

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

347

Re: P1.-F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.-Expediente número
00-048.963.-

1. Me refiero al memorial de sustitución de poder presentado a ese Despacho el 31 de Agosto de 2004.

2. Por medio del presente, atentamente me permito manifestar a ese Despacho, que hubo un cambio de Representante Legal para todos los asuntos de la Propiedad Industrial en Bogotá de **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Basilea, Suiza.

3. En consecuencia, atentamente solicito a ese Despacho reconocerme personería, en este asunto, de conformidad con el documento de Representación Legal para todos los asuntos de la Propiedad Industrial en Bogotá de la sociedad **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, otorgado a favor del **SUSCRITO (GUSTAVO TAMAYO)** y/o a la doctora ALICIA LLOREDA y/o al doctor IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ de acuerdo con la copia debidamente autenticada ante Notario Público que adjunto al presente expediente (Artículos 26 y 39 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones).

4. Anexo al presente acompaño fotocopia, de:

- (a) Documento que acredita al SUSCRITO y/o a la doctora ALICIA LLOREDA y/o al doctor IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ en los términos del parágrafo 1º. del Artículo 543 del Decreto-Ley 410 de 1971, como Representantes Legales en Bogotá para todos los asuntos relacionados con la propiedad industrial de la sociedad **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Basilea, Suiza.

334
343

(b) Certificación Notarial expedida el 17 de Agosto de 2004; y

(c) Traducción Oficial correspondiente a las partes pertinentes del documento anterior, también debidamente legalizada hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores bajo el número 258651 de 3 de Septiembre de 2004.

5. Finalmente, llamo la atención de ese Despacho al hecho de que la copia auténtica del documento que me acredita para actuar como Representante Legal de la sociedad peticionaria, reposa en el Expediente número **98-014.527**.

6. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y continuar con el trámite correspondiente.

Señor Superintendente,


GUSTAVO TAMAYO
T.P. 37.172
Código 231

NOTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August , 2004 , personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997 , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

Dr. P. Kuster
Notar

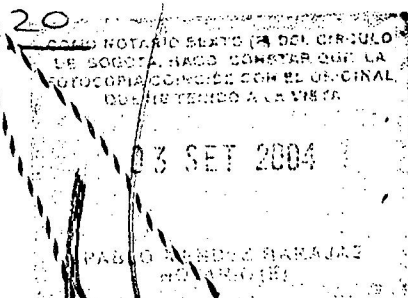
17.08.2004

2 Fr.

Dr. PETER KUSTER

Allg. Prot. — 4

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



OFFICIAL AUTHENTICATION

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. R. P. Kuster

3. in his/her function as Att. Noter

4. and certified by the seal of the Canton

Certified

18. Aug. 2004

5. in Basel (Bâle)

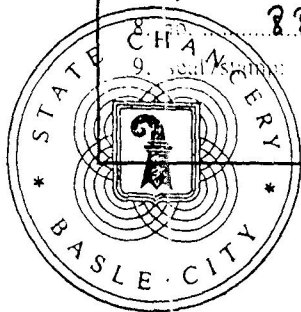
6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. File No. 8835 / 13 276

9. Seal/Stamp

10. Signature: [Signature]



COMO NOTARIO PERTENECIENTE AL CIRCULO
DE EDUCOTA, NUESTRO CONCEPTO ES LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HA TRAMITO A LA VISTA

03 SET 2004

JOSE MANUEL HERRERA
NOTARIO

337
346

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLORED A y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004

DE BOGOTÁ, HA DE CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE EL TENEDOR A LA VISTA

03 SET 2004

ABLA MERCEDES URICOECHA

Abla Mercedes Uricoechea

Abla Mercedes Uricoechea T.
Traductora Juramentada
Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

758651
Manq Uncoachea
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET - 3 P 12: 12

MCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

7
03 SET 2004
RECEIVED
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
BOGOTA D.C.

330
247
375
2005-09-15

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor
GUSTAVO TAMAYO
(Apoderado)
F.HOFFMANN-LA ROCHE A.G.

ASUNTO	Radicación	00-48963
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	
	Folios	

8384

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

- ❖ Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 4 a 37)
- ❖ Las reivindicaciones 1 a 28 (Folios: 324 a 332)
- ❖ Lista de secuencias folios 38-41.

La presente solicitud reivindica prioridad US N° 60/142.254 de 2 de julio de 1999 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

El objeto de la presente solicitud se refiere a un conjugado de eritropoyetina que comprende una glicoproteína con al menos un grupo amino libre, que presenta la secuencia de la EPO human con la adición entre 1 a 6 sitios de glicosilación o una nueva disposición de al menos un sitio de glicosilación, donde dicha glucoproteína se encuentra unida covalentemente a "n" grupos polientilenglicol de formula $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$, en donde x es 2 o 3, m se encuentra entre 450 y 900 y n se encuentra entre 1 y 3. El conjugado menos la proteína debe estar entre 20 y 100 kilodaltons. También hacen parte de la invención las composiciones que contienen el conjugado, el proceso de preparación de dicho conjugado que comprende la condensación del compuesto de formula II y el uso de los compuestos mencionados anteriormente en el tratamiento de enfermedades como anemia, fallo renal crónico (CRF), SIDA y otros.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C12N 5/00, A61K 38/17.

339
2-358

Claridad de la solicitud:

El artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción."

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

Las reivindicaciones 1 y 11 reclaman una glicoproteína que posee la secuencia de la EPO humana, con la adición entre 1 y 6 sitios de glicosilación o la modificación de al menos un sitio de los ya existentes. En esta cláusula no se definen las posiciones de las glicosilaciones adicionales o las modificaciones a estas y por lo tanto no se puede establecer con claridad cual es la molécula exacta a proteger.

La reivindicación 26 reclama un proceso para la preparación de los conjugados, cuyo proceso comprende la condensación del compuesto de fórmula II. Dado que los procedimientos deben definirse en términos de la secuencia lógica de etapas que comprenden y mediante las condiciones físicas y químicas a las cuales se llevan a cabo, se establece que la cláusula en mención no efectúa una ilustración clara del proceso que se pretende proteger.

Las reivindicaciones 25 y 28 están definiendo los conjugados o compuestos en términos del resultado que se espera alcanzar con estos, y no en virtud de sus características propias. De esta forma se conceptúa que las cláusulas en mención no son claras pues no definen adecuadamente la materia a proteger.

De acuerdo con lo anterior, las reivindicaciones 1, 6 y 26 no cumplirían con el requisito de claridad según el artículo 30 de la Decisión de la Comisión de la Comunidad Andina de Naciones.

Evaluación de la Unidad de Invención:

El artículo 25 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo."

En la presente solicitud se identifica más de un objeto de invención.

La reivindicación 1 y dependientes reclaman un conjugado de EPO al cual se le han adicionado o modificado sitios de glicosilación y a la cual se le ha condensado el compuesto de la fórmula II.

La reivindicación 13 por su parte, reclama un conjugado en donde la glucoproteína presenta la secuencia de la EPO humana más una secuencia unida por su extremo carboxilo que corresponde al extremo carboxilo de la gonadotropina humana.

Siendo que la reivindicación número 1 no contempla la adición de otros péptidos a la secuencia de la EPO, se considera que el conjugado de la cláusula 13 constituye una invención diferente a aquella reclamada en la reivindicación 1.

Según lo anterior, la(s) reivindicación(es) 1 y dependientes no guarda(n) unidad de invención con la reivindicación 13 y dependientes.

340
349

Excepciones de Patentabilidad:

El artículo 20 de la Decisión 486 se establece: "No serán patentables: a) las invenciones cuya explotación comercial en el territorio del País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger el orden público o la moral. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria al orden público o a la moral solo debido a la existencia de una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación; b) las invenciones cuya explotación comercial en el País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger la salud o la vida de las personas o de los animales, o para preservar los vegetales o el medio ambiente. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria a la salud o la vida de las personas, de los animales, o para la preservación de los vegetales o del medio ambiente sólo por razón de existir una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación; c) las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos; d) los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales."

Las reivindicaciones 25 y 28 aun cuando no están encabezadas como métodos de tratamiento hacen referencia expresa a estos, no se identifica ninguna característica del compuesto reclamado más allá del método de tratamiento, y por esta razón podrían estar exceptuadas de patentabilidad según el literal d) del artículo 20 de la Decisión 486.

Reivindicaciones de uso:

El artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Las reivindicación 25 reclama un conjugado "para ser usado en la preparación de medicamentos para el tratamiento...". A pesar de no encabezarse por el uso, esta cláusula pretende la protección de un uso terapéutico y de esta forma no se encontraría dentro del alcance del artículo 14 de la Decisión 486.

De acuerdo con lo anterior, la(s) reivindicación(es): (:
, no se encuentran dentro del campo de la patentabilidad nombrado en el artículo 14.

Determinación del estado de la técnica:

El artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de Patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40".

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 2 de julio de 1999, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

341
350
4

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	EP0640619	Erithropoeitin analogs with additional glycosylation sites.	1995-03-01

Evaluación de los requisitos de Patentabilidad:

El Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina el cual establece: "Los Países Miembros otorgarán Patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

Evaluación de Nivel Inventivo:

El artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La solicitud en estudio reclama conjugados de Eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o mediante una nueva disposición de al menos un sitio de glicosilación, conjugada a grupos polietilenglicol de formula – CO-(CH₂)_x-(OCH₂CH₂)_m-OR.

La anterioridad EP0640619, de ahora en adelante denominada D1, revela la EPO humana y análogos con al menos un sitio de glicosilación modificado.

La modificación de los sitios de glicosilación con el objeto de obtener mejores propiedades farmacocinéticas de la proteína podría resultar obvia, más aún cuando ya había sido sugerido en la anterioridad D1 dicha modificación. Por otra parte el reemplazo de algunos carbohidratos por unos polihidroxihidrocarburos como el polietilenglicol, podrían ser evidentes para un técnico versado en la materia, siendo que las propiedades de estos compuestos tienden a ser similares debido a los átomos componentes y a la longitud de sus cadenas.(de los compuestos condensados a la glicoproteína reivindicados).

342
251
5

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

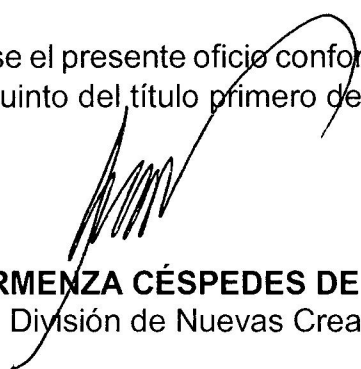
Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	EP0640619	1 y dependientes	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 11.5 SET. 2005

CONCEPTO TÉCNICO Nº: 1376	EXAMINADOR TÉCNICO Código N°: 202063	EXAMINADOR JURÍDICO Código N°: N.A.
------------------------------	---	--



343

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: **94112732.6**

(51) Int. Cl.⁶: **C07K 14/505, A61K 38/18,
C12N 15/12**

(22) Date of filing: **16.08.94**

(30) Priority: **17.08.93 US 108016**

(43) Date of publication of application:
01.03.95 Bulletin 95/09

(84) Designated Contracting States:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**

(71) Applicant: **AMGEN INC.**
Amgen Center,
1840 Dehavilland Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1789 (US)

(72) Inventor: **Elliot, Steven G.**
1040 Golden Crest
Newbury Park,
California 91320 (US)
Inventor: **Byrne, Thomas E.**
1200 N. Nash Street,
Unit 811
Arlington,
Virginia 22209 (US)

(74) Representative: **Vossius, Volker, Dr. et al**
Dr. Volker Vossius
Patentanwaltskanzlei - Rechtsanwaltskanzlei
Holbeinstrasse 5
D-81679 München (DE)

(54) **Erythropoietin analogs with additional glycosylation sites.**

(57) Erythropoietin analogs having at least one additional site for glycosylation, or a rearrangement of at least one site for glycosylation are disclosed. The invention also relates to DNA sequences encoding said erythropoietin analogs, and recombinant plasmids and host cells for analog expression

EP 0 640 619 A1

344

TABLE 3
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR N-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Changes
N1	Asn ⁴ Ser ⁶	CGC→AAC ATC→AGC
N2	Asn ⁹ Ser ¹¹	AGC→AAC GTC→AGC
N3	Asn ¹⁹ Thr ²¹	GCC→AAC GAG→ACG
N4	Asn ³⁰ Thr ³²	GCT→AAT CAC→ACG
N5	Asn ⁴²	CCA→AAT
N6	Ser ⁴² Asn ⁴³ Thr ⁴⁵	CCA→TCA GAC→AAC AAA→ACA
N7	Ser ⁴⁹	TAT→TCT
N8	Asn ⁵¹ Thr ⁵³	TGG→AAT AGG→ACG
N9	Asn ⁵⁷ Thr ⁵⁹	GGG→AAC CAG→ACG
N10	Asn ⁶⁹	CTG→AAC
N11	Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	CTG→AAC TCG→ACA
N12	Ser ⁶⁸ Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹	N11 plus GCC→TCC
N13	Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	TGG→AAT CCC→ACC
N14	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ X	N13 plus CCG→TCG
N15	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Thr ⁹²	N14 plus CAG→ACG

8.007-15

345

TABLE 3 (CONT'D)
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR N-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Changes
N16	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ Ala ¹⁶²	N14 plus AGG→GCG
N17	Asn ⁸⁸ Ser ⁹⁰	TGG→AAT CCC→TCC
N18	Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	CCG→GTG TGG→AAT CCC→ACC
N19	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Gly ⁸⁹ Thr ⁹⁰	CCG→TCG TGG→AAT GAG→GGG CCC→ACC
N20	Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	GAG→AAC CCC→ATC CTG→ACG
N21	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁹ Ile ⁹⁰ Thr ⁹¹	N20 plus CCG→TCG
N22	Asn ¹¹³ Thr ¹¹⁵	GGA→AAC CAG→ACG
N23	Asn ¹¹⁸ Val ¹²¹	GCC→AAC CCT→GTT
N24	Asn ¹²¹ Ser ¹²² Thr ¹²³	CCT→AAT CCA→TCA GAT→ACT
N25	Asn ¹²⁴	GCG→AAT
N26	Ser ¹²² Asn ¹²⁴	CCA→TCA GCG→AAC
N27	Asn ¹²⁵ Ser ¹²⁷	GCC→AAC GCT→TCT
N28	Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	GCC→AAC GCT→ACG

346

TABLE 3 (CONT'D)
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR N-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Changes
N29	Leu ¹²¹ Ser ¹²² Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	N28 plus CCT→CTT
N30	Thr ¹²⁰ Gly ¹²² Leu ¹²³ Asn ¹²⁵ Thr ¹²⁷	CCA→TCA N28 plus TCC→ACC
N31	Asn ¹²⁶ Ser ¹²⁸	CGC→GGG GAT→CTC TCA→AAT
N32	Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	GCT→TCT TCA→AAT GCT→ACT CCA→GTA
N33	Leu ¹²¹ Ser ¹²² Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	N32 plus CCT→CTT
N34	Thr ¹²¹ Gly ¹²³ Ser ¹²⁵ Asn ¹²⁶ Thr ¹²⁸ Val ¹²⁹	CCA→TCA N32 plus CCT→ACG GAT→GGG GCC→TCC
N35	Ser ¹²⁹ Asn ¹³⁰	CCA→AGC CTC→AAC
N36	Asn ¹³²	ACA→AAC
N37	Asn ¹³⁴ Thr ¹³⁶	ACT→AAT GAC→ACC
N38	Asn ¹³⁵	GCT→AAT
N39	Asn ¹³⁶ Thr ¹³⁸	GAC→AAC TTC→ACC
N40	Asn ¹³⁷ Thr ¹³⁹	ACT→AAT CGC→ACC
N41	Asn ¹³⁸ Thr ¹⁴⁰	TTC→AAC AAA→ACA

347

TABLE 3 (CONT'D)
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR N-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Changes
N42	Asn ¹⁴⁴	GTC→AAC
N43	Ser ¹⁴³ Thr ¹⁴⁹ Val ¹⁵⁰	TTC→TCC CTC→ACC CGG→GTG
N44	Gly ¹⁴⁸ Thr ¹⁴⁹	TTC→GGC CTC→ACC
N45	Asn ¹⁵⁵	CTG→AAT
N46	Asn ¹⁶³ Ser ¹⁶⁵	ACA→AAT
N47	Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N4 and N18
N48	Asn ⁶⁹ Thr ⁷¹ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	N11 and N14

256
348TABLE 4
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR O-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

Analog No.	Amino Acid Substitution		Sequence Change
10	01	Ser6	ATC→AGC
	02	Ser7	TGT→TCC
	03	Ser8	GAC→AGC
15	04	Ser11	GTC→TCT
	05	Ser18	GAG→TCG
	06	Ser23	GAG→TCG
20	07	Ser29	TGT→AGC
	08	Ser29	TGT→TCT
	09	Ser30	GCT→TCT
25	010	Ser33	TGC→TCA
	011	Ser37	GAG→TCG
	012	Ser49	TAT→TCT
30	013	Ser61	GTA→TCA
	014	Ser63	GTC→TCC
	015	Ser67	CTG→TCG
35	016	Ser68	GCC→TCC
	017	Ser70	CTG→TCG
	018	Ser73	GCT→TCT
40	019	Ser74	GTC→TCT
	020	Ser75	CTG→TCG
	021	Ser79	GCC→TCC
45	022	Ser81	TTG→TCG
	023	Ser86	CAG→TCG
	024	Ser87	CCG→TCG
50	025	Ser93	CTG→TCG
	026	Ser98	GCC→TCC
	027	Ser99	GTC→TCC
55	028	Ser102	CTT→TCT
	029	Ser103	CGC→AGT

387
349

TABLE 4 (CONT'D)
 ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
 FOR O-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

5

	Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Change
10	030	Ser ¹⁰⁵	CTC→AGC
	031	Ser ¹⁰⁹	CTT→TCT
	032	Ser ¹¹¹	GCT→TCT
	033	Ser ¹¹²	CTG→TCG
15	034	Ser ¹¹⁴	GCC→TCC
	035	Ser ¹²⁸	GCT→TCT
	036	Ser ¹⁵⁹	TCG→GAG
20	037	Ser ¹⁶¹	TGC→TCC
	038	Pro ¹²⁵ Ser ¹²⁷	GCC→CCC
			GCT→TCT
25	039	Thr ⁶²	GAA→ACA
	040	Thr ⁶⁴	TGG→ACG
	041	Thr ⁶⁵	CAG→ACG
	042	Thr ⁸⁸	TGG→ACG
30	043	Thr ⁹⁰	CCC→ACC
	044	Thr ⁹²	CAG→ACG
	045	Thr ¹⁰⁰	AGT→ACT
35	046	Thr ¹¹⁰	CGG→ACG
	047	Thr ¹¹⁵	CAG→ACG
	048	Thr ¹²³	GAT→ACT
	049	Thr ¹²⁴	GCG→ACG
40	050	Thr ¹²⁵	GCC→ACC
	051	Thr ¹²⁵ Ser ¹²⁷	GCC→ACC
			GCT→TCT
45	052	Thr ¹²⁵ Thr ¹²⁶	GCC→ACA
			TCA→ACA
	053	Thr ¹²⁶	TCA→ACC
	054	Thr ¹²⁷	GCT→ACT
50	055	Thr ¹³⁰	CTC→ACC

55

358
350

TABLE 4 (CONT'D)
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES
FOR O-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS

Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Change
056	Thr ¹³¹	CGA→ACA
057	Thr ¹³⁶	GAC→ACC
058	Thr ¹⁴⁰	AAA→ACA
059	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵	GCG→CCG GCC→ACC
060	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵ Thr ¹²⁶	059 plus TCA→ACC
061	Pro ¹²⁴ Thr ¹²⁵ Thr ¹²⁶ Thr ¹³¹	060 plus CGA→ACA
062	HCG C-terminal extension	

TABLE 5

ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING SITES FOR N- AND O-LINKED CARBOHYDRATE CHAINS		
Analog No.	Amino Acid Substitution	Sequence Change
NO1	Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ HCG C-terminal extension	N14 and O62
NO2	Asn ³⁰ Thr ³² Val ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ HCG C-terminal extentsion	N47 and O62

Plasmids designated pDEC-X (where X is the analog number) were constructed by inserting erythropoietin cDNA into pDECΔ, which is a derivative of plasmid pDSα2. The expression vector pDSα2 is generally described in PCT Application No. WO 90/14363. pDECΔ was derived from pDSα2 by the following steps:

(1) The HindIII site of pDSα2 was deleted by digesting pDSα2 DNA with HindIII, treating the HindIII cohesive ends with E. coli DNA Polymerase (Klenow fragment) and dNTPs, and religating the blunt-ended vector. The resulting plasmid was pDSα2ΔH.

(2) pDSα2ΔH was digested with Sall and a synthetic oligonucleotide having an SV40 splice signal with a Sall linker attached to the 3' end of the splice signal was ligated to it. The synthetic oligonucleotide had the following sequence (SEQ ID. NO: 18):

359
351

5' TCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT

CTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCA

AAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGG

AAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAACAAGCTGGTCGACC 3'

The resulting plasmid was pDS α 2 Δ H splice.

3) pDS α 2 Δ H splice was digested with Sall and blunt-ended by treating the cohesive ends with T4 DNA polymerase and dNTPs. An 820 bp. BamHI-BglII human erythropoietin cDNA fragment was blunt-ended by the same method and ligated to the plasmid. The resulting plasmid was pDEC-1.

4) pDEC was digested with KpnI and PvuII and blunt-ended by treating the cohesive ends with mung bean nuclease. The plasmid was religated to delete the excised KpnI-PvuII fragment resulting in the plasmid pDEC Δ .

pDEC-X plasmids were made from pDEC Δ by complete digestion with BstEII followed by a partial digestion with BglII. The vector fragment lacking erythropoietin coding sequences was isolated and ligated to the 810 bp BstEII-BglII fragments containing the desired plasmid.

Details of the construction of some analogs having multiple amino acid changes are described below.

Construction of pDEC(N47) and pDEC(N48)

pDEC(N47) which contains asn30 thr32 val87 asn68 and thr90 mutations was constructed from pDEC-(N18) and pDEC(N4). pDEC(N18) was digested with HindII and BglII and a 445 bp fragment was isolated. pDEC(N4) was digested with BstEII and HindIII and a 377 bp fragment was isolated. These two fragments were ligated into pDEC Δ cut with BstEII and BglII as described above resulting in pDEC(N47).

pDEC(N48) which contains asn69 thr71 ser87 asn88 and thr90 mutations was constructed from pDEC-(N14) and pDEC(N11). pDEC(N14) was digested with HindII and BglII and a 445 bp fragment was isolated. pDEC(N11) was digested with BstEII and HindII and a 377 bp fragment was isolated. These two fragments were ligated into pDEC Δ cut with BstEII and BglII as described above resulting in pDEC(N48).

Construction of pDEC(O62) (HCG-Erythropoietin Fusion)

pDEC(O62) was assembled from pEC1 and a 107 base pair StuI-BglII synthetic DNA linker containing the carboxy terminal 28 amino acids from human chorionic gonadotropin (ser-ser-ser-ser-lys-ala-pro-pro-pro-ser-leu-pro-ser-pro-ser-arg-leu-pro-gly-pro-ser-asp-thr-pro-ile-leu-pro-gln) (SEQ ID. NO: 25) (Pierce et al. Ann. Rev. Biochem. 50, 465 (1981)). The sequence of the linker is as follows:

5'CCTGTAGGACAGGGGACAGATCCTCTTCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTC-
3'GGACATCCTGTCCCCTGTCTAGGAGAAGGAGTTCCGGGGAGGGGGGTGCGAAG-
5'CAAGTCCATCCCGACTCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCACAATGA (SEQ ID. NO: 19)
3'GTTCAGGTAGGGCTGAGGGCCCCGGGAGCCTGTGGGGCTAGGAGGGTGTACTCTAG (SEQ ID. NO: 20)

pEC1 was digested with StuI and BglII and the 610bp DNA fragment was isolated. The synthetic linker was phosphorylated with ATP and polynucleotide kinase and ligated with the pEC1 fragment into pDEC Δ previously digested with BstEII and partially digested with BglII as described above.

Construction of pDEC(NO1)

pDEC(NO1) was assembled from pDEC(O62) (HCG-EPO) and pDEC(N14) (Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰). pDEC177 was digested with StuI and BglII and the 610bp DNA fragment containing the Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ mutations was isolated with gene-clean. pDEC(O62) was digested with StuI and BglII and the 107 base pair fragment was isolated. These two DNA fragments were ligated into pDEC Δ previously digested with BstEII and partially digested with BglII as described above.

360
352Construction of pDEC(NO2)

pDEC(NO2) was assembled from pDEC(O62) (HCG-EPO) and pDEC(N47) (Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰). pDEC(N47) was digested with *Stu*I and *Bgl*III and the 610bp DNA fragment containing the Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ mutations was isolated with GeneClean™. pDEC(O62) was digested with *Stu*I and *Bgl*III and the 107 base pair fragment was isolated. These two DNA fragments were ligated into pDECΔ previously digested with *Bst*EII and partially digested with *Bgl*III as described above.

Construction of pDEC(N16) (Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²)

pDEC(N16) was assembled from pDEC(N14)(Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰) and pDEC258(Ala¹⁶²). pDEC258 was constructed using procedures for *in vitro* mutagenesis described above and changing the AGG codon to GCG at position 162. pDEC(N14) was digested with *Stu*I and *Bgl*III and the 610bp DNA fragment containing the Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ mutations was isolated with GeneClean™. pDEC258 was digested with *Stu*I and *Bgl*III and a 210 base pair fragment was isolated. These two DNA fragments were ligated into pDECΔ previously digested with *Bst*EII and partially digested with *Bgl*III as described above.

Construction of pDEC(R1), (R2) and (R3)

To remove glycosylation sites from pDEC(N14), m13-EPO(N14) containing ser87 asn88 and thr90 mutations was subjected to *in vitro* mutagenesis as described above using the following primers:

5'GGAGGCCGAGCAGATCACGACGG3' GLN24 (SEQ ID. NO: 21)

5'CTTGAATGAGCAGATCACTGTCC3' GLN38 (SEQ ID. NO: 22)

5'CTGTTGGTCCAGTCTTCCCAG3' GLN83 (SEQ ID. NO: 23)

The resulting plasmids were designated pDEC(R1) (gln²⁴ ser⁸⁷ asn⁸⁸ thr⁹⁰) pDEC(R2) (gln³⁸ ser⁸⁷ asn⁸⁸ thr⁹⁰) and pDEC(R3) (gln⁸³ ser⁸⁷ asn⁸⁸ thr⁹⁰). m13EC-1 was also subjected to *in vitro* mutagenesis with the above oligonucleotide primers resulting in pEC10 (gln²⁴) and pEC8 (gln³⁸). pEC9 (gln⁸³) was constructed using the primer

5'CCTGTTGGTCCAGTCTTCCCAGC3' GLN83 (SEQ ID. NO: 24)

cDNA clones of human erythropoietin and analogs corresponding to [Asn⁴, Ser⁶] EPO, [Asn⁹, Ser¹¹] EPO, [Asn⁶⁹] EPO, [Asn¹²⁴] EPO, [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO, [Asn¹⁶³, Ser¹⁶⁵] EPO, [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO and cDNA clones of analogs described in Tables 3,4 and 5, were transferred into COS-1 cells (ATCC No. CRL-1650) by electroporation. COS-1 cells were harvested from semi-confluent dishes, washed with medium (Dulbecco's modified essential medium containing 5% fetal calf serum and 1% L-glutamine/penicillin/streptomycin (Irvine Scientific)) and resuspended at 4 x 10⁶ cells/ml. One ml of cells was transferred to an electroporation cuvette (Bio-Rad) and electroporated with a Bio-Rad Gene Pulser at 25 μFarads and 1600 volts in the presence of 100 to 200 μg of carrier DNA and 2 to 20 μg of plasmid DNA encoding the erythropoietin analog. The electroporated cells were plated at 2 x 10⁶ cells per 60 mm tissue culture dish in 5 ml of medium. Two to four hours after plating the medium was replaced with 5 ml of fresh medium. The conditioned medium was collected 3 to 5 days after electroporation.

Example 7: Characterization of Erythropoietin AnalogsA. Determination of Carbohydrate Addition

A volume of supernatant containing 5-20 units from COS cells transfected with erythropoietin analog cDNAs as described in Example 6 was immunoprecipitated overnight at room temperature with a rabbit anti-erythropoietin polyclonal antibody. 20-80 μl of 1:1 Protein A-Sepharose in phosphate buffered saline (PBS) was added to the immunoprecipitate and allowed to incubate for one hour at room temperature. The samples were centrifuged, washed with PBS and, where indicated, the pellet was treated with N-glycanase to remove N-linked carbohydrate chains. The samples were analyzed by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose and subjected to Western analysis as described (Burnette et al. Anal. Biochem. 112, 195-203 (1981); Elliott et al. Gene 79, 167-180 (1989)) using a mixture of mouse anti-erythropoietin monoclonal antibodies. One such antibody, 9G8A, is described in Elliott et al. (1989) Blood 74, Supp. 1, A. 1228.

Analysis of COS cell supernatants transfected with [Asn⁶⁹] EPO and [Asn¹²⁵, Ser¹²⁷] EPO cDNA revealed increased protein size compared to human sequence erythropoietin. This increased size is indicative of an additional N-linked carbohydrate chain (Figure 7). Treatment of supernatants from COS cells

387
353

transfected with [Thr¹²⁵] EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO cDNA with N-glycanase revealed an increased protein size compared to human sequence erythropoietin. This increased size is indicative of an additional O-linked carbohydrate chain (Figure 8). Western blot analysis of other selected analogs is shown in Figure 10.

To determine the number of N-linked carbohydrate chains attached to EPO, partial N-glycanase digestions were performed. Analogs or rHuEPO were expressed in CHO cells and conditioned serum free medium was collected. Tubes contained 40 units of EPO (volume adjusted to 15 μ l with H₂O). To each tube was added 10 μ l 0.5% SDS and each sample was boiled for 3 minutes. Then the following components were added, 10.8 μ l 0.5M NaPO₄ pH8.6, 5 μ l 7.5% nonidet P40 and 1.5 μ l of 250 unit/ml N-glycanase (Genzyme). Samples were incubated for the indicated times at 37°C. The reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE sample buffer (see above) and then subjected to SDS-PAGE western analysis (10% acrylamide) using an anti-EPO polyclonal antibody and a anti-rabbit Vectastain™ kit (Vector laboratories) with 4-chloronaphthol as substrate. An analysis of N-linked chains using this method is shown in Figure 11 for human erythropoietin and analog N14.

B. Assays for erythropoietin analog activity

RIAs were performed according to Egrie et al., *supra*. EIAs were performed with CLINIGEN™ EIA kit (R and D Systems) using procedures supplied by the manufacturer. The *in vivo* biological activity of erythropoietin analogs was determined on supernatants from CHO cells expressing an erythropoietin analog or on purified erythropoietin obtained from CHO cell conditioned medium as described below using the exhypoxic polycythemic mouse bioassay (Cotes et al.,

In vitro erythropoietin activity was determined by the erythroid colony forming assay as described by Iscove et al. J. Cell Physiol. 83, 309-320 (1974) with modifications. The mononucleated cells from human bone marrow cells were partially purified on a ficoll-paque cushion and washed in Iscove medium before plating to remove the adherent cells. The culture medium contained 0.9% methyl cellulose and did not include any bovine serum albumin. The erythroid colonies were scored after 8 to 10 days of culture.

The erythropoietin analogs transfected and expressed in COS cells as described in Example 6 were analyzed in crude COS cell supernatants using RIA, EIA and an erythroid colony forming assay. Purified human sequence erythropoietin has an *in vitro* activity that was comparable to the RIA activity as determined by the above-mentioned assays. The analogs [Asn⁶⁹] EPO, (Thr¹²⁵) EPO and [Pro¹²⁴, Thr¹²⁵] EPO exhibited an *in vitro* activity that was comparable to the RIA activity and gave evidence of having additional carbohydrate chains (as determined in Section A). [Thr¹²⁵] EPO and analogs N4, N11, N14, N16, N18, N47, N48, O62, NO1 and NO2 were analyzed further by transfecting a cDNA clone encoding the erythropoietin analog into CHO cells, and subjecting the CHO cell supernatants to RIA or EIA and *in vivo* biological assays. The results are shown in Table 6. *In vivo* activities for analogs R1, R2 and R3 expressed in CHO cell supernatants are shown in Table 7.

362
354

TABLE 6
ERYTHROPOIETIN ANALOGS HAVING
ADDITIONAL CARBOHYDRATE CHAINS

	EPO Sequence	N-Linked ^a Chains	O-Linked Chains	In Vivo ^b Activity	
				RIA or EIA	
10	Human	3 ^c	1 ^d	0.6	✓
	Asn30Thr32	3 to 4 ^c	n.t.	1.1	
	Asn51Thr53	4	n.t.	n.t.	
15	Asn57Thr59	4	n.t.	n.t.	
	Asn69	4	reduced ^e	n.t.	
	Asn69Thr71	4	n.t.	0.25-0.7	
20	Ser68Asn69Thr71	4	n.t.	n.t.	
	Val87Asn88Thr90	4 ^c	n.t.	1.8	
	Ser87Asn88Thr90	3 to 4 ^c	normal	1.0	
25	Ser87Asn88Gly89Thr90	4	n.t.	n.t.	
	Ser87Asn88Thr90Thr92	4	reduced ^e	n.t.	
	Asn89Ile90Thr91	4	n.t.	n.t.	
	Ser87Asn89Ile90Thr91	4	n.t.	n.t.	
30	Ser87Asn88Thr90Ala162	4	n.t.	1.8	
	Asn136Thr138	3 to 4	n.t.	n.t.	
	Asn138Thr140	3 to 4	n.t.	n.t.	
35	Asn69Thr71Ser87Asn88Thr90	4 to 5	n.t.	0.025-0.25	
	Asn30Thr32Val87Asn88Thr90	4 to 5 ^c	normal	1.8	
	Thr123	3	1 and 2 ^f	n.t.	
40	Thr125	3	1 and 2 ^f	0.7	
	Pro124Thr125	3	1 and 2 ^f	n.t.	
	HCG C-terminal extension	3	at least 39	1.0-1.3	
45	Ser87Asn88Thr90 HCG extension	4	at least 39	1.5	
	Asn30Thr32Val87Asn88Thr90 HCG extension	4 to 5	at least 39	0.8	

363
35

TABLE 6 FOOTNOTES

^aThe number of additional N-linked chains was estimated based upon the mobility of the analog polypeptides in SDS gels as described in Example 7A.

^bRatio of in vivo activity of analog to amount of erythropoietin analog. Activity measurements were done on CHO cell supernatants of analogs using the mouse polycythemic bioassay. Quantities of erythropoietin analogs in CHO cell supernatants were determined by RIA or EIA as described in the text.

^cConfirmation of the number of additional carbohydrate chains was made by examining the glycoprotein migration in SDS-gels after partial N-glycanase digestion as described in Example 7A.

^dO-linked chain at Ser¹²⁶ is present on 70% of human erythropoietin molecules.

^eAnalogues having reduced O-glycosylation have a carbohydrate chain at Ser¹²⁶ on less than 70% of the molecules.

^fThr¹²³ EPO has two O-linked chains on greater than 60% of the molecules. Thr¹²⁵ EPO has two O-linked chains on about 40% of the molecules. Pro¹²⁴Thr¹²⁵ EPO has two O-linked chains on greater than 80% of the molecules.

^gThese analogs have at least three O-linked chains and may have four or five. HCG alone is known to have four O-linked chains.

N.T. NOT TESTED

TABLE 7

ACTIVITY OF HUMAN ERYTHROPOIETIN AND ANALOGS HAVING CARBOHYDRATE SITE REARRANGEMENTS		
EPO Sequence	N-Linked Chains	<i>In vivo</i> Activity RIA or EIA
Human	3	0.69
Gln ²⁴	2	0.16
Gln ³⁸	2	0.16
Gln ⁸³	2	0.23
Gln ²⁴ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R1)	3	0.69
Gln ³⁸ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R2)	3	0.41
Gln ⁸³ Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰ (R3)	3	0.50
Ser ⁸⁷ Asn ⁸⁸ Thr ⁹⁰	3 to 4	1.48
Ratio of <i>in vivo</i> activity to RIA or EIA was determined as described in footnote a of Table 6.		

364
356

C. Preparation of Isoform Mixtures Derived from Erythropoietin Analogs

[Thr¹²⁵] EPO (EPO Q50)

5 The erythropoietin analog [Thr¹²⁵] EPO was constructed as described in [Section A] Example 6. An 810 bp. erythropoietin cDNA fragment carrying the [Thr¹²⁵] mutation was isolated by cleaving the plasmid pEC containing the [Thr¹²⁵] mutation with BstEII and BglII and ligating the fragment to pDECA, [a derivative of pDS α 2] (described in Example 6).

10 Plasmid pDECA containing [Thr¹²⁵] erythropoietin cDNA was transfected into DHFR-deficient CHO cells. 770 ml of CHO cell conditioned medium was concentrated using a 10,000 dalton molecular weight cut-off membrane and diafiltered against 10 mM Tris-HCl, pH 8.6 to a final volume of 34 ml. A 17 ml. aliquot of the concentrate was loaded onto a Q-Sepharose fast flow column (5 ml bed volume) equilibrated in the same buffer and eluted in a linear gradient of 0-250 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 8.6. Aliquots of column fractions, either untreated or digested with N-glycanase, were analyzed by SDS-PAGE or IEF and
15 pools (designated 2, 3 and 4) were made based upon the isoform and/or carbohydrate composition of the fractions. Each pool was loaded onto a Vydac C4 column (214TPB 2030; 1 cm diameter; 1.8-2.5 ml bed volume; 0.34 ml/min) and washed with two column volumes of 20% ethanol in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0. The columns were eluted with linear gradients of 20-94% ethanol, 10 mM Tris, pH 7.0. Pools were made, diluted into 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and loaded onto Q-Sepharose fast flow columns. Following a wash in 10 mM
20 Tris-HCl, pH 7.0, the samples were eluted with 20 mM sodium citrate, 250 mM NaCl, pH 7.0. The purified [Thr¹²⁵] pools were analyzed by IEF and are shown in Fig. 9. These pools were also analyzed for in vivo biological activity as described above (Cotes et al., supra) and the results shown in Table 8.

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO (EPO N14)

25
Prep. 1

The EPO N14 analog was purified using a three step procedure consisting of ion exchange chromatography, reverse phase chromatography and gel filtration chromatography. During the ion exchange step,
30 fractions were pooled to give a mixture of isoforms having high levels of sialic acid. Two additional pools were made during reverse phase chromatography containing the analog with or without aggregate. The details of the purification are set out below.

1. Conditional medium from CHO cells expressing the EPO N14 analog was harvested and concentrated approximately 2.5-fold using a stirred cell with YM10 membrane (Amicon) and diafiltered against 10mM
35 Tris pH 8.5.
2. The concentrated medium was loaded at ~12 A₂₈₀/ml resin to Q-Sepharose FF (Pharmacia) column equilibrated in 10mM Tris pH 8.5 at a flow rate of 0.2 cm/min.
3. Following the load, the column was washed with 3 column volumes (CV) of 10mM Tris pH 8.5 and eluted with a gradient of 0-0.5M NaCl/10mM Tris pH 8.5 in 50CV. 1CV fractions were collected.
- 40 4. A sample of each fraction was run on an IEF gel pH 3-5. Based on the isoform distribution on IEF, a fraction pool containing largely isoforms 11-18 was made. EDTA was added to the pool to 1mM final concentration.
5. The isoform pool was loaded at ~5 A₂₈₀/ml resin to a reverse phase C4 column (Vydac) equilibrated in 20% ethanol/10mM Tris pH 7.0 at a flow rate of 2.5 cm/min. The column was washed with 1CV of
45 20% ethanol/10mM Tris pH 7.0 and eluted with a gradient of 20-94% ethanol/10mM Tris pH 7.0 in 30CV at a flow rate of 1cm/min. 0.2CV fractions were collected.
6. A sample of each fraction was analyzed by non-reducing 12% SDS-PAGE. Two separate pools were made based on the presence of aggregate observed on SDS gels. Pool #1 contained EPO analog but no aggregate. Pool #2 contained both EPO analog and aggregate.
- 50 7. Pool #1 was concentrated approximately 65-fold and pool #2 approximately 250-fold using Centricon 10's (Amicon). Each pool was buffer exchanged into 20mM NaCitrate/100mM NaCl pH7.0.
8. Each pool was individually purified on HPLC BioSil SEC-250 (BioRad) column equilibrated in 20mM NaCitrate/100mM NaCl pH7.0. Pools were loaded at <6 A₂₈₀/ml resin at a flow rate of 2.26 cm/min. Peaks corresponding to monomeric analogs were collected from each run.
- 55 9. The absorbance of each pool was measured and a portion of each pool was concentrated for analysis by SDS-PAGE and IEF gels. Pool #1 had a distribution of isoforms 15-17 and was used for pharmacokinetic and receptor binding studies.

365
357

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

5 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 10 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 15 50 55 60
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80
 20 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 25 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 30 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 35 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 40 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190
 Arg

Claims

1. An analog of human erythropoietin comprising an amino acid sequence which includes at least one additional site for glycosylation.
2. The analog of Claim 1 wherein the glycosylation site is for an N-linked carbohydrate chain.
3. The analog of Claim 1 wherein the glycosylation site is for an O-linked carbohydrate chain.
4. The analog of Claim 1 having at least one additional carbohydrate chain attached thereto.
5. The analog of Claim 4 wherein the carbohydrate chain is an N-linked carbohydrate chain.

366
358

6. The analog of Claim 4 wherein the carbohydrate chain is an O-linked carbohydrate chain.
7. The analog of any one of Claims 1 to 6 which is the product of expression of an exogenous DNA sequence.
8. The analog of Claim 2 wherein an asparagine residue is substituted at any of positions 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 or 138 of the amino acid sequence of human erythropoietin.
9. The analog of Claim 3 wherein a serine or threonine residue is substituted at position 125 of the amino acid sequence of human erythropoietin.
10. An analog of human erythropoietin selected from the group consisting of:

Asn³⁰Thr³² EPO;
 Asn⁵¹Thr⁵³ EPO;
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹ EPO;
 Asn⁶⁹EPO;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹ EPO;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ EPO;
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ EPO;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² EPO;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² EPO;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ EPO;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ EPO;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ EPO;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ EPO;
 Thr¹²⁵ EPO; and
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵ EPO.

11. An analog of human erythropoietin comprising an addition of one or more amino acids to the carboxy terminal end of erythropoietin wherein the addition includes at least one glycosylation site.
12. The analog of Claim 11 wherein the addition comprises a peptide fragment derived from the carboxy terminal end of human chorionic gonadotropin.
13. The analog of Claim 12 selected from the group consisting of:
 - (a) human erythropoietin having the amino acid sequence Ser-Ser-Ser-Ser-Lys-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Leu-Pro-Ser-Pro-Ser-Arg-Leu-Pro-Gly-Pro-Ser-Asp-Thr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln extending from the carboxy terminus;
 - (b) the analog in (a) further comprising Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; and
 - (c) the analog in (a) further comprising Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO.

367
359

14. An analog of human erythropoietin comprising an amino acid sequence which includes a rearrangement of at least one site for glycosylation.

15. The analog of Claim 14 wherein the rearrangement comprises a deletion of any of the N-linked carbohydrate sites in human erythropoietin and an addition of an N-linked carbohydrate site at position 88 of the amino acid sequence of human erythropoietin.

16. The analog of Claim 15 selected from the group consisting of:

Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO;
Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; and
Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO.

17. A DNA sequence encoding an analog of human erythropoietin according to any one of Claims 1 to 16.

18. A eucaryotic host cell transfected with a DNA sequence according to Claim 17 in a manner allowing the host cell to express an analog of human erythropoietin.

19. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an erythropoietin analog according to any one of Claims 1 to 16 together with a pharmaceutically acceptable diluent, adjuvant or carrier.