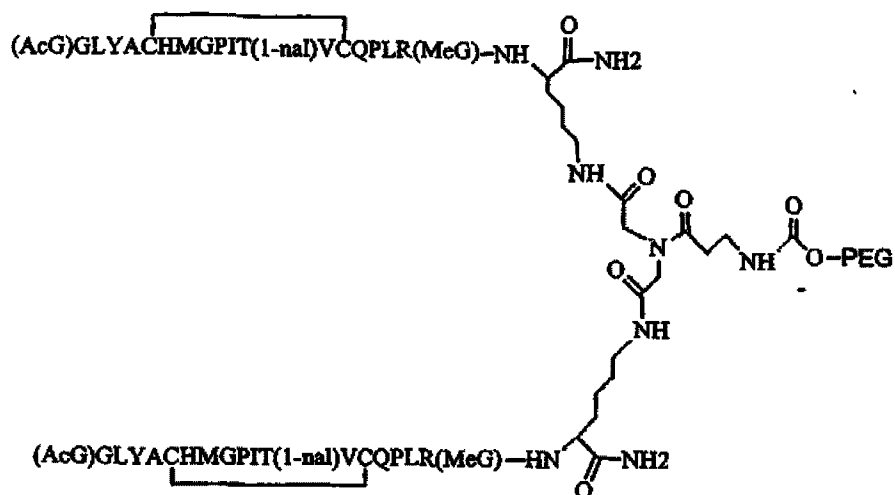


hvor

- (i) i hver peptidmonomer i peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortning, AcG er N-acetylglysin og 1-naI er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intermolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene i hver monomer
- (iii) [”PEG”] omfatter minst en lineær polyetylenglykol (PEG)-enhet, hver PEG-enhet har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

2.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), karakterisert ved at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

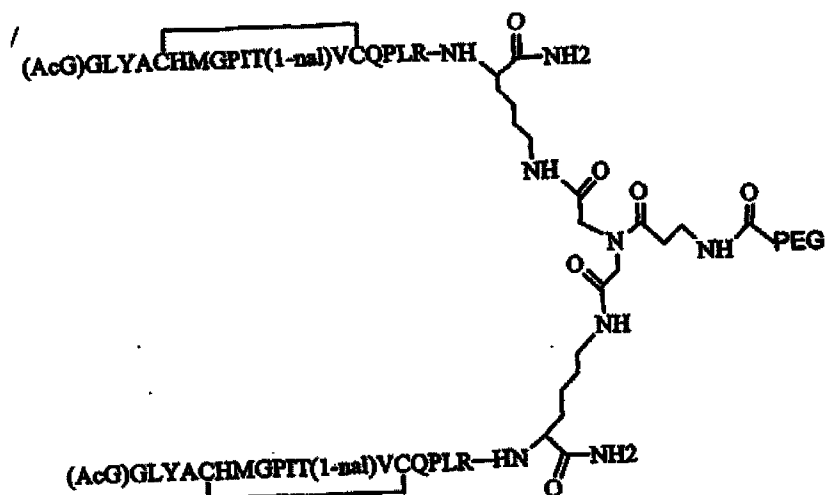


hvor

- (i) i hver peptidmonomer i peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin og MeG er N-metylglysin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene i hver monomer
- (iii) PEG omfatter et lineært, uforgrenet polyetylenglykolmolekyl som har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

3.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

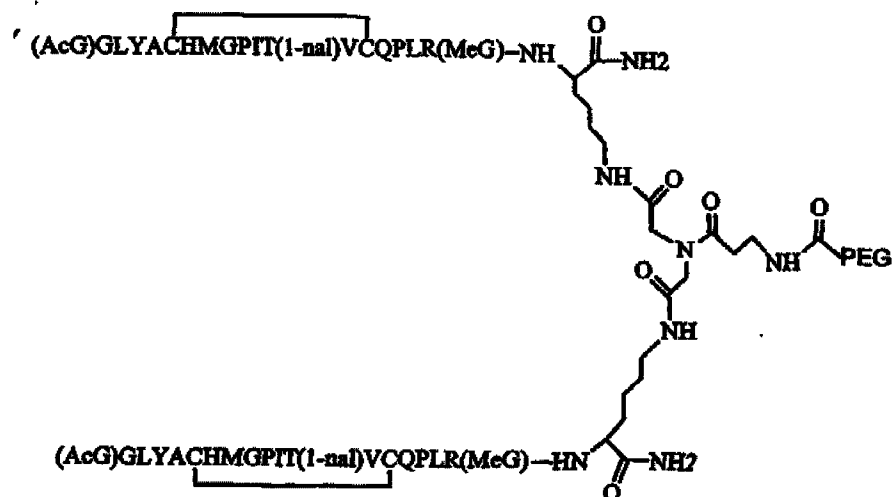


hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intermolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter et lineært, uforgrenet polyetylenglykolmolekyl som har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

4.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), karakterisert ved at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

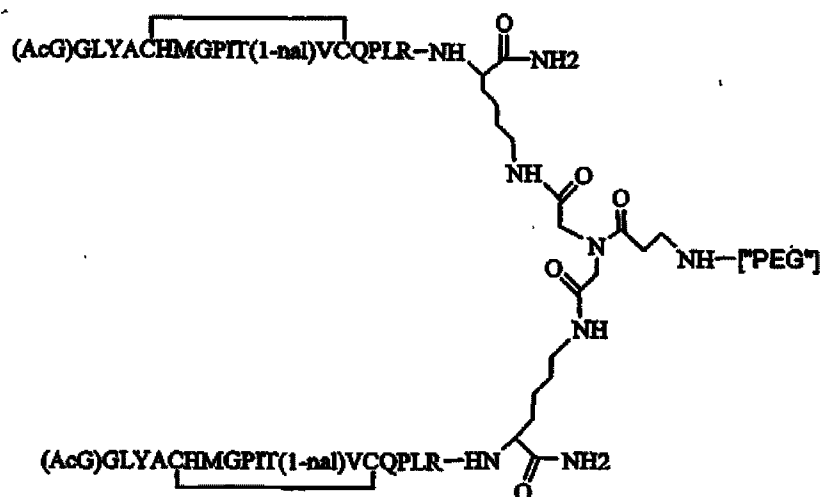


hvor

- (i) i hver peptidmonomer i peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin, 1-nal er 1-naftylalanin og MeG er N-metylglysin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter et lineært, uforgrenet polyetylenglykolmolekyl som har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

5.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

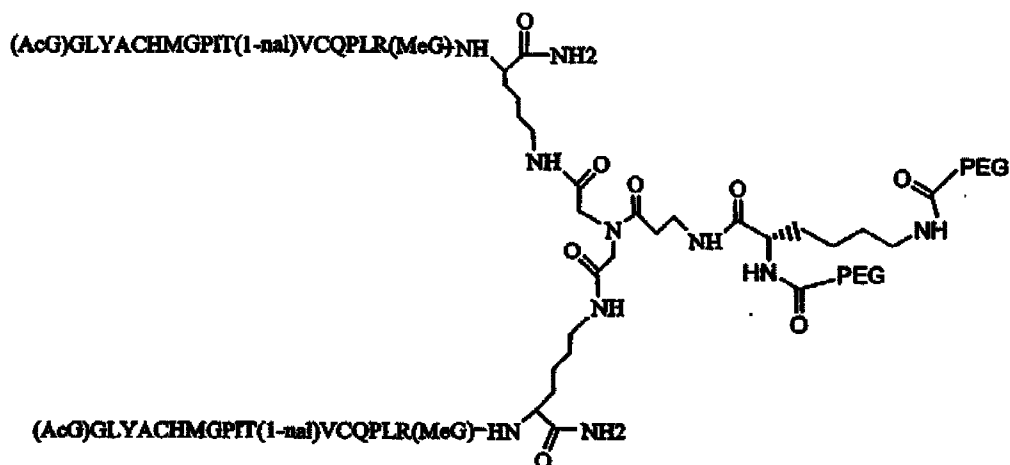


hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) [”PEG”] omfatter minst to lineære polyetylenglykol (PEG)-enheter koblet ved et enkelt punkts festing og som har en kombinert molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 60 000 daltons.

6.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

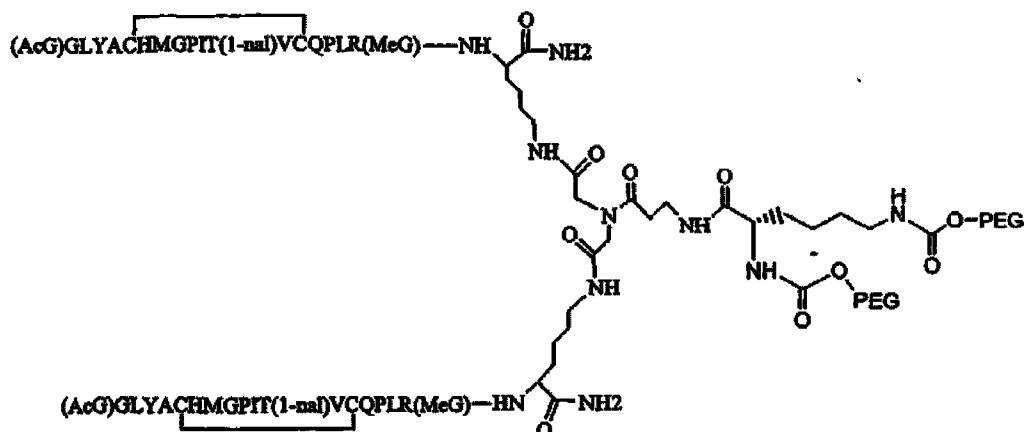


hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin, 1-nal er 1-naftylalanin og MeG er N-metylglysin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter to lineære polyetylenglykol (PEG)-enheter som har en kombinert molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 30 000 daltons.

7.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), karakterisert ved at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

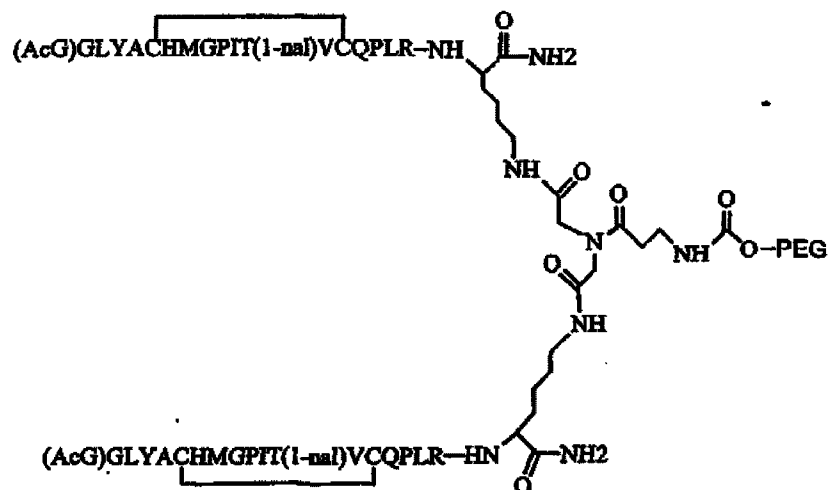


hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-nal er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter to lineære polyetylenglykol (PEG)-enheter som har en kombinert molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 30 000 daltons.

8.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:

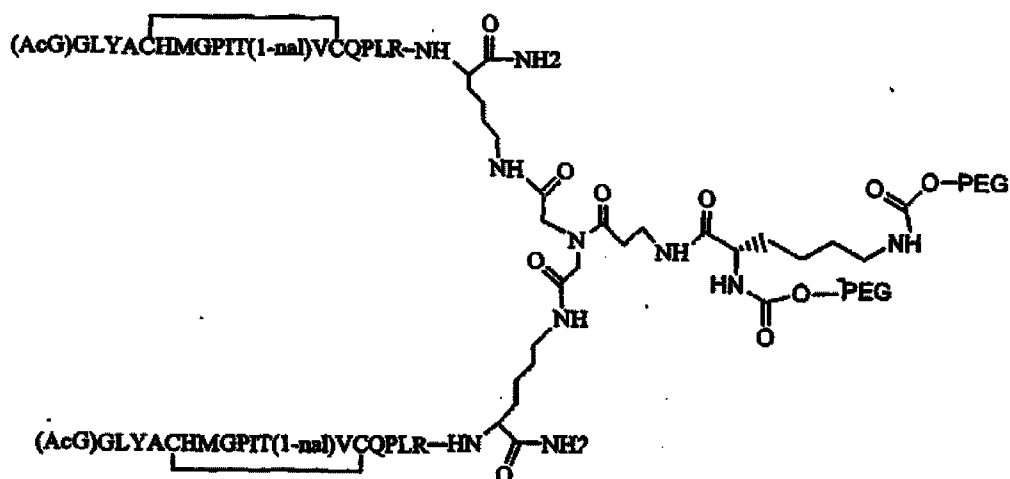


hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og 1-naI er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter et lineært, uforgrenet polyetylenglykol (PEG)-enhet som har en molekylvekt på ca. 20 000 til ca. 40 000 daltons.

9.

Forbindelse som binder seg til og aktiverer erythropoietinreseptoren (EPO-R), k a r a k t e r i s e r t v e d at forbindelsen omfatter en peptiddimer som har den følgende formelen:



hvor

- (i) i hver peptidmonomer av peptiddimeren så er hver aminosyre indikert ved standard en-bokstavs forkortelse, AcG er N-acetylglysin og, 1-nal er 1-naftylalanin;
- (ii) hver peptidmonomer i peptiddimeren inneholder en intramolekyl disulfidbinding mellom de to cystein (C)-residiene til hver monomer
- (iii) PEG omfatter to lineære polyetylen glykol (PEG)-enheter som har en kombinert molekylvekt på ca. 10 000 til ca. 60 000 daltons.

10.

Forbindelse ifølge krav 1-4, k a r a k t e r i s e r t v e d at hver PEG har en molekylvekt på ca. 30 000 daltons.

11.

Forbindelse ifølge ethvert av kravene 5-7, k a r a k t e r i s e r t v e d at PEG har en molekylvekt på ca. 20 000 daltons.

12.

Forbindelse ifølge ethvert av kravene 1-4 og 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at PEG har en molekylvekt på ca. 30 000 til 40 000 daltons.

13.

Anvendelse av forbindelsen ifølge ethvert av de foregående krav for fremstilling av et medikament for behandling som har en forstyrrelse kjennetegnet ved en mangel på erythropoietin eller en lav eller defekt rød blodcelle populasjon.

14.

Anvendelse av forbindelsen ifølge krav 13 der forstyrrelsen er valgt fra gruppen som består av terminal stadium, nyrefeil eller dialyse; anemi assosiert med AIDS, autoimmun sykdom eller en ondartethet; beta-talassemi; cystisk fibrose; tidlig anemi til prematuritet; anemi assosiert med kronisk inflammatorisk sykdom; ryggmargsskade; akutt blodtap; aldring; og neoplastiske sykdomstilstander fulgt av unormal erytropoiese.

15.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter forbindelsen ifølge krav 1 - 12 og en farmasøytisk akseptabel bærer.