



Organización CSA Ltda

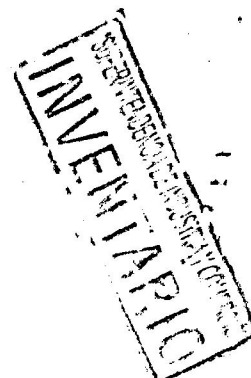
Industria y Comercio

ación CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

00-48531

54. TÍTULO "Derivados de eritropoyetina"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 38/02, 35/12

71. SOLICITANTE F. Hoffmann - La Roche AG

DOMICILIO Basle, Suiza

74. APODERADO Jose Antonio Jorda

T.P # 10.784

Código 231

22. BOGOTÁ, D. C., 28 Junio 2000

202037



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

00-48531

54. TITULO

"DERIVADOS DE ERITROPOYETINA."

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K³⁸/02, 35/12.

71. SOLICITANTE

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

DOMICILIO

BASLE, SUIZA

74. APC DERADO

JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. #10.784
CÓDIGO 231

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

28 JUN. 2000

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

S



00 48531

[illegible]

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.** sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes de Suiza

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica) JOSE ANTONIO LLOREDA

País de Domicilio SUIZA

Departamento o Estado

124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Suiza

Ciudad BASLE

Teléfono 00941 61688 1111

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección y Domicilio Calle 72 No. 5-83 Piso 6, Santafé de Bogotá, Colombia

Ciudad **BOGOTA** Teléfono **326 42 70**

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Josef Burg, Bernd Hilger y Hans-Peter Josel

Identificación 1 An der Bärenmühle D-82362 Weilheim, Alemania; 21 Am Katzenbuckel

Dirección D-82377 Penzberg, Alemania y 7 Prälatenweg D-82362 Weilheim, Alemania.

Ciudad Weilheim y Penzberg

Teléfono 00941 61688 1111

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención **" DERIVADOS DE ERITROPOYETINA ".**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒ NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA

UNIONISTA

☒

(33) País US

(32) Fecha 02-07-99

(31)No. Solicitud 60/142.243

US

05-08-99

60/147.452

US _____

30-08-99

~~60/151.454~~

Para Publicar a los ☒ **6 meses** ☐ **12 meses** ☐ **18 meses** **a partir de la fecha de la presente Solicitud**

- 2 ENE. 2001,

AGIK $^{38}/_{02}$, $^{35}/_{12}$

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Se revelan conjugados de la glucoproteína eritropoyetina, dichos conjugados comprenden una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica in vivo con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma, que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi-inferior poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilenglicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, con el $C(O)$ del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, en donde X e Y son tal como se han definido en la descripción y revelaciones, el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons, y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☐ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la S.I.C. 15.256 | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva \$ 608.000,00 | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia dela primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: SI | |
| Copia certificada de la primera solicitud: US 60/142.243 DE FECHA 02-07-99;
US 60/147.452 DE FECHA 05-08-99 y
US 60/151.454 DE FECHA 30-08-99 | ☒ |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior | |
| Traducción Simple de EDUARDO CALADO NOGUERA Nos. 0278 de fecha 17-06-00; 0275 de fecha 17-06-00 y 0276 de 18-06-00. | ☒ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms. Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |
| Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería | ☒ |

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSE ANTONIO LLOREDA

C.C. 17.159.681 de Bogotá TP No. 10.784



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Redimiento: 0004057: 00000000 Folios: 334
Fecha (AMD): 2000-06-28 15:35:27
Tipo de: 002 PATENTES: 00000000 411 PRESENTAC
Dependencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

WIT - 00000000 1

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011
: JUNIO 27 DE 2000

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011

FORMA ORIGINAL DE 0114	TIPO DE	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114
FORMA ORIGINAL DE 0114	CONSIGNACION	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114	FORMA ORIGINAL DE 0114

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011

FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011



FORMA ORIGINAL DE 0114 : 30,011

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

- a) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidas a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París --el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4--

- b) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.
- c) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud **cuyas prioridades ahora reivindico**, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 12 de la Decisión 344 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes de los Países Miembros del Acuerdo de Cartagena.

4

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 15.256. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

CODIGO 231

RESUMEN OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se revelan conjugados de la glucoproteína eritropoyetina, dichos conjugados comprenden una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica in vivo con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma, que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi-inferior poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilenglicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, con el $C(O)$ del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, en donde X e Y son tal como se han definido en la descripción y revelaciones, el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodantolns, y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons.

CONOCIMIENTO PREVIO DE LA INVENCION

La eritropoyesis es la produccion de gl6bulos rojos, que se produce con el objetivo de contrarrestar la destruccion celular. La eritropoyesis es un mecanismo fisiol6gico controlado, que proporciona los suficientes gl6bulos rojos necesarios para una oxigenacion tisular adecuada. La eritropoyetina humana producida de forma natural (hEPO) es una glucoproteina que contiene 165 aminoacidos que se produce en el ri6n y es el factor plasmatico humoral que estimula la produccion de gl6bulos rojos (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W and Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). La EPO humana estimula la division y diferenciacion de los progenitores eritrociticos especificos en la m6dula 6sea. La EPO humana ejerce su actividad biologica mediante la union a receptores en los precursores eritrociticos (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419). La eritropoyetina humana que se produce de forma natural es una glucoproteina acida presente en bajas concentraciones en el plasma, para estimular la sustitucion de los gl6bulos rojos que se van perdiendo con el envejecimiento.

La eritropoyetina se ha producido biosinteticamente mediante el uso de la tecnologia del DNA recombinante (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) y es el producto del gen EPO humano clonado, insertado y expresado en celulas de tejido de ovario de hamster chino (celulas CHO). La EPO humana que se produ-

ce de forma natural en primer lugar es traducida a una cadena polipeptídica de 166 aminoácidos con arginina 166. Por una modificación post-traducciona, la arginina 166 es escindida por una carboxipeptidasa. La estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos) se ilustra en la Figura 1. La estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos) se ilustra en la Figura 2. Hay dos puentes disulfuro entre Cys⁷-Cys¹⁶¹ y Cys²⁹-Cys³³. El peso molecular de la cadena polipeptídica de la EPO humana sin las porciones de los azúcares es 18.236 Da. En la molécula intacta de EPO, aproximadamente el 40% del peso molecular viene dado por los grupos de carbohidrato (Sasaki, H. Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

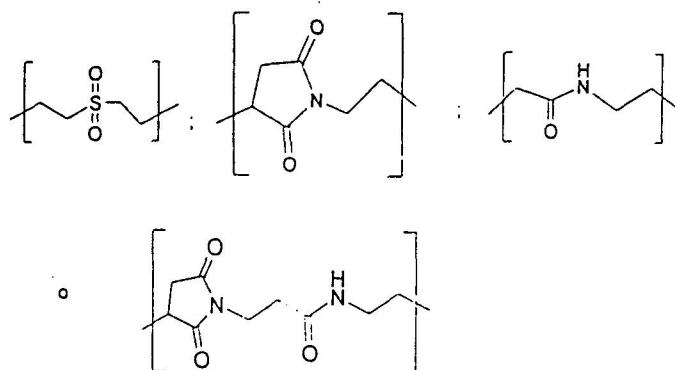
Debido a que la eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, la hormona es útil en el tratamiento de los trastornos sanguíneos caracterizados por la baja o defectiva producción de glóbulos rojos. Clínicamente, la EPO es utilizada en el tratamiento por ejemplo de anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF) (Eschbach, JEW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JEW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T. Adamson, JEW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) y en pacientes con SIDA y cáncer que han sido tratados con quimioterapia (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel

Dekker; 1990: p. 301-324). Sin embargo, la disponibilidad biológica de agentes terapéuticos basados en proteínas disponibles comercialmente tales como EPO, se encuentra limitada por su corta vida media en el plasma y por su susceptibilidad a la degradación por parte de proteasas. Estos defectos impiden que se pueda alcanzar una potencia clínica máxima.

RESUMEN de LA INVENCION

Según esto, la presente invención es una nueva clase de derivados de PEG de EPO. Los conjugados PEG-EPO fisiológicamente activos de esta invención comprenden una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, que presenta una actividad biológica in vivo con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi-inferior poli(etilenglicol), cada grupo poli(etilenglicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-$ $\S-Y-$ con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es $-(CH_2)_k-$ ó $-(CH_2(O-CH_2-CH_2))_k-$, k se encuentra entre 1 y 10, Y es :

5



el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons, y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons. Esta invención también proporciona composiciones que contienen conjugados descritos aquí, en las cuales el porcentaje de conjugados en la composición en la que n es 1 es al menos del noventa por ciento.

Si se comparan con las EPO no modificadas (es decir, EPO sin un PEG unido) y con los conjugados EPO-PEG convencionales, los presentes conjugados tienen tanto una vida media de circulación como un tiempo de residencia en el plasma mayores, un menor aclaramiento, y una mayor actividad clínica *in vivo*. Los conjugados de esta invención presentan los mismos usos que la EPO. En concreto, los conjugados de esta invención son útiles para tratar pacientes mediante la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritrocíticos específicos en la médula ósea por la misma vía por la que se utiliza EPO para el tratamiento de los pacientes.

La presente invención también incluye un método para

el tratamiento de anemia en humanos. La presente invención también incluye un método para la preparación de productos de la glucoproteína eritropoyetina que comprende la reacción de forma covalente de un grupo ϵ -amino de un aminoácido de lisina de una proteína eritropoyetina con un reactivo bifuncional para formar un intermediario con un enlace amida. El reactivo bifuncional contiene un grupo reactivo y un grupo tiol protegido. Entonces el intermediario con un enlace amida reacciona covalentemente con un derivado de polietilen glicol activado para formar el producto de glucoproteína eritropoyetina de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1: Estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos).
- 15 Figura 2: Estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos).
- Figura 3: Actividad in vivo de la EPO pegilada determinada mediante el ensayo normocitémico de ratón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Definiciones

Los siguientes términos tendrán las definiciones mostradas a continuación:

- El término "proteína eritropoyetina", "eritropoyetina", "EPO" o "glucoproteína eritropoyetina" se refiere a una glucoproteína que presenta la secuencia mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) ó 2 (SEQ ID NO: 2) o una proteína o polipéptido substancialmente homólogo a las mismas, cuyas propiedades biológicas se refieren a la estimulación de la

producción de glóbulos rojos y a la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritrocíticos específicos en la médula ósea. Tal como se emplea aquí, el término proteína EPO incluye dichas proteínas modificadas de forma deliberada, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida o de forma accidental, por mutaciones. Estos términos también incluyen análogos que presentan entre 1 y 6 sitios adicionales para la glucosilación, análogos que presentan al menos un aminoácido adicional en el extremo carboxilo de la proteína, en donde el aminoácido o aminoácidos adicionales incluyen al menos un sitio de glucosilación y análogos que presentan una secuencia aminoacídica que incluye una nueva disposición de al menos un sitio para la glucosilación, tales como por ejemplo los análogos revelados en la Publicación de Patente Europea No. 640 619. Estos términos incluyen tanto la eritropoyetina humana producida de forma natural como la producida de forma recombinante.

El término "substancialmente homólogo" significa que una secuencia concreta problema, por ejemplo, una secuencia mutada, varía de una secuencia de referencia en una o más substituciones, deleciones o adiciones, el efecto neto de lo cual no resulta en una diferencia funcional adversa entre las secuencias de referencia y problema. Para los propósitos de la presente invención, las secuencia con más del 95 por ciento de homología, propiedades biológicas equivalentes y características de expresión equivalentes se consideran substancialmente homólogas. Para propósitos de determinación de la homología, no se deberá considerar el

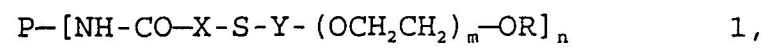
truncamiento de la secuencia madura. Las secuencias con menores niveles de homología, comparable bioactividad, y características de expresión equivalentes son consideradas substancialmente equivalentes.

5 El término "fragmento" de la proteína EPO significa cualquier proteína o polipéptido que presenta la secuencia aminoacídica de una porción o fragmento de una proteína EPO, y la cual tiene la actividad biológica de la EPO. Los fragmentos incluyen proteínas o polipéptidos producidos por
10 la degradación proteolítica de la proteína EPO o producida por síntesis química mediante métodos rutinarios del campo. Una proteína EPO o fragmento de la misma es biológicamente activa cuando la administración de la proteína o fragmento al hombre produce la estimulación de la producción de gló-
15 bulos rojos y la estimulación de la división y diferenciación de progenitores eritrocíticos específicos en la médula ósea. La determinación de dicha actividad biológica de la proteína EPO se puede llevar a cabo de forma convencional, pruebas bien conocidas utilizadas para tales propósitos en
20 una o más especies de mamíferos. Una prueba adecuada que se puede utilizar para demostrar dicha actividad biológica es la que se describe a continuación.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" es la cantidad de producto de glucoproteína eritropoyetina necesario para dar la actividad biológica in vivo que consigue
25 que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos. La cantidad exacta de producto de glucoproteína eritropoyetina es una cuestión de

preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de trastorno a tratar, el estado del paciente a tratar, así como otros ingredientes de la composición. Las composiciones farmacéuticas que contienen los productos de glucoproteína eritropoyetina se pueden formular con una potencia efectiva para la administración por varios medios a un paciente humano que experimente trastornos sanguíneos caracterizados por la baja o defectiva producción de glóbulos rojos. La media de las cantidades efectivas terapéuticamente del conjugado pueden variar y en concreto deben estar basadas en las recomendaciones y prescripción de un médico cualificado.

La presente invención está dirigida a productos de la glucoproteína eritropoyetina que presentan una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos representado por la Fórmula 1:



en donde X e Y son tal como se han definido anteriormente, m se encuentra comprendido entre 450 y 900, n se encuentra comprendido entre 1 y 3, R es alquilo inferior y P es la glucoproteína eritropoyetina menos el grupo amino o grupos amino que forman un enlace amida con X. Como se presenta en detalle a continuación, la preparación y purificación de la EPO son bien conocidos en el campo. Por EPO se denota la proteína natural o recombinante, preferiblemente humana, así como la obtenida a partir de cualquier fuente convencional tal como tejidos, síntesis protéica, cultivo celular

con células naturales o recombinantes. Se incluye cualquier proteína que presente actividad de EPO, tal como muteínas o proteínas modificadas de otra manera. La EPO recombinante se puede preparar mediante su expresión en líneas celulares CHO-, BHK- o HeLa mediante la tecnología del DNA recombinante o mediante activación génica endógena. Las especies EPO preferidas para la preparación de productos de la glucoproteína eritropoyetina son especies EPO humanas. Más preferiblemente, las especies EPO son la EPO humana que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) o Figura 2 (SEQ ID NO:2), siendo la más preferida la EPO humana que tiene la secuencia aminoacídica en la Figura 1 (SEQ ID NO:1).

La proteína eritropoyetina humana también se puede modificar en al menos un sitio para la glucosilación, por ejemplo entre 1 y 6 sitios de glucosilación adicionales, tales como, pero no limitadas a, las secuencias aminoacídicas presentadas a continuación. La siguiente notación significa que la secuencia expuesta en la Figura 1 se ha modificado mediante la substitución del aminoácido nativo en la posición numerada con superíndice por el aminoácido indicado a la izquierda del número en superíndice.

Asn³⁰Thr³² Figura 1;

Asn⁵¹Thr⁵³ Figura 1,

25 Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figura 1;

Asn⁶⁹ Figura 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figura 1;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figura 1;

- Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figura 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figura 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figura 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figura 1;
5 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figura 1;
Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figura 1;
Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figura 1;
Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figura 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figura 1;
10 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figura 1;
Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figura 1;
Thr¹²⁵ Figura 1; y
Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figura 1.

La proteína eritropoyetina humana también puede ser un
15 análogo que tenga al menos un aminoácido adicional en el
extremo carboxilo de la glucoproteína, en donde el aminoá-
cido adicional incluye al menos un sitio de glucosilación,
es decir la glucoproteína tiene una secuencia que comprende
la secuencia de la eritropoyetina humana y una segunda se-
20 cuencia en el extremo carboxilo de la secuencia de la eri-
tropoyetina humana, en donde la segunda secuencia contiene
al menos un sitio de glucosilación.

El aminoácido adicional puede comprender un fragmento
peptídico derivado del extremo carboxilo de la gonadotropi-
25 na coriónica. Preferiblemente, la glucoproteína es un aná-
logo seleccionado del grupo que consiste en (a) eritropoye-
tina humana que tiene la secuencia aminoacídica 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:3), prolongándose desde el extremo carboxilo; (b) el análogo en (a) también comprende EPO Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y (c) el análogo en (a) también comprende EPO Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

5 La proteína eritropoyetina humana también puede ser un análogo con una secuencia aminoacídica que incluya una nueva disposición de al menos un sitio para la glucosilación. La nueva disposición puede comprender una delección de cualquiera de los sitios de unión N a carbohidrato en la eritropoyetina humana y una adición de un sitio de unión N a carbohidrato en la posición 88 de la secuencia aminoacídica de la eritropoyetina humana. Preferiblemente, la glucoproteína es un análogo seleccionado del grupo que consiste en EPO Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; EPO Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y EPO
10 Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.
15

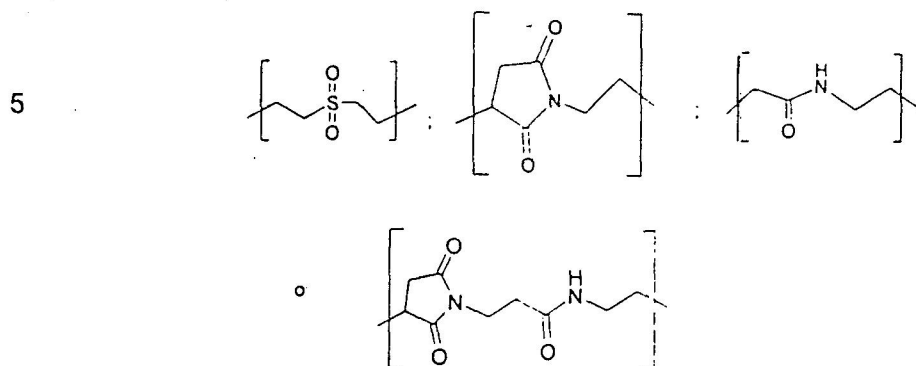
Los análogos de eritropoyetina con sitios de glucosilación adicionales se revelan con más detalle en la Solicitud de Patente Europea No. 640 619, de Elliot publicada el 1 de Marzo de 1995, los contenidos de las cuales se encuentran incorporados aquí por referencia.
20

En la fórmula I, R puede ser cualquier alquilo inferior, lo que significa un grupo alquilo lineal o ramificado que presenta entre uno y seis átomos de carbono tales como metilo, etilo, isopropilo, etc. Un alquilo preferido es metilo.
25

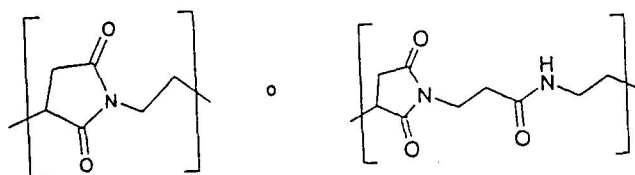
En la Fórmula 1, X es $-(CH_2)_k$ ó $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en donde k se encuentra comprendido entre 1 y 10. Preferible-

mente k se encuentra entre 1 y 4, más preferiblemente, k es 1 ó 2. Más preferiblemente X es $-(CH_2)_2$.

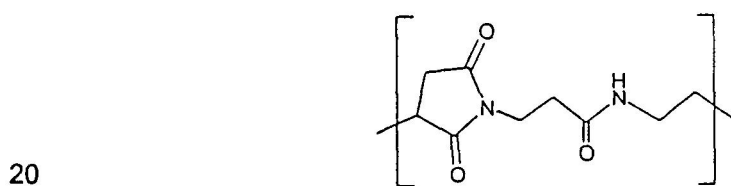
En la Fórmula 1, Y es



10 Preferiblemente Y es



15 Más preferiblemente Y es



En la Fórmula 1, el número m se selecciona de tal forma que el conjugado resultante de la Fórmula 1 tiene una actividad fisiológica comparable a la EPO no modificada, cuya actividad puede representar una o más de una fracción de la correspondiente actividad de la EPO no modificada. m representa el número de residuos de óxido de etileno en la unidad de PEG. Una única subunidad PEG de $-(OCH_2CH_2)_m-$ tiene

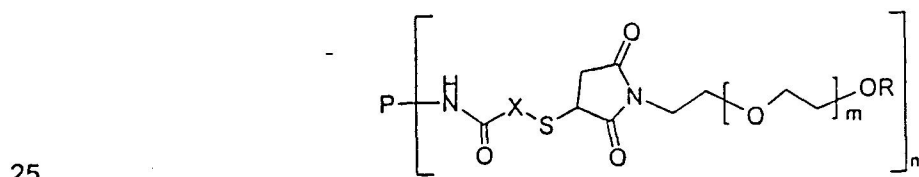
un peso molecular de alrededor de 44 daltons. Así, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número m. Un peso molecular de "alrededor" de un cierto número significa que se encuentra dentro de un

5 rango razonable de dicho número tal como se ha determinado mediante técnicas analíticas convencionales. m es un número entero que se encuentra entre 450 y alrededor de 900 (correspondiendo al peso molecular de entre 20 y 40 kDa), preferiblemente m se encuentra entre alrededor de 550 y alrededor de 800 (alrededor de 24 a 35 kDa), y más preferiblemente m se encuentra entre alrededor de 650 y alrededor de 700 (alrededor de 29 y alrededor de 31 kDa).

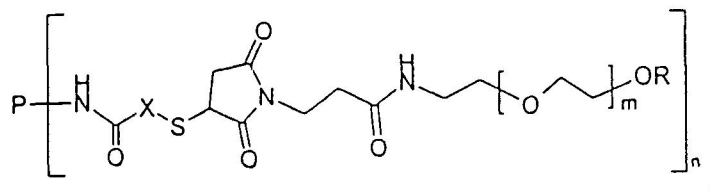
En la Fórmula 1, el número n es el número de grupos ε-amino de un aminoácido de lisina en una proteína eritropoyetina unida covalentemente a una unidad de PEG mediante un

15 enlace amida. Un conjugado de esta invención puede tener uno, dos o tres unidades de PEG por molécula de EPO. n es un número entero que se encuentra comprendido entre 1 y 3, preferiblemente n es 1 ó 2, y más preferiblemente n es 1.

20 Los productos de glucoproteína eritropoyetina se encuentran representados por las fórmulas:



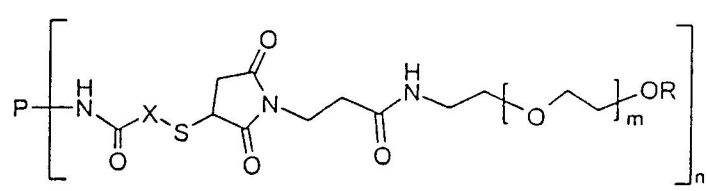
y



en donde P, R, X, m y n son tal como se han definido anteriormente.

Los productos de glucoproteína eritropoyetina más preferidos se encuentran representados por la fórmula:

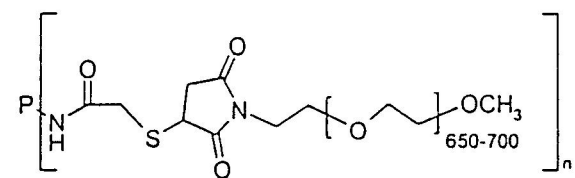
5



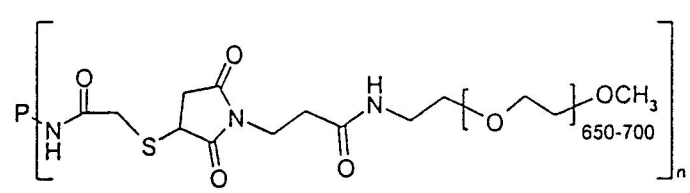
10 en donde P, R, X, M y n son tal como se han definido anteriormente.

Otros productos de glucoproteína eritropoyetina preferidos se encuentran representados mediante las fórmulas:

15



Y

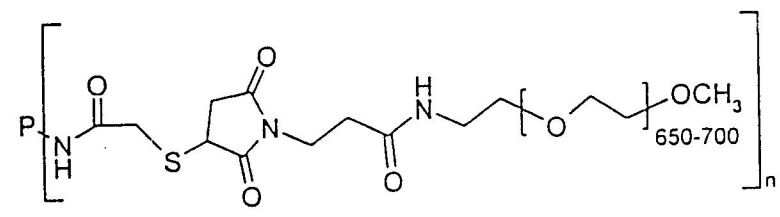


20

en donde P y n son como se han definido anteriormente.

Los productos de glucoproteína eritropoyetina más preferidos se encuentran representados por la fórmula:

25



en donde P y n son como se han definido anteriormente.

Los compuestos preferidos son aquéllos en los que X es $-(CH_2)_k-$, especialmente aquellos en los que k se encuentra entre 1 y 4, más preferiblemente aquéllos en los que X es -
5 CH_2 .

La invención también se refiere a los conjugados anteriores en donde m es un entero que se encuentra comprendido entre 550 y 800, preferiblemente m es un entero entre 650 y 700.

10 Los compuestos preferidos de la presente invención son aquéllos en los que n es 1 y/o R es metilo.

Además, la invención se refiere a los compuestos anteriores en los que el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 24
15 kilodaltons y alrededor de 35 kilodaltons, más preferiblemente alrededor de 30 kilodaltons.

Además, la presente invención se refiere a compuestos en los que la glucoproteína se encuentra unida covalentemente a uno o dos porciones de poli(etilen glicol) cuyo extremo es un alcóxilo inferior, más preferiblemente a una
20 porción de poli(etilen glicol) cuyo extremo sea un alcóxilo inferior.

En una realización preferida, las porciones de poli(etilen glicol) presentan en su extremo un grupo metoxi-
25 lo.

En la realización más preferida, la invención se refiere a los compuestos anteriores en los que X es $-CH_2-$, m es un entero que se encuentra entre 650 y 700, n es 1, R es

metilo, y en los que el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es alrededor de 30 kilodaltons.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un método para el tratamiento de anemia en humanos que comprende la administración a humanos de una cantidad terapéu-
5 ticamente efectiva de un producto de glucoproteína eritropoyetina representado por la Fórmula 1.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un método para la preparación de un producto de glucopro-
10 teína eritropoyetina, que presenta una actividad biológica *in vivo* que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos, dicho método comprende los pasos de:

(a) la reacción de forma covalente entre un grupo ϵ -
15 amino de un aminoácido de lisina de una proteína eritropoyetina representada por la fórmula $P-[NH_2]_n$ con un reactivo bifuncional representado por la fórmula $Z-CO-X-S-Q$, para formar un intermediario que presenta un enlace amida representado por la fórmula:

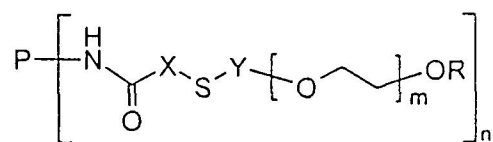


en donde P es una proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma un enlace amida; n es un entero que se encuentra comprendido entre 1 y 3; Z es un grupo reactivo, por ejemplo un éster del ácido carboxílico-NHS; X es -
25 $(CH_2)_k-$ ó $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, en donde k se encuentra comprendido entre alrededor de 1 y alrededor de 10; y Q es un grupo protector, como alcanóilo, por ejemplo acetilo.

b) la reacción de forma covalente entre el intermedia-

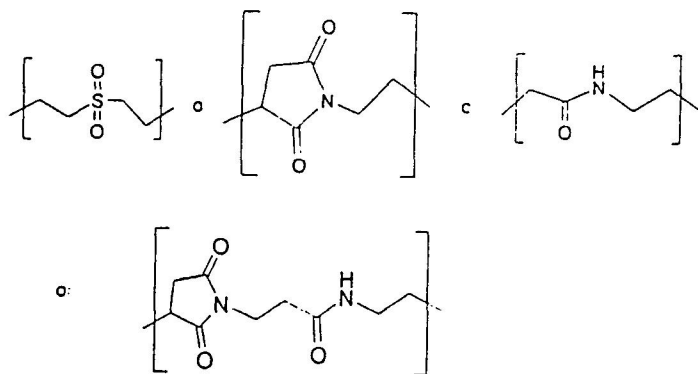
rio que presenta un enlace amida del paso (a) y un derivado de polietilen glicol activado representado por la fórmula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, para formar un producto de glucoproteína eritropoyetina representado por la fórmula:

5



en donde W es una forma reactiva sulfidrila de Y; m es un entero que se encuentra comprendido entre alrededor de 450 y alrededor de 900; R es alquilo inferior; e Y es

15



En esta realización, el reactivo bifuncional preferiblemente es N-succinimidil-S-acetiltiopropionato o N-succinimidil-S-acetiltioacetato, Z preferiblemente es N-hidroxisuccinimida, y el derivado de polietilen glicol activado $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona y metoxi-PEG-maleimida.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende conjugados, dichos conjugados comprenden una glucoproteína eritropoyetina que presenta al

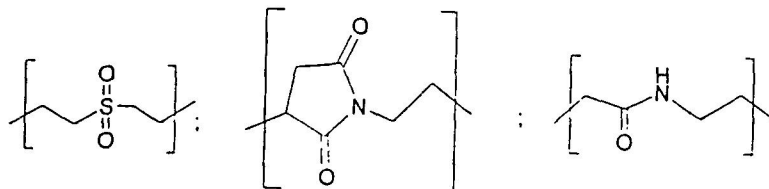
menos un grupo amino libre y que presenta una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo que consiste en la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcóxido inferior poli(etilenglicol), cada grupo poli(etilenglicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino,

X es $-(CH_2)_k-$ ó $-(CH_2(O-CH_2-CH_2))_k-$,

k se encuentra entre 1 y 10,

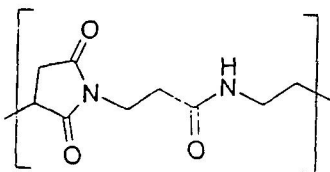
Y es

20



ó

25



el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons; y el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento. Preferiblemente la composición comprende conjugados como se han definido anteriormente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento, más preferiblemente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y dos por ciento, e incluso más preferiblemente en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y seis por ciento, y siendo la forma más preferida en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 se encuentra entre noventa y noventa y seis por ciento.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado o una composición tal como se ha definido anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable y el uso de un conjugado o una composición tal como se ha definido anteriormente para la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), y para el tratamiento de pacientes con SIDA y cáncer que han sido sometidos a quimioterapia. Además, la invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos relacionados con la anemia en pacientes con fallo renal

crónico (CRF), y pacientes con SIDA y cáncer que han sido sometidos a quimioterapia, comprendiendo el paso de la administración a un paciente de una composición tal como se ha descrito anteriormente.

- 5 La invención también se refiere a un proceso para la preparación de conjugados o composiciones tal como se han definido anteriormente, donde dicho proceso comprende la unión covalente de grupos tiol a una glucoproteína eritropoyetina y el acoplamiento de la resultante glucoproteína
- 10 eritropoyetina activada con un derivado de poli(etilen glicol) (PEG). Además, la invención se refiere a conjugados y composiciones tal como se han definido anteriormente siempre que se preparen mediante los procesos descritos anteriormente y a conjugados y composiciones tal como se han
- 15 definido anteriormente para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF) y pacientes con SIDA y cáncer que han sido sometidos a quimioterapia.

Métodos de expresión de proteínas EPO

- 20 La eritropoyetina (EPO) es una glucoproteína humana que estimula la formación de eritrocitos. Su preparación y aplicación terapéutica están descritas en detalle por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.547.933 y 5.621.080, EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad.
- 25 Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 y EPB 0 411 678 así como por Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, y Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. La eritropoyetina para usos tera-

péuticos se puede producir de forma recombinante (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 y Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224). La expresión de proteínas, incluyendo EPO, mediante activación génica endógena, es bien conocida en el campo y se revela, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Nos 5.733.761, 5.641.670 y 5.733.746 y las publicaciones de patente internacionales Nos. WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955, los contenidos de las cuales están incorporados aquí por referencia.

Los métodos para la expresión y preparación de la eritropoyetina en medio sin suero están descritas por ejemplo en WO 96/35718, de Burg publicada el 14 de Noviembre de 1996, y en la Publicación de Patente Europea No. 513 738, de Koch publicada el 12 de Junio de 1992.

Métodos para la purificación de la proteína EPO humana

En adición a las referencias mencionadas anteriormente, se sabe que se puede llevar a cabo una fermentación libre de suero de células CHO recombinantes que contengan un gen EPO. Tales métodos están descritos por ejemplo en EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 y de forma general por Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. and Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

En EP-A 0 267 678 se describe una cromatografía de intercambio iónico en S-Sefarosa, un HPLC en fase reversa

preparativo en una columna C₈ y una cromatografía de filtración en gel para la purificación de EPO producida en cultivo sin suero tras realizar una diálisis. En esta relación, el paso de cromatografía de filtración en gel se puede sustituir por cromatografía de intercambio iónico en S-Sepharose fast flow. También se propone realizar una cromatografía con pigmento en una columna de Azul de Trisacrilo de forma previa a la cromatografía de intercambio iónico.

Se describe un proceso para la purificación de la EPO recombinante en Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359. En este proceso, la EPO se trata con una solución de Tween® 20, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, etilmaleimida, pestatina A, sulfato de cobre y ácido oxámico de forma previa a los pasos de purificación.

Múltiples referencias como WO 96/35718, de Burg publicada el 14 de Noviembre de 1996, revelan un proceso para la preparación de eritropoyetina en un proceso de fermentación libre de suero (EPOsf). A continuación se explica a modo de ejemplo un método para producir EPO como material de partida para la pegilación.

Ensayo biológico para la determinación de la actividad específica de EPO y conjugados de EPO

La actividad específica de EPO o conjugados de EPO de acuerdo con esta invención, se puede determinar mediante varios ensayos conocidos en el campo. La actividad biológica de las proteínas EPO purificadas de esta invención es tal que la administración de la proteína EPO por inyección a pacientes humanos consigue que las células de la médula

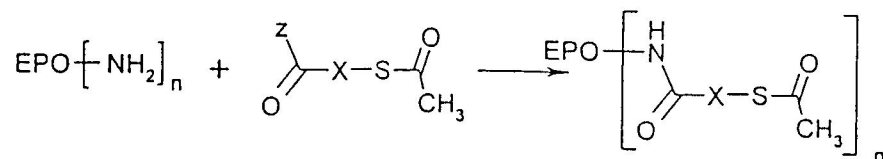
ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos comparado con los sujetos no inyectados o grupos control. La actividad biológica de las proteínas EPO, o fragmentos de las mismas, obtenidos y purificados de acuerdo con esta invención se pueden determinar por métodos de acuerdo con Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

Otro ensayo biológico para determinar la actividad de la proteína EPO, el ensayo normocitémico de ratón, se describe en el Ejemplo 4.

Procesos para la preparación de EPO pegilada

Los procesos para la preparación de productos de glucoproteína eritropoyetina representada por la Fórmula 1 comprende la unión covalente de grupos tiol a EPO ("activación") y el acoplamiento de la resultante EPO activada con un derivado de poli(etilen glicol) (PEG). El primer paso para la preparación de EPO pegilada de acuerdo con la presente invención comprende la unión covalente de grupos tiol por grupos NH_2 de EPO. Esta activación de EPO se lleva a cabo con reactivos bifuncionales que llevan un grupo tiol protegido y un grupo reactivo adicional, tal como ésteres activos (por ejemplo un succinimidiléster), anhídridos, ésteres de ácido sulfónico, halogenuros de ácidos carboxílicos y ácidos sulfónicos, respectivamente. El grupo tiol está protegido por grupos conocidos en el campo, por ejemplo grupos acetilo. Estos reactivos bifuncionales son capaces de reaccionar con grupos ξ -amino de aminoácidos de lisina formando un enlace amida. El primer paso de la reacción se

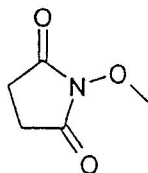
presenta a continuación:



5

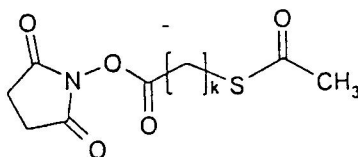
EPO, n y X son tal como se han definido anteriormete y Z es un grupo reactivo conocido en el campo, por ejemplo un substituyente N-hidroxi-succinimida (NHS) de la fórmula

10

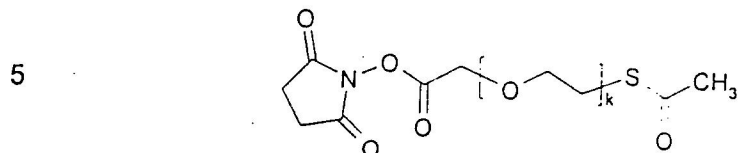
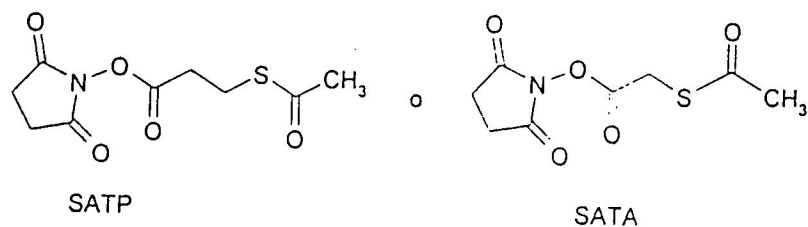


En una realización preferida la activación de los grupos ε-amino se lleva a cabo por la reacción con reactivos bifuncionales que tienen una porción de succinimidilo. Los reactivos bifuncionales pueden llevar diferentes especies de espaciadores, por ejemplo porciones $-(\text{CH}_2)_k-$ ó $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_k-$, en donde k se encuentra comprendido entre 1 y alrededor de 10, preferiblemente entre 1 y alrededor de 4 y más preferiblemente 1 ó 2, y la forma más preferida donde es 1. Ejemplos de estos reactivos son N-succinimidil-S-acetilpropionato (SATP) y N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA)

25



1) Tipo acetiltioalquil-carboxílico-NHS-éster



2) 2-(Acetiltio)-(etoxi)_k-ácido acético-NHS-éster

con k como se ha definido anteriormente.

La preparación de los reactivos bifuncionales es conocida en el campo. Los precursores de 2-(acetiltio)-(etoxi)_k-ácido acético-NHS-ésteres se describen en DE-3924705, mientras que la derivación al compuesto de acetiltio está descrita por March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. SATA se encuentra disponible comercialmente (Molecular Probes, Eugene, OR, USA and Pierce, Rochford, IL).

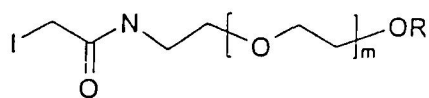
El número de grupos tiol que se añaden a una molécula de EPO se pueden seleccionar mediante el ajuste de los parámetros de reacción, tales como la concentración de proteína (EPO) y la relación proteína/reactivo bifuncional. Preferiblemente, la EPO se activa mediante la unión covalente de entre 1 y 5 grupos tiol por molécula de EPO, más preferiblemente entre 1,5 y 3 grupos tiol por molécula de EPO. Estos rangos se refieren a la distribución estadística del grupo tiol sobre la población de proteína EPO.

La reacción se lleva a cabo, por ejemplo, en una solución tampón acuosa, pH 6,5-8,0, por ejemplo en fosfato po-

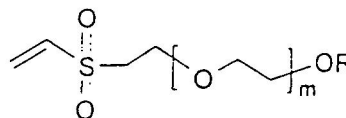
tásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional se puede añadir en DMSO. Tras la finalización de la reacción, preferiblemente tras 30 minutos, la reacción se para mediante la adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional se puede separar por métodos conocidos en el campo, por ejemplo por diálisis o filtración en columna. El número medio de grupos tiol añadidos a la EPO se pueden determinar mediante métodos fotométricos descritos en, por ejemplo, Grasetti, D.R. and Murray, J.F. en J. Appl. biochem. Biotechnol. 119, 41-49 (1967).

La reacción anterior es seguida por el acoplamiento covalente de un derivado de polietilen glicol (PEG) activado. Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular medio de entre alrededor de 20 y alrededor de 40 kDa, más preferiblemente entre alrededor de 24 y alrededor de 35 kDa, y siendo la forma más preferida alrededor de 30 kDa.

Los derivados de PEG activados son conocidos en el campo y están descritos en, por ejemplo, Morpurgo, M. et al. J. Bioconj. Chem (1966) 7, página 363 ff para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son adecuadas para la preparación de los compuestos de la Fórmula 1. Los ejemplos de los reactivos de PEG reactivos son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi-PEG-vinilsulfona:

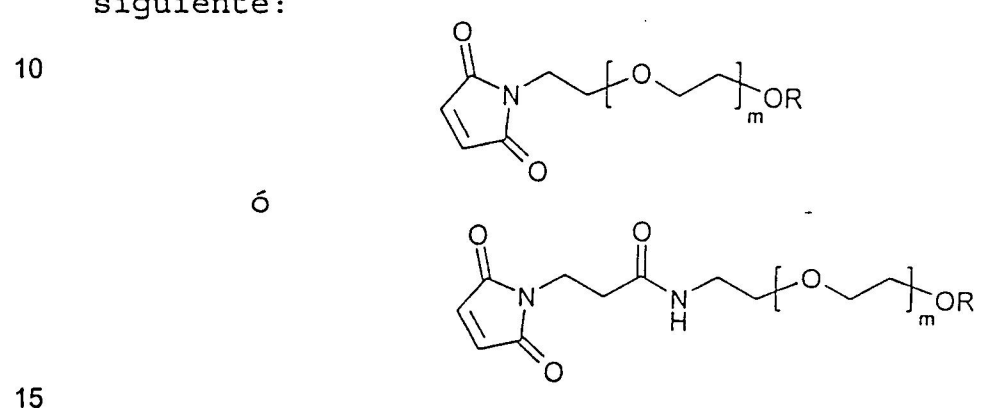


o



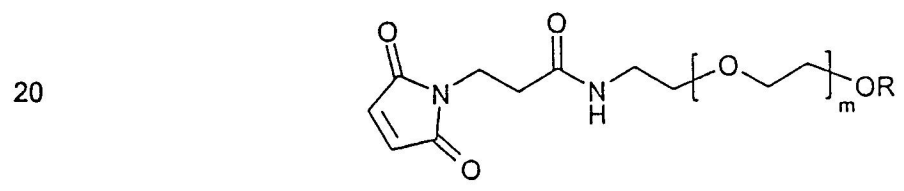
El uso de estas sustancias activadas por yodo es conocido en el campo y están descritas por ejemplo por Hermanson, G.T. en Bioconjugate Techniques, Academic Presss, San Diego (1996) p. 147-148.

5 Más preferiblemente, las especies PEG están activadas por maleimida usando (alcoxi-PEG-maleimida), tal como metoxi-PEG-maleimida (Peso molecular 30000; Shearwater Polymers, Inc.). La estructura de alcoxi-PEG-maleimida es la siguiente:



con R y m tal como se han definido anteriormente.

El derivado más preferido es



en donde R y m son tal como se han definido anteriormente.

- La reacción de acoplamiento con alcoxi-PEG-maleimida tiene lugar tras la escisión *in situ* del grupo protector tiol en una solución tampón acuosa, por ejemplo fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2. La escisión del grupo protector se puede realizar, por ejemplo, con hidroxilamina en DMSO a 25 °C, pH 6,2 durante alrededor de 90

minutos. Para la modificación del PEG, la relación molar de EPO activada/alcoxi-PEG-maleimida deber ser entre alrededor de 1:3 y alrededor de 1:6 y preferiblemente 1:4. La reacción se puede parar mediante la adición de cisteína y haciendo reaccionar los grupos tiol (-SH) remanentes con N-metilmaleimida u otros compuestos apropiados capaces de formar puentes disulfuro. Debido a la reacción de cualquier grupo tiol activo remanente con un grupo protector tal como N-metilmaleimida u otro grupo protector adecuado, las glucoproteínas EPO en los conjugados de esta invención pueden contener dichos grupos protectores. Generalmente el procedimiento descrito aquí producirá una mezcla de moléculas con números variables de tioles protegidos por un número diferente de grupo protector, dependiendo del número de grupos tioles activados en la glucoproteína que no se han conjugado con PEG-maleimida.

Mientras que N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se usa para bloquear los grupos tiol remanentes en la proteína pegilada, los compuestos con puentes disulfuro darán lugar a una reacción de intercambio sulfuro/disulfuro intermolecular a un acoplamiento con puente disulfuro del reactivo de bloqueo. Los reactivos de bloqueo preferidos para ese tipo de reacción de bloqueo son glutatión oxidizado (GSSG), cisteína y cistamina. Mientras que con la cisteína no se introduce una carga neta adicional en la proteína pegilada, el uso de los reactivos de bloqueo GSSG o cistamina resulta en una carga adicional negativa o positiva.

La purificación posterior de los compuestos de la Fórmula 1, incluyendo la separación de las especies mono-, di- y tripegiladas, se puede llevar a cabo por métodos conocidos en el campo, por ejemplo, cromatografía en columna.

5 Composiciones farmacéuticas

Los productos de la glucoproteína eritropoyetina preparados de acuerdo con esta invención se pueden preparar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección con un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable mediante
10 métodos conocidos en el campo. Por ejemplo, se han descrito composiciones adecuadas en W097/09996, W097/40850, W098/58660, y W099/07401. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables que se prefieren para la formulación de los productos de la invención se encuentran la albúmina de
15 suero humano, proteínas de plasma humano, etc. Los compuestos de la presente invención se podrían formular en tampón de fosfato de sodio/potasio 10 mM a pH 7 que contiene un agente de tonicidad, por ejemplo cloruro de sodio 132 mM. De forma opcional la composición farmacéutica puede conte-
20 ner un conservante. La composición farmacéutica puede contener diferentes cantidades de eritropoyetina, por ejemplo 10-1000 µg/ml, por ejemplo 50 µg ó 400 µg.

Tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por la baja o defectiva producción de glóbulos rojos

25 La administración de los productos de la glucoproteína eritropoyetina de la presente invención provoca la formación de glóbulos rojos en humanos. Por lo tanto, la administración de los productos de la glucoproteína eritropoye-

tina repone esta proteína EPO que es importante en la producción de glóbulos rojos. Las composiciones farmacéuticas que contienen los productos de glucoproteína eritropoyetina se pueden formular a una potencia efectiva para la administración por varios medios a un paciente humano que sufra trastornos sanguíneos caracterizados por la baja o defectiva producción de glóbulos rojos, mostrándose solo o formando parte de un estado o enfermedad. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante inyección tal como por inyección subcutánea o intravenosa. Las cantidades medias de producto de glucoproteína eritropoyetina pueden variar y en particular se deben basar en las recomendaciones y prescripciones de un médico cualificado. La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo exacto de estado a tratar, el estado del paciente a tratar, así como otros ingredientes en la composición. Por ejemplo, entre 0,01 y 10 μg por kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 y 1 μg por kg de peso corporal, se pueden administrar por ejemplo una vez a la semana.

A lo largo de esta solicitud se han referenciado varias publicaciones. Las revelaciones en estas publicaciones se han incorporado aquí por referencia para describir más completamente el estado del campo.

La presente invención también está ilustrada por los siguientes ejemplos que se han presentado con el propósito de demostrar, la preparación de los compuestos y composiciones de esta invención sin la intención de limitarla.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Fermentación y Purificación de EPO Humana

a) Preparación del inóculo y fermentación

Se tomó un vial del Working Cell Bank, originado a partir de una línea celular CHO que produce EPO (se puede usar ATCC CRL8695, revelada en EP 411 678 (Genetics Institute)) a partir de la fase gas del depósito de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células se transfirieron a tubos de centrífuga de vidrio y se cultivaron en un medio tamponado con hidrógeno carbonato en un incubador humidificado de CO₂. Los típicos medios sin suero usados para la preparación del inóculo y la fermentación se revelan en la Solicitud de Patente Europea 513 738, de Koch publicada el 12 Junio de 1992, o WO 96/35718, de Burg publicada el 14 de Noviembre de 1996, por ejemplo contienen como medio DMEM/F12 (por ejemplo JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, No. 57736) y de modo adicional hidrógenocarbonato sódico, L+glutamina, D+glucosa, insulina recombinante, selenita sódica, diaminobutano, hidrocortisona, sulfato de hierro (II), asparagina, ácido aspártico, serina y un estabilizante para células de mamífero tal como por ejemplo alcohol de polivinilo, metil celulosa, polidextrano, polietilen glicol, Pluronic F68, expansor de plasma poligelina (HEMACCEL®) o polivinil pirrolidona (WO 96/35718).

Los cultivos se comprobaron microscópicamente para detectar la ausencia de microorganismos contaminantes y se determinaron las densidades celulares. Estos ensayos se realizaron en cada paso de fraccionamiento.

Tras el período de crecimiento inicial, el cultivo celular se diluyó con medio fresco hasta conseguir la densidad celular inicial y se comenzó otro ciclo celular. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo un volumen de
5 cultivo de aproximadamente 2 litros por tubo de centrífuga de vidrio. Tras aproximadamente 12 duplicaciones, se encontraron disponibles entre 1 y 5 litros de este cultivo, los cuales entonces se usaron como inóculo para el fermentador de inóculo de 10 litros.

10 Tras entre 3 y 5 días, el cultivo del fermentador de 10 litros se pudo usar como inóculo para el fermentador de inóculo de 100 litros.

Tras otros 3-5 días de cultivo, el cultivo en los 100 litros de fermentación se puede usar como inóculo para el
15 fermentador de inóculo de 1000 litros.

b) Recogida y Separación Celular

Se usó un proceso de realimentación en lote, es decir cuando se alcanza la densidad celular deseada, se recoge aproximadamente el 80% del cultivo. El cultivo remanente es
20 rellenado con medio de cultivo fresco y se hace crecer hasta la siguiente recogida. Una ronda de producción consiste en un máximo de 10 ciclos de recogida: 9 ciclos de recogidas parciales y 1 ciclo de recogida completa al final de la fermentación. El ciclo de recogida tiene lugar cada 3 - 4
25 días.

El determinado volumen recogido es transferido a un recipiente enfriado. Las células son separadas por centrifugación o filtración y eliminadas. La EPO que contiene el

sobrenadante del paso de la centrifugación se filtró en línea y se recogió en un segundo recipiente enfriado. Cada cultivo recogido se procesa de modo separado durante la purificación.

5 Un proceso típico para la purificación de la proteína EPO se revela en WO 96/35718, de Burg publicado el 14 de Noviembre de 1996. El proceso de purificación se explica de modo ejemplar a continuación.

a) Cromatografía de Sefarosa Azul

10 La Sefarosa azul (Pharmacia) consiste en bolitas de Sefarosa, en la superficie de las cuales el colorante Cibacron azul se encuentra unido covalentemente. Como la EPO se une con más fuerza a la Sefarosa Azul que muchos de los contaminantes no protéicos, algunas impurezas protéicas y
15 PVA, la EPO se puede enriquecer en este paso. La elución de la columna de Sefarosa Azul se lleva a cabo incrementando la concentración de sales, así como el pH.

La columna se empaquetó con entre 80-100 litros de Sefarosa Azul, se regeneró con NaOH y se equilibró con tampón
20 de equilibrado (cloruro de sodio/calcio y acetato sódico). Se cargó el sobrenadante de la fermentación acidificado y filtrado. Tras finalizar la carga, la columna se lavó en primer lugar con un tampón similar al tampón de equilibrio, que contenía una mayor concentración de cloruro de so-
25 dio y posteriormente con un tampón Tris-base. El producto se eluyó con un tampón Tris-base y se recogió en una fracción única de acuerdo con el perfil de elución patrón.

b) Cromatografía de Butil Toyopearl

El Butil Toyopearl 650 C (Toso Haas) es una matriz basada en poliestireno a la cual están acoplados residuos alifáticos de butilo. Como la EPO se une con más fuerza a este gel que muchas de las impurezas y PVA, se eluyó con un tampón que contiene isopropanol.

La columna se empaquetó con entre 30-40 litros de Butil toyopearl 650 C, se regeneró con NaOH, se lavó con un tampón Tris-base y se equilibró con un tampón Tris-base que contenía isopropanol.

El eluido de Sefarosa Azul se ajustó a la concentración de isopropanol en el tampón de equilibrado de la columna y se cargó en la columna. Entonces la columna se lavó con el tampón de equilibrado siguiendo una concentración creciente de isopropanol. El producto se eluyó con el tampón de elución (tampón Tris-base con un mayor contenido de isopropanol) y se recogió en una fracción única de acuerdo con el perfil de elución patrón.

c) Cromatografía Ultrogel Hidroxiapatita

El Ultrogel Hidroxiapatita (Biosepra) consiste en Hidroxiapatita que se incorpora en una matriz de agarosa para mejorar las propiedades mecánicas. La EPO tiene una menor afinidad por la Hidroxiapatita y se puede eluir por tanto a concentraciones menores de fosfato que las impurezas proteicas.

La columna se rellenó con entre 30-40 litros de Ultrogel Hidroxiapatita y se regeneró con un tampón de fosfato potásico/cloruro cálcico y NaOH seguido por un tampón Tris-

base. Entonces se equilibró con un tampón Tris-base que contiene una cantidad menor de isopropanol y cloruro sódico.

La EPO contenida en el eluido de la cromatografía Butil Toyopearl se introduce en la columna. Posteriormente la columna se lavó con tampón de equilibrado y un tampón Tris-base sin isopropanol y cloruro sódico. El producto se eluyó con un tampón Tris-base que contenía una menor concentración de fosfato potásico y se recogió en una fracción única de acuerdo con el perfil de elución patrón.

d) HPLC de Fase Reversa en Vydac C4

El material RP-HPLC Vydac C4 (Vydac) consiste en partículas de gel de sílice, las superficies de las cuales llevan cadenas C4-alquilo. La separación de EPO de las impurezas protéicas se basa en las diferencias en cuanto a la fuerza de las interacciones hidrofóbicas. La elución se lleva a cabo con un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético diluido.

El HPLC preparativo se realizó mediante una columna de acero inoxidable (rellenada con entre 2,8 y 3,2 litros de gel de sílice Vydac C4). El eluido de Hidroxiapatita Ultrogel se acidificó mediante la adición de ácido trifluoroacético y se introdujo en la columna Vydac C4. Para el lavado y la elución se utilizó un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético. Las fracciones se recogieron e inmediatamente se neutralizaron con tampón fosfato. Las fracciones EPO que se encontraron dentro de los límites IPC se combinaron.

e) Cromatografía Sefarosa DEAE

El material de Sefarosa DEAE (Pharmacia) consiste en grupos dietilaminoetil (DEAE) que se encuentran covalentemente unidos a la superficie de las bolas de Sefarosa. La
5 unión de EPO a los grupos DEAE está mediada por interacciones iónicas. El acetonitrilo y el ácido trifluoroacético pasaron a través de la columna sin ser retenidos. Después de que se lavaron estas sustancias, se eliminaron las trazas de impurezas mediante el lavado de la columna con tam-
10 pón acetato a bajo pH. Entonces la columna se lavó con tampón fosfato neutro y la EPO se eluyó con un tampón con fuerza iónica creciente.

La columna se empaquetó con Sefarosa DEAE fast flow. El volumen de la columna se ajustó para asegurar una carga
15 de EPO en el rango de 3-10 mg EPO/ml gel. La columna se lavó con agua y tampón de equilibrado (fosfato sódico/potásico). Las fracciones combinadas del eluido de HPLC se cargaron y la columna se lavó con tampón de equilibrado. Entonces la columna se lavó con tampón de lavado (tampón de
20 acetato sódico) y posteriormente con tampón de equilibrado. Posteriormente, la EPO se eluyó de la columna con tampón de elución (cloruro sódico, fosfato sódico/potásico) y se recogió en un fracción única de acuerdo con el perfil de elución patrón.

25 El eluido de la columna Sefarosa DEAE se ajustó a la conductividad especificada. La sustancia resultante se filtró quedando estéril en botellas de Teflon y se conservó a -70°C.

EJEMPLO 2: Unión covalente de grupos tiol a EPO

Este ejemplo revela la determinación de estados de reacción para la unión covalente de grupos tiol con EPO. Para determinar estos estados, se añadieron diferentes cantidades de un reactivo que contenía un grupo tiol bloqueado, aquí SATA o SATP (disueltos en DMSO hasta 10 mg/ml) a la solución de EPO, aquí a 1 ml de EPO 5 mg/ml en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. La reacción se agitó durante 30 minutos (25 °C) y se paró por la adición de una solución de lisina 1M a 10 mM. Las cantidades en exceso de SATA y SATP se eliminaron por diálisis contra fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM, pH 6,2. Tras la eliminación del grupo acetilo protector con hidroxilamina, el número de grupos tiol unidos covalentemente a EPO se determinó fotométricamente con ditiopiridina según el método descrito por Grasetti, D.R. and Murray, J.F. en J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, página 41-49 (1967).

El número de grupos tiol unidos covalentemente por molécula EPO se muestra a continuación.

Relacion molar EPO: SAT o SATP	Mol grupos tiol/ mol EPO
EPO:SATA = 1:3	1,5
EPO:SATA = 1:5	2.4
EPO:SATA = 1:6	3.2
EPO:SATP = 1:3	1.3
EPO:SATP = 1:4	2.5
EPO:SATP = 1:6	3.7

EJEMPLO 3: Modificación de EPO activada con metoxi-PEG-maleimida

A) Activación de EPO:

100 mg de EPO producidos según el Ejemplo 1 (190.000
5 UI/mg determinado según el ensayo normocitémico se activa-
ron con SATA (relación molar: EPO/SATA= 1/5) según el Ejem-
plo 2. La EPO resultante ("EPO activada") que lleva unido
covalentemente grupos tiol bloqueados fue separada de los
productos secundarios como N-hidroxi-succinimida o SATA que
10 no reaccionó por diálisis como se describe en el Ejemplo 1.
Se obtuvo una solución de EPO activada 4,5 mg/ml en fosfato
potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2.

B) Pegilación de EPO activada:

380 mg de metoxi-PEG-maleimida con la estructura "más
15 preferida mostrada anteriormente (PM 30.000; Shearwater Po-
lymers, Inc. Huntsville (Alabama, USA)) se disolvieron en
la solución anterior que contenía 95 mg de EPO activada
(4,5 mg/ml en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2
mM, pH 6,2). La relación molar resultante entre la EPO ac-
20 tivada y metoxi-PEG-maleimida en la solución fue de 1:4.
Mediante la adición de una solución acuosa de hidroxilamina
1M hasta 30 mM, pH 6,2 a la solución anterior, los grupos
tiol bloqueados unidos covalentemente de la EPO activada se
desbloquearon. La EPO activada resultante en la mezcla de
25 reacción de la solución contenía grupos tiol (-SH) libres.
Inmediatamente tras el desbloqueo de los grupos tiol, se
llevó a cabo la reacción de acoplamiento entre la EPO acti-
vada que ahora contenía grupos tiol (-SH) libres y metoxi-

PEG-maleimida durante 90 minutos (agitación, 25 °C). La reacción de acoplamiento se paró mediante la adición de una solución acuosa de cisteína 0,2 M hasta 2 mM a la mezcla de reacción. Tras 30 minutos, los grupos tiol libres en exceso de la EPO activada que no reaccionaron con metoxi-PEG-maleimida se bloquearon mediante la adición de una solución de N-metilmaleimida 0,5 M en DMSO para conseguir una concentración de 5 mM. Tras 30 minutos, la mezcla de reacción resultante que contenía especies EPO pegiladas se dializó con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5 durante ≥ 15 horas.

C) Purificación de especies EPO pegiladas:

Para la separación de las especies EPO pegiladas de la mezcla de reacción, se llevó a cabo al siguiente proceso de purificación: Una columna Q-Sepharose ff de 50 ml se equilibró con fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. La mezcla de reacción obtenida en el paso B) se introdujo en la columna (tasa del flujo: 3 volúmenes de columna (VC) por hora). Con la finalidad de separar el reactivo de metoxi-PEG-maleimida que no había reaccionado, la columna se lavó con 5 VC de fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. Las especies EPO pegiladas se separaron mediante la elución con un gradiente de sal creciente que consistía en 5 VC de tampón A (fosfato potásico 10 mM, pH 7,5) y 5 VC de tampón B (fosfato potásico 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) con una tasa de flujo de 3 VC por hora. Según el gradiente de NaCl, las especies EPO pegiladas (especies EPO tri-, bi- y mono-pegiladas) se eluyeron en primer lugar, seguidas por las especies EPO no pegiladas. La fracción del eluido que contenía las especies EPO

pegiladas (especies EPO tri-, bi- y mono-pegiladas) se combinó y se filtró (filtración estéril con un filtro de 0,2 μ m).

El contenido y pureza de las especies EPO tri-, di- y mono-pegiladas se evaluó en geles SDS-PAA con tinción de Coomassie (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)) mientras que la concentración de proteína se midió a 280 nm según la ley de Beer-Lambert. Los pesos moleculares aparentes de las especies EPO determinadas por electroforesis SDS-PAA se encontraban alrededor de 68 kDa (especies EPO mono-pegiladas), alrededor de 98 kDa (especies EPO di-pegiladas) y alrededor de 128 kDa (especies EPO tri-pegiladas).

La separación posterior de las especies EPO tri- di- y mono-pegiladas se puede conseguir mediante cromatografía, por ejemplo mediante cromatografía de exclusión de tamaño (Superdex, pg 200; Pharmacia).

La determinación de la actividad biológica in-vivo del eluido que contenía las especies tri- di- y mono-pegiladas se llevó a cabo por el método descrito en el Ejemplo 4.

EJEMPLO 4: Actividad in-vivo de EPO pegilada determinada mediante el ensayo normocitémico de ratón.

El bioensayo normocitémico de ratón es conocido en el campo (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) y se describe un método en la monografía de eritropoyetina de Ph. Eur. BRP. Las muestras se diluyeron con BSA-PBS. A ratones sanos de 7-15 semanas de edad, se les administraron s.c. 0,2 ml de la fracción de EPO que contenía EPO tri-, di- o mono-pegilada tal como se describe en

el ejemplo 2. Durante un período de 4 días, empezando 72 horas tras la administración, se les extrajo sangre por punción de la vena de la cola y se diluyó de forma que 1 μ l de sangre se encontraba presente en 1 ml de una solución de tinción naranja de acridina 0,15 μ mol. El tiempo de tinción oscila entre 3 y 10 minutos. Los contajes de reticulocito se llevaron a cabo de forma microfluorométrica en un citómetro de flujo mediante análisis del histograma de fluorescencia rojo. Los contajes de reticulocito se dieron en términos de valores absolutos (por 30.000 células sanguíneas analizadas). Para los datos presentados, cada grupo consistió en 5 ratones por día, y los ratones fueron sangrados sólo una vez.

A los ratones se les administró metoxi-PEG-maleimida acoplada a EPO según el Ejemplo 3, EPO no modificada y solución tampón. Los resultados se muestran en la Figura 3. Los resultados muestran la mayor actividad y vida media prolongada de las especies EPO pegiladas, indicado por las cantidades significativamente crecientes de reticulocitos y el cambio del valor máximo de reticulocitos suministrando la misma dosis por ratón.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- 25 (A) NOMBRE: F.Hoffmann-La Roche AG
(B) CALLE: 124 Grenzacherstrasse
(C) CIUDAD: Basilea
(E) PAÍS: Suiza

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070

(G) TELÉFONO: (61) 688 11 11

(H) FAX: (61) 688 13 95

(I) TELEX: 962 292 hlr ch

5 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Conjugados de Eritropoye-
tina

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3

(iv) FORMA LEGIBLE POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Disco flexible

10 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA DE OPERACIÓN: WORD

(D) SOFTWARE: PatentIn Release 2.0

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

15 <211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu

20 1 5 10

Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr

15 20 25

Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile

30 35

25 Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys

40 45 50

Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln

55 60 65

Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln
70 75
Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu
80 85 90
5 Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser
95 100
Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
105 110 115
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu
10 120 125 130
Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg
135 140
Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
145 150 155
15 Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
160 165
<210> 2
<211> 166
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<400> 2
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu
1 5 10
Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr
25 15 20 25
Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile
30 35

Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys
 40 45 50
 Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln
 55 60 65
 5 Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln
 70 75
 Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu
 80 85 90
 Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser
 10 95 100
 Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu
 120 125 130
 15 Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg
 135 140
 Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
 145 150 155
 Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 20 160 165
 <210> 3
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 3
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
 1 5 10

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

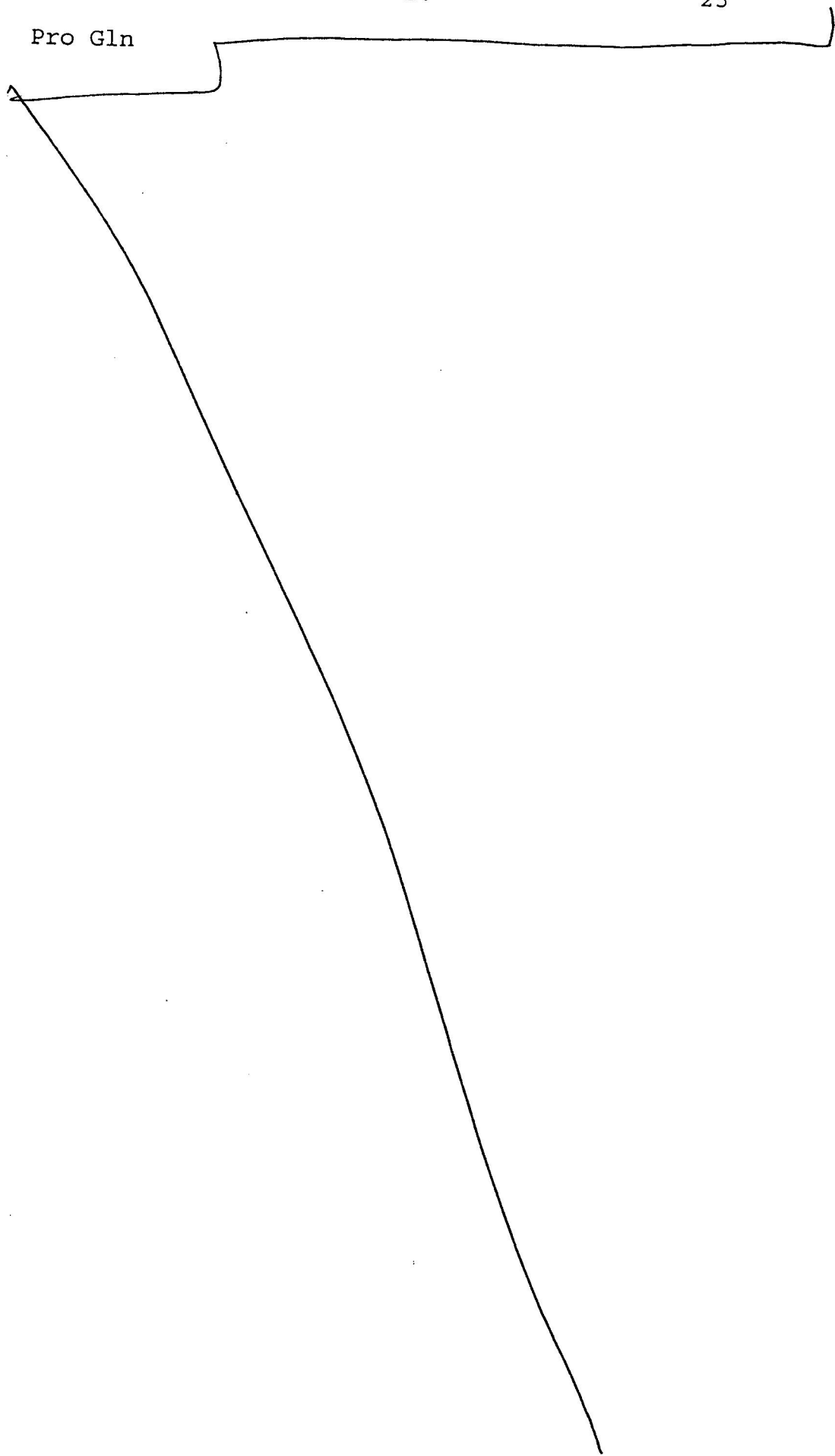
15

20

25

Pro Gln

5



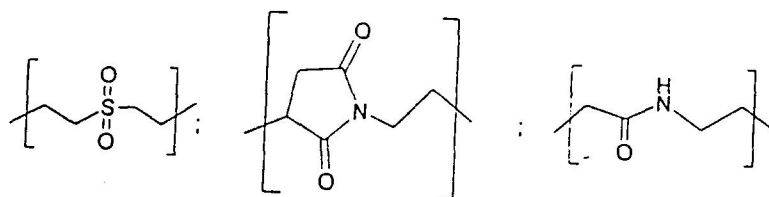
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, dicho conjugado comprende una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, [que presenta una actividad biológica *in vivo* con la
5 que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y] que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma? que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre
10 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi-inferior poli(etilen glicol), cada grupo poli(etilen glicol) se encuentra unido covalentemente a la
15 glucoproteína mediante un conector con la fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, con el $C(O)$ del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino,

X es $-(CH_2)_k-$ ó $-(CH_2(O-CH_2-CH_2))_k-$,

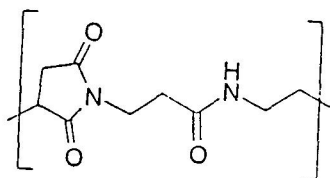
k se encuentra entre 1 y 10,

20 Y es



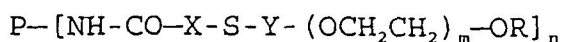
ó

25



el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons.

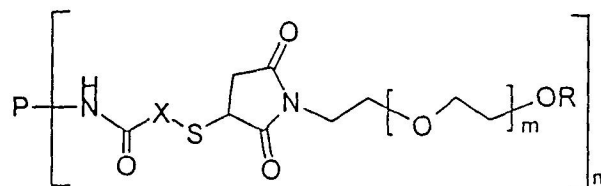
2. El conjugado de la reivindicación 1, de la fórmula



en donde X e Y son tal como se han definido en la reivindicación 1, m se encuentra comprendido entre 450 y 900, n se encuentra comprendido entre 1 y 3, R es alquilo inferior y P es la glucoproteína eritropoyetina menos el grupo amino o grupos amino que forman un enlace amida con X.

3. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, de la fórmula

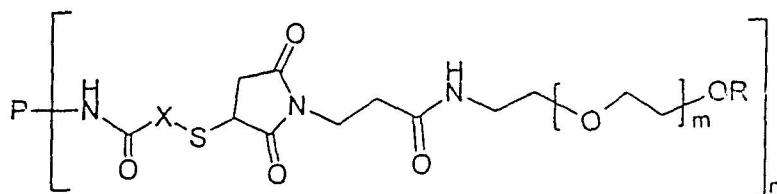
15



en donde P, R, X, m y n son tal y como se han definido en la reivindicación 2.

4. El conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 1, ó 2, de la fórmula

25



en donde P, R, X, m y n son tal y como se han definido en la reivindicación 2.

5. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde X es $-(CH_2)_k-$.
6. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde k está comprendido entre 1 y 4.
- 5 7. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde X es $-(CH_2)-$.
8. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde m es un número entero que se encuentra comprendido entre 550 y 800.
- 10 9. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde m es un número entero que se encuentra comprendido entre 650 y 700.
10. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde n es 1.)
- 15 11. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en donde R es metilo. $(R_2-$
12. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra comprendido entre
- 20 alrededor de 24 kilodaltons y alrededor de 35 kilodaltons.
13. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es de alrededor de 30 kilodaltons.
- 25 14. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína se encuentra unida covalentemente a una o dos porciones de poli(etilen glicol) cuyo extremo es alcóxido inferior.

- 54
15. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde las porciones de poli(etilen glicol) presentan en su extremo un grupo metoxilo.
16. El conjugado de cualquier reivindicación precedente, en
5 donde X es $-\text{CH}_2-$, m es un número entero comprendido entre 650 y 700, n es 1, R es metilo, y en donde el peso molecular medio de cada porción de poli(etilen glicol) es de alrededor de 30 kilodaltons.
17. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación
10 precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.
18. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina se expresa mediante activación génica endógena.
- 15 19. El conjugado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la glucoproteína eritropoyetina tiene la secuencia mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) o en la Figura 2 (SEQ ID NO:2).
- 20 20. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la glucoproteína eritropoyetina tiene la secuencia mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO:1).
21. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición
25 de entre 1 y 6 sitios de glucosilación.
22. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 y 10, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por una

modificación seleccionada del grupo que consiste en:

- Asn³⁰Thr³²;
- Asn⁵¹Thr⁵³,
- Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
- 5 Asn⁶⁹;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
- Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- 10 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
- Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
- 15 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
- Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
- Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
- Thr¹²⁵; y
- 20 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

23. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la glucoproteína tiene una secuencia que comprende la secuencia de la eritropoyetina humana y una segunda secuencia en el extremo carboxilo de

25 la secuencia de la eritropoyetina humana, en donde la segunda secuencia contiene al menos un sitio de glucosilación.

24. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la segunda secuencia comprende una secuencia derivada de la secuencia del extremo carboxilo de la gonadotropina coriónica humana.

5 25. El conjugado de la reivindicación 24, en donde la glucoproteína tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) eritropoyetina humana que tiene la secuencia aminoacídica Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
10 Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (SEQ ID NO:3), prolongándose desde el extremo carboxilo;

(b) la secuencia en (a) modificado por Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
y

15 (c) la secuencia en (a) modificado por Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

26. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante una
20 nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación.

27. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la nueva disposición comprende la delección de cualquiera de los sitios de unión N a carbohidrato en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de unión N a
25 carbohidrato en la posición 88 de la secuencia de la eritropoyetina humana.

28. El conjugado de la reivindicación 14, en donde la glucoproteína tiene la secuencia de la eritropoyetina humana

modificada por una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

EPO Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;

EPO Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y

5 EPO Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

29. Una composición que comprende conjugados, cada uno de dichos conjugados comprende una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre, [que presenta una actividad biológica *in vivo* con la que consigue que las

10 células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de

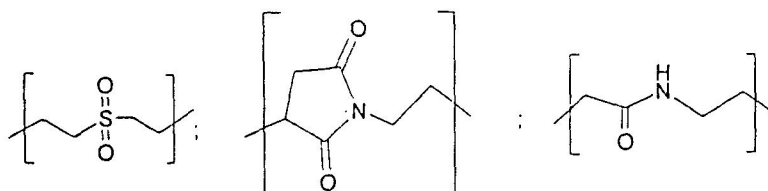
15 glucosilación o por la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxiinferior poli(etilenglicol), cada grupo poli(etilenglicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la fórmula -C(O)-X-S-Y-, con el C(O)

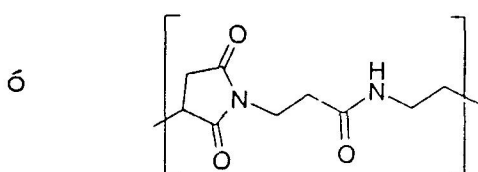
20 del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino,

X es $-(CH_2)_k-$ ó $-(CH_2(O-CH_2-CH_2))_k-$,

k se encuentra entre 1 y 10,

25 Y es





5 el valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons, y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons; y el porcentaje de
10 conjugados en la que n es 1 es al menos del noventa por ciento.

30. La composición que comprende conjugados tal como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos,
15 del noventa por ciento.

31. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 28 ó 29, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y dos por ciento.

32. La composición de la reivindicación 30 en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa y seis por ciento.

33. La composición de la reivindicación 20 ó 32, en donde el porcentaje de conjugados donde n es 1 está comprendido entre el noventa por ciento y el noventa y seis por ciento.

25 34. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35. Un conjugado o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para ser utilizado en la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de enfermedades relacionadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), SIDA y para el tratamiento de pacientes de cáncer que han sido tratados con quimioterapia.

36. Un proceso para la preparación de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, dicho proceso comprende la unión covalente de grupos tiol a una glucoproteína eritropoyetina y el acoplamiento de la glucoproteína eritropoyetina activada resultante con un derivado de poli(etilen glicol) (PEG).

37. Los conjugados y las composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, siempre que se preparen mediante el proceso de la reivindicación 36.

38. Los conjugados y las composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con la anemia en pacientes con fallo renal crónico (CRF), y pacientes con SIDA y cáncer que han sido sometidos a quimioterapia.

FIGURA 1

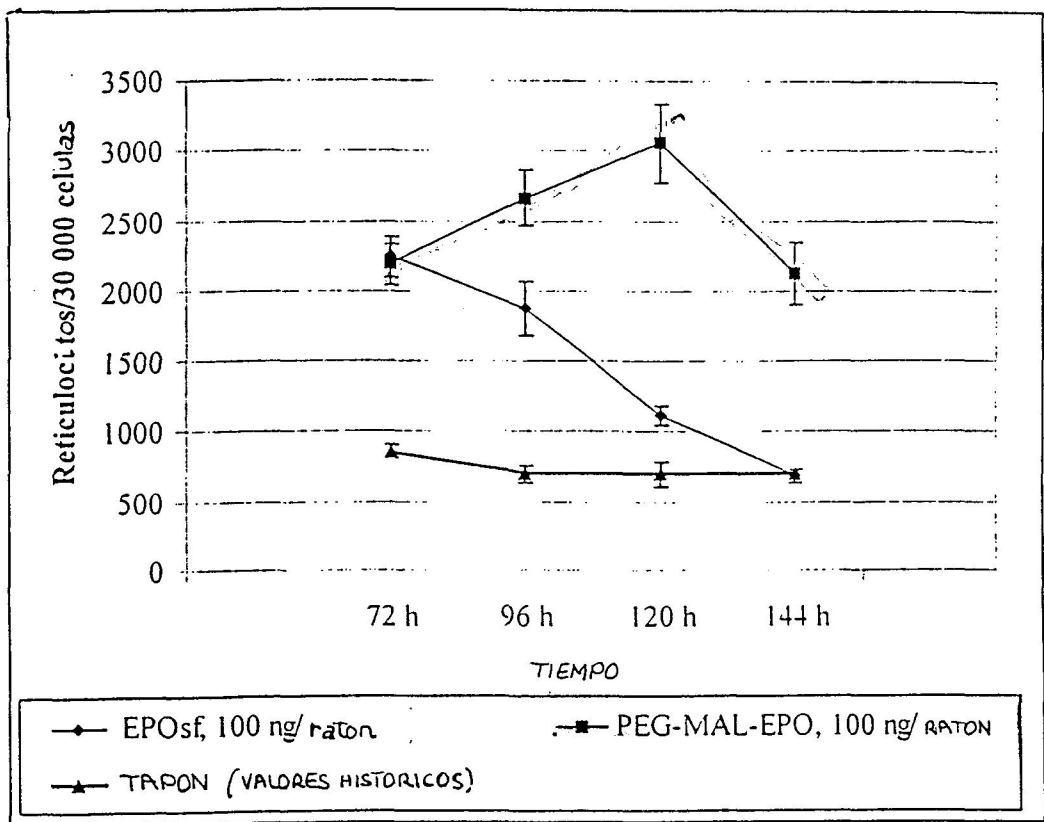
Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

5

FIGURA 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

FIGURA 3



3

NO PUBLICAR

ANTES DE

- 2 ENE. 2001



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

28-06-00

(71) SOLICITANTE: F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.

(30) PRIORIDAD:

60/142.243

(31) No. DE SOLICITUD:

60/147.452 y
60/151.454

(72) INVENTOR/ES: Josef Burg, Bernd Hilger y Hans-
Peter Josel.

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

02-07-99,
05-08-99 y

(33) PAÍS:

30-08-99
US, US Y US

(74) APODERADO: JOSE ANTONIO LLOREDA

(54) TÍTULO:

"DERIVADOS DE ERITROPOYETINA".

(57) RESUMEN:

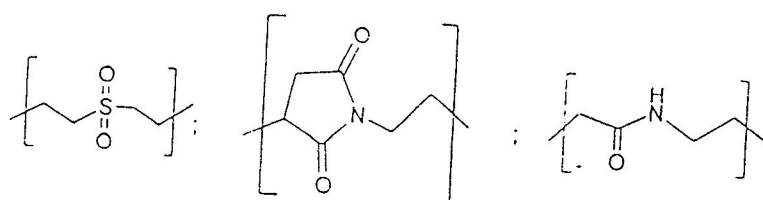
Reivindicación número 1.-

Un conjugado, dicho conjugado comprende una glucoproteína eritropoyetina que presenta al menos un grupo amino libre que presenta una actividad biológica in vivo con la que consigue que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulitos y glóbulos rojos y que se selecciona del grupo de la eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o mediante la nueva disposición de al menos un sitio de glucosilación; dicha glucoproteína se encuentra unida de forma covalente a de uno a tres grupos alcoxi-inferior poli(etilen glicol), cada grupo poli (etilen glicol) se encuentra unido covalentemente a la glucoproteína mediante un conector con la formula $-C(O)-X-S-Y-$, con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino.

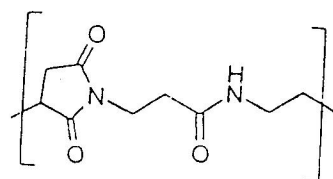
X es $-(CH_2)_k-$ ó $-(CH_2(O-CH_2-CH_2))_k-$,

K se encuentra entre 1 y 10,

Y es



ó



El valor medio del peso molecular de cada porción de poli(etilen glicol) se encuentra entre alrededor de 20 kilodaltons y alrededor de 40 kilodaltons y el peso molecular del conjugado se encuentra entre alrededor de 51 kilodaltons y alrededor de 175 kilodaltons.

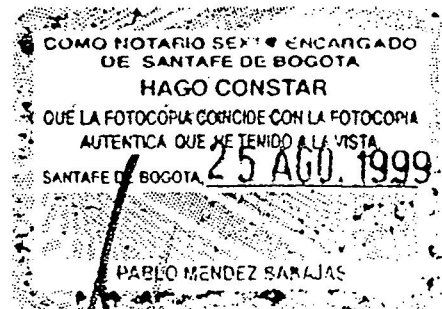
EL SUSCRITO JEFE DEL AREA DE
LEGALIZACIONES DEL MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

CERTIFICA

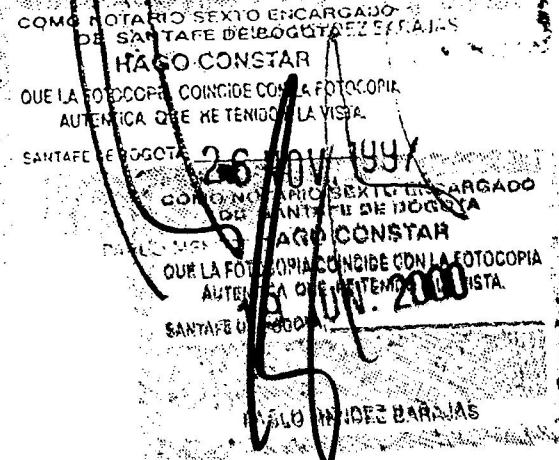
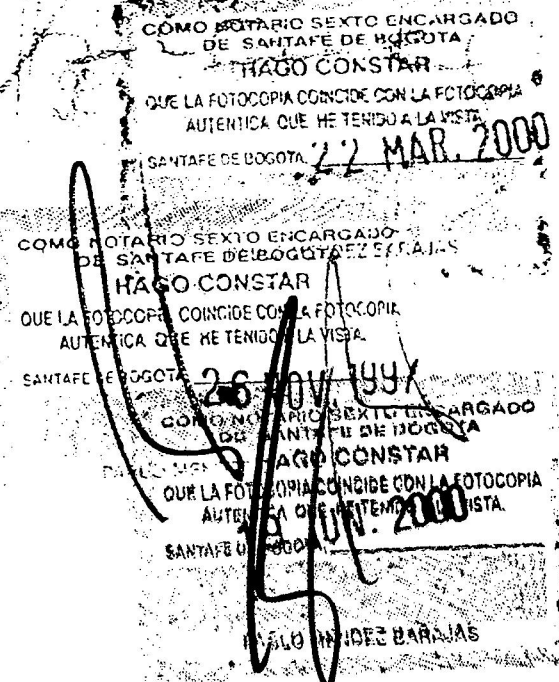
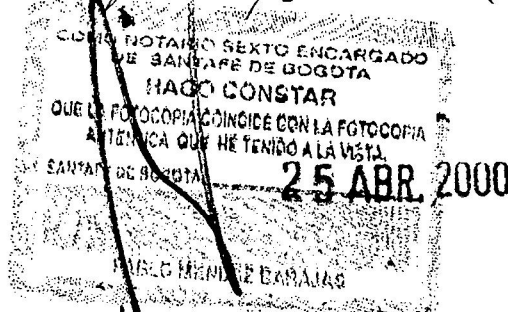
Que revisados los registros que se llevan en la oficina de Legalizaciones aparece la firma del señor **EDUARDO CALADO NOGUERA**, como traductor e intérprete oficial para los Idiomas INGLES- ESPAÑOL, ESPAÑOL- INGLES, según resolución 541 del 27 de febrero de 1976.

La anterior certificación se expide a solicitud del interesado quien se identificó con cédula de ciudadanía 17.177.588 expedida en Bogotá.

Dada en Santa Fe de Bogotá, D.C., a los seis (6) de noviembre de 1997.



Blanca Acosta
BLANCA ACOSTA DE GARCIA
Jefe Area de Legalizaciones (e)



68
66

República de Colombia



Ministerio de Justicia y del Derecho

EL SECRETARIO GENERAL (E) DEL MINISTERIO DE
JUSTICIA Y DEL DERECHO

CERTIFICA:

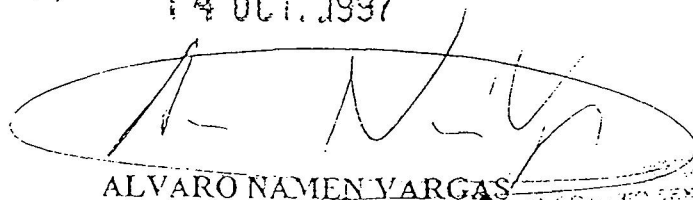
Que por Resolución 541 del 27 de febrero de 1976, le fue expedida licencia para ejercer funciones de Traductor e Intérprete Oficial en los idiomas INGLÉS y ESPAÑOL al señor EDUARDO CALADO NOGUERA, identificado con la cédula de ciudadanía No. 17.177.588 expedida en Bogotá.

Que dicha Resolución se encuentra vigente en la fecha.

Se expide la presente certificación a solicitud del interesado.

Dada en Santa Fe de Bogotá, D.C., a

14 OCT. 1997


ALVARO NAMEN VARGAS

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 25 AGO 1999
PABLO MENDEZ BARRIAS

ICM/mmc

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 25 ABR 2000
PABLO MENDEZ BARRIAS

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 26 NOV 1997
PABLO MENDEZ BARRIAS

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 22 MAR 2000
PABLO MENDEZ BARRIAS

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA 18 JUN 2000
PABLO MENDEZ BARRIAS

Junio 17, 2000
Traducción Oficial No.0278
REF:F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Patente No.60/142,243

F. Hoffmann
Caso-20426

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES

Mayo 02,2000

Por medio del presente documento se certifica que adjunta se encuentra una fiel copia de los registros de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, correspondientes a los documentos para la solicitud tal como se presentaron, con el fin de asignarle una fecha de registro bajo la norma del código 35 USC 111.

Número de Solicitud: 60/142,243

Fecha de Registro: Julio 02, 1999

Autorizado por:

COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES

Firma: T. Wallace

Funcionario Encargado de Certificaciones

Hay sello realizado de la Oficina de Marcas y Patentes de color dorado.

Eduardo Calvo

70
68

CERTIFICACION BAJO EL CODIGO 37

Codigo de Regulaciones federales 1.10

Yo por medio del presente documento certifico que éste ha sido enviado por Correo Postal - "CORREO POSTAL AL DESTINATARIO" de los Estados Unidos el 12 de Julio de 1999, en un sobre rotulado como correo certificado al destinatario", número de registro de envío EL275412765 US dirigido al "Assistant Commissioner of Patents de Washington, DC., 20231.

Nombre del depositante: PAMELA JOHNSTON

Firma: PAMELA JOHNSTON

HOJA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTE

Esta es una petición para registrar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo el código 37 CFR § 1.53 (b)(2):

Número de Caso: 1098P

INVENTORES / SOLICITANTES

NOMBRE: Burg, Josef

RESIDENCIA: Weilheim, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: An der Barenmühle 1, 82262

Weilheim, Alemania

Edwardo Calles

NOMBRE:Hilger, Bernd

RESIDENCIA:Penzberg, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Am Katzenbuckel 21, 82377

Penzberg, Alemania

NOMBRE:Josel, Hans-Peter

RESIDENCIA:Weilheim,Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim,

Alemania

[] Los inventores adicionales se mencionaran en una hoja adjunta a la presente.

TITULO DE LA INVENCION

CONJUGADOS DE ERYTHROPOIETIN

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

Edmundo Calado
"IR" ...
...
...

77
70

George W. Jonhston

Hoffmann-La Roche Inc.

340 Kingsland Street

Nutley, NJ 07110

PARTES DE LA SOLICITUD INCLUIDAS

(Verificar que todas apliquen)

☒	ESPECIFICACIONES	☐ [30]	Número de Páginas
☒	REIVINDICACIONES		No. de Reivindicaciones 43 (7 páginas)
☐	LISTADO DE SECUENCIA	☐	Número de Páginas
☒	DECLARACIÓN	☐ [4]	Número de Páginas (no firmadas)
☒	GRAFICA (S)	☐ [3]	Hojas de Gráficas
☒	Otros		<u>resumen (1 página)</u>

FORMA DE DE PAGO DE HONORARIOS PARA LA SOLICITUD

PROVISIONAL DE ESTA PATENTE (Señalar uno)

☒ El comisionado por la presente se encuentra autorizado a cobrar honorarios de registro y crédito al número de Cuenta Bancaria **08-2525**

Honorarios provisionales para registro = \$150.000

Eduardo Caland
11.11.12
11.11.12

La invencion fué realizada por una agencia del Gobierno de los Estados Unidos o bajo contrato con una agencia del Gobierno de los Estados Unidos.

☒ No

☐ Sí, el nombre de la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos y número de contrato son los siguientes:

Presentado atentamente,

FIRMA:Lewis J. Kreisler

No. de Registro:38522

Telefono: (973) 235-4387

Telefax: (973) 235-2363

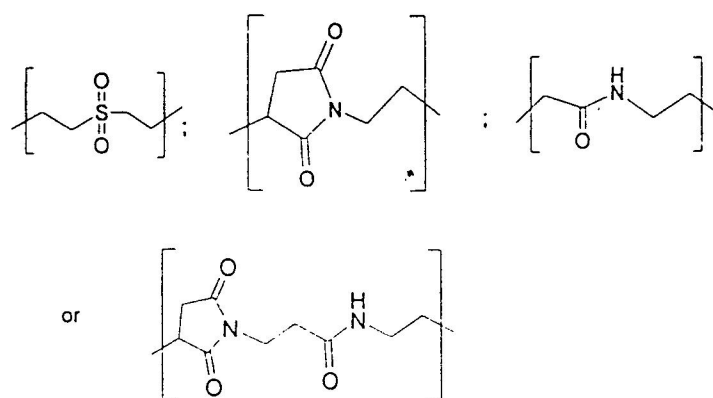
Fecha:Julio 2, 1999

Adriano Calado

REIVINDICACIONES :

1. Un conjugado, dicho conjugado consta de glicoproteína eritropoietin el cual tiene por lo menos un grupo de amino ácidos, el cual tiene una actividad biológica *in vivo* la cual produce en las células en la médula del hueso un incremento en la producción de reticulocitos y célula y glóbulos rojos, seleccionados de un grupo que consiste de eritropoietinas y análogos del mismo los cuales tienen la secuencia primaria de estructura de eritropoietinas humana modificadas mediante la adición desde 1 hasta 6 sitios de glicosilaciones; encontrándose dicha glicoproteína covalentemente enlazada desde uno a tres grupo de bajo alcoxi poli (etileno glicol), cada grupo de poli (etileno glicol) encontrándose covalentemente enlazado a la glicoproteína vía un enlazador de la formula $-C(O)-X-S-Y$ con el $C(O)$ del eslabonamiento el cual forma un enlace de amida con uno de los mencionados grupos de aminos, X es $-(CH_2)_k-$ o $CH_2(O-CH_2-CH_2)-$, k es desde 1 hasta 10, Y es

Edwardo Calado



siendo el promedio molecular de peso de cada parte de poli (etileno glicol) aproximadamente desde 20 kilodaltones hasta alrededor de 40 kilodaltones, y el peso molecular del conjugado es de aproximadamente 51 kilodaltones hasta alrededor de 175 kilodaltones.

2. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina es una proteína eritropoietina humana.

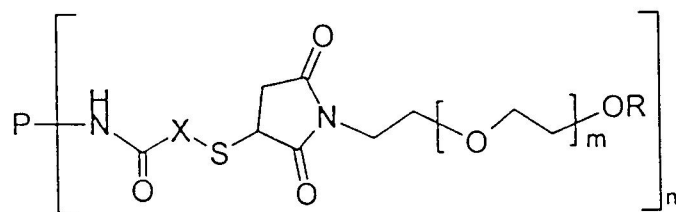
3. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 2, en el cual la glicoproteína eritropoietina tiene una secuencia presentada en la Grafica 1 o la Grafica 2.

4. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual X es $-(CH_2)_k-$.

Eduardo Calado

5. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en el cual k es desde 1 hasta 4.
6. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.
7. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 6, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.
8. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxí coronador de poli (etileno glicol).
9. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.
10. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, de la fórmula:

Eduardo Calvo



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

11. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual X es -CH₂-,

12. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

13. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 12, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

14. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual n es 1.

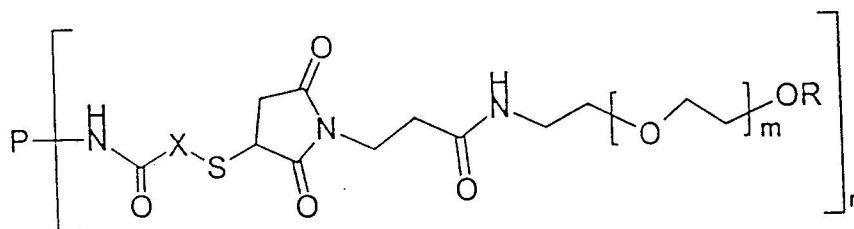
Edwards Colado

76

15. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual R es metilo.

16. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

17. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(\text{CH}_2)_k$ - o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k$ -, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

18. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual X es $-\text{CH}_2-$.

Eduardo Celado

7/7
22

19. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

20. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 19, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

21. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual R es metilo.

22. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

23. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina tiene una estructura primaria de la eritropoietina humana modificada mediante la adición aproximada desde 1 hasta 6 sitios de glicosilación.

24. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína tiene una secuencia seleccionada desde un grupo que consiste de :

Eduardo Calzadilla
REVISADO
REVISADO
REVISADO

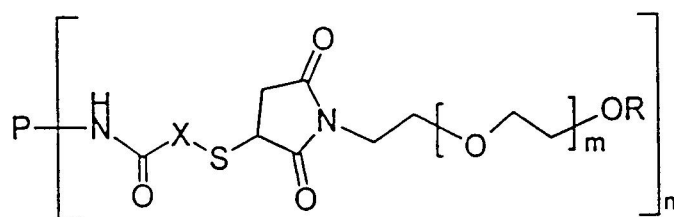
Asn30 Thr32 Gráfica 1;
 Asn51 Thr53 Gráfica 1;
 Asn57 Thr59 Gráfica 1;
 Asn69 Gráfica 1;
 Asn69 Thr71 Gráfica 1;
 Ser68Asn69 Thr71 Gráfica 1;
 Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
 Ser87Asn88 Thr90 Gráfica 1;
 Ser87 Asn88 Gly89 Thr90 Gráfica 1 Gráfica 1;
 Ser87 Asn88 Thr90 Thr92 Gráfica 1;
 Ser87 Asn88 Thr90 Ala162 Gráfica 1;
 Asn69 Thr71 Ser87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
 Asn30 Thr32 Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
 Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;
 Ser87 Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;
 Asn136 Thr138 Gráfica 1;
 Asn138 Thr138 Gráfica 1;
 Asn138 Thr140 Gráfica 1;
 Thr125; y
 Pro124Thr125 Gráfica 1.

Coluando Calado

25. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual X es $-(CH_2)_k$.
26. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual k es desde 1 hasta 4.
27. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.
28. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 27, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.
29. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronador de poli (etileno glicol).
- 30.. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

Eduardo Caralado

31. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

32. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual X es -CH₂-,

33. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

34. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 33, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

35. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual

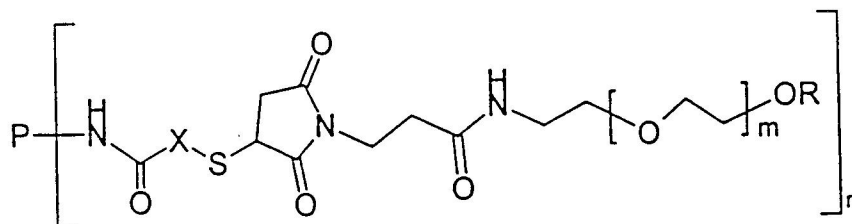
Edwards Calandor

n es 1.

36. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual R es metilo.

37. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

38. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, de acuerdo a la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(\text{CH}_2)_k$ - o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

39. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual X es $-\text{CH}_2-$.

Eduardo Calado

40. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

41. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 40, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

42. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual R es metilo.

43. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

Colinardo Colado

Caso:No1098P

DECLARACION Y PODER
PARA LA SOLICITUD DE PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

Yo en mi calidad de abajo mencionado inventor, por la presente
declaro:

Mi residencia, dirección de Oficina Postal y ciudadanía son mencionados a
continuación como también mi nombre.

Yo creo ser el único y primer inventor (si solo se encuentra un nombre en
la lista) o original, primero y co-inventor del tópico en cuestión, el cual se
reivindica pidiendo la solicitud de patente de invención con el título:

TITULO DE LA INVENCION (280 Caracteres máximo)
CONJUGADOS DE ERITHROPOIETINA

cuya especificaciones:

(Indique uno)

[x] se encuentra adjunto.

[] Fue registrado en _____ como

No Serial de la Solicitud _____

Eduardo Calado

y fue revisado en _____
(si aplica)

Yo por medio del presente documento declaro que he revisado y entiendo el contenido de las especificaciones anteriormente mencionadas, incluyendo las reivindicaciones.

Yo tengo conocimiento sobre mi obligación de revelar toda información que sea parte del material patentable tal como lo define el Artículo 37 C.F.R. §1.56.

Yo por la presente reivindico beneficios de prioridad bajo el Título 35, del Código de los Estados Unidos, Sección §119 (a) -(d) de cualquiera de la solicitud(es) extranjera para patente (s) o certificado como inventor o § 365 (a) de cualquier Solicitud para Patente Internacional (PCT), para la cual se ha nombrado por lo menos a un país además de los Estados Unidos, como es anteriormente mencionado e identificado, Indicando con una indicación en las cajillas , de cualquier solicitud extranjera para Patente certificado como inventor, o solicitud Internacional PCT con una fecha de registro anterior de aquella solicitud que aparece en la cual se reivindica prioridad.

Solicitudes extranjeras con una fecha de registro anterior (es)

Prioridades Reivindicadas

[] []

Eduardo Calus

SA
35

(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No

Yo por medio de la presente reivindico los beneficios bajo 35 U.S.C. § 119 (e) sobre solicitudes anteriores de los Estados Unidos mencionadas a continuación:

_____	_____	_____	_____
(No Solicitud)	(Fecha de Registro)	(No Solicitud)	(Fecha de registro)

Yo por medio de la presente reivindico beneficios bajo el Código 35 USC § 120 de solicitud de Patente registrada en los Estados Unidos, o §365(c) de cualquier solicitud Internacional de patentes PCT en la manera requeridas tal como se menciona anteriormente y respecto al tópico en cuestión de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud la cual no se haya revelada con anterioridad en solicitudes anteriores en los Estados Unidos de acuerdo a lo establecido por el primer párrafo de la norma del Código 35CFR. § 112, tengo conocimiento de mi obligación de revelar toda información que se considere parte del material patentable a la Oficina de Marcas y Patentes tal como lo define la norma del Código 37 C.F.R. §1.56 el cual se hizo efectiva entre las fechas de registro de la solicitud anterior y la fecha de registro Internacional PCT de esta solicitud.

Edwards Palacios

 (No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (estatus)(patentado,pendiente,
 abandonado)

 (No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (Estatus)(patentado,pendiente,
 abandonado)

Yo, por la presente afirmo que toda declaración presentada es de mi
 entero conocimiento, fiel y verdadera y tengo presente que toda
 falsa declaración es castigada mediante una multa o el
 encarcelamiento, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del
 Código de los Estados Unidos, y que cualquier declaración puede
 comprometer la validez de esta solicitud o de cualquier patente
 expedida inmediatamente después.

PODER :

Como Inventor, yo por la presente nombro al (los) siguiente (s)
 abogados y /o representante (s) para procesar esta solicitud y llevar a
 cabo toda transacción de negocios en la Oficina de Marcas y Patentes

Edwards Calado

89
37

relacionadas con la presente. (*listado de nombres y números de registro*)

No. de Registro

GEORGE W. JOHNSTON	Reg No.	28090
WILLIAM H. EPSTEIN	Reg No.	20008
LEWIS J. KREISLER	Reg No.	38522
BRIANA C. BUCHHOLZ	Reg	399123
DENNIS P. TRAMALONI	Reg No.	28542
PATRICIA S. ROCHA-TRAMALONI	Reg No.	31054
JOHN P. PARISE	Reg No.	34403

ENVIAR LA CORRESPONDENCIA A:

George W, Johnston, Esq.

HOFFMANN LA ROCHE INC.,

350 KINGSLAND STREET

NUTLEY, NEW JERSEY 07110-1199

llamadas telefónicas: Lewis J. Kreisler (973) 253-4387

Nombre: JOSEF BURG

Residencia: Weilheim, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Edwards Calado

88

Oficina Postal An der Barenmühle 1, 82362 Weilheim, Alemania

Nombre: BERND HILGER

Residencia: Penzberg, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal: Am Kattzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Alemania

Nombre: Hans Peter Josel

Residencia: Weilheim, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal: Pratenweg 7, 82362 Weilheim, Alemania

De acuerdo al Título 37, del Código de Regulaciones Federales, § 1.56, tengo conocimiento sobre mi obligación de proteger y revelar información de material patentable el cual especifica que cada persona asociada con el registro y la continuación de la solicitud de patente tiene un deber de cumplimiento y buena fe en llevar a cabo todas las negociaciones con la Oficina de Patentes, la cual se debe proteger y revelar toda información de material patentable tal como lo define ésta sección. El deber de revelar toda información respecto a cada reivindicación pendiente hasta que la reivindicación sea anulada, reservada o la solicitud sea abandonada.

Edwards Calado

Bajo esta sección la información es material patentable hasta cuando no es cumulativo sobre información que aparezca en los registros o sean parte de los registros en la solicitud, y

- (1) Reconoce que por si sola o conjuntamente con otra información o pruebas suficientes de la patentabilidad de una reivindicación; o
- (2) Si refuta o es inconsistente con la posición de un solicitante:
 - (i) Oponerse a un argumento de no patentabilidad propuesto por la Oficina, o
 - (ii) Afirmación de un argumento sobre patentabilidad

Eduardo Calado

97
90

GRAFICA 1

Ala Prp Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Gly Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Eduardo Calado R

15
16
R. 1

91

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp
Thr Phe Arg Lys140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp165

Eduardo Calado

GRAFICA 2

Ala Prp Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Gly Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Edwards Calado

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp

Thr Phe Arg Lys140

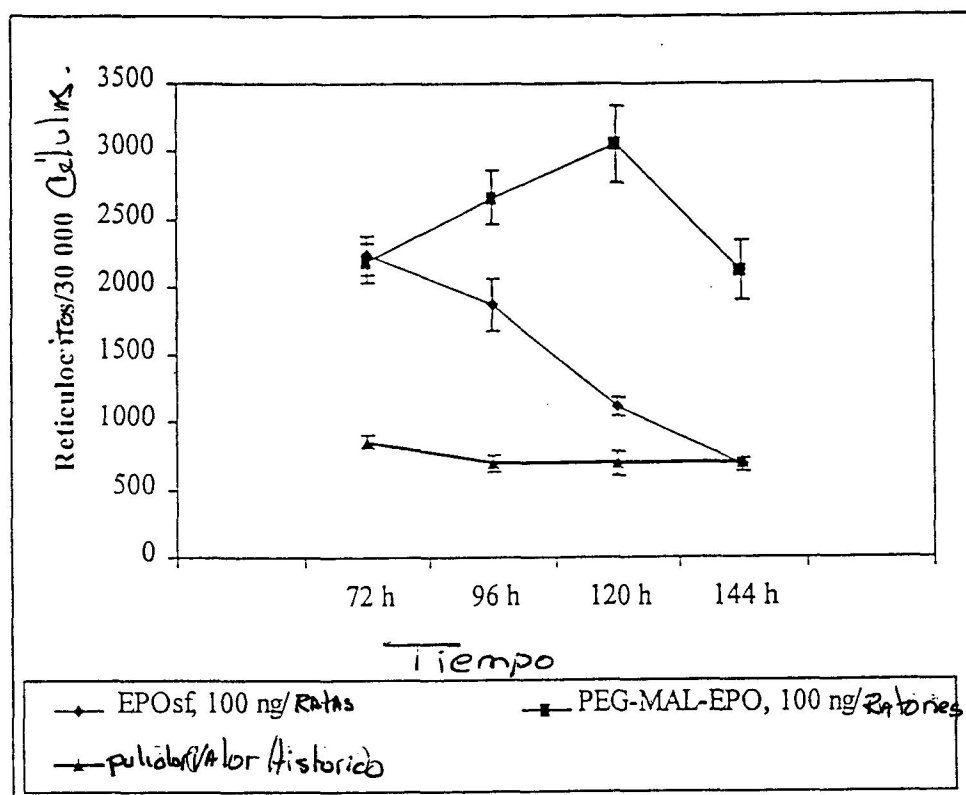
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr

Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp166

Edoardo Calado

GRAFICA 3



Edwardo Caladash

97
95

PA 235522

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

May 02, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/142,243

FILING DATE: July 02, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

96

PATENT APPLICATION SERIAL NO. _____

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
PATENT AND TRADEMARK OFFICE
FEE RECORD SHEET

07/12/1999 TTRAN1 00000039 60142243

01 FC:114 150.00 CH

PTO-1556
(5/87)

*U.S. GPO: 1998-433-214/80404

99
A/PROV 92

07/02/99
10648 U.S. PTO

I hereby certify that this New Application Transmittal and the documents referred to as enclosed therein are being deposited with the United States Postal Service on this date July 2, 1999 in an envelope as "Express Mail Post Office to Addressee" Mailing Label Number EL275412765US addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Pamela Johnston

(Print Name)

Pamela Johnston

(Signature)

10648 U.S. PTO

60/142243

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53(b)(2).

Docket No. 1098P

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Name: Burg, Josef
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany

Name: Hilger, Bernd
Residence: Penzberg, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Name: Josel, Hans-Peter
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

☐ Additional inventors are being named on sheets attached hereto

TITLE OF THE INVENTION

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

CORRESPONDENCE ADDRESS

George W. Johnston
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

☒ Specification No. of Pages 30
☒ Claims No. of Claim 43 (7 pages)
☐ Sequence Listing No. of Pages

☒ Declaration No. of Pages 4 (unsigned)
☒ Drawings Sheets of Drawings 3
☒ Other Abstract (1 page)

DEPOSIT ACCOUNT

NO. 08*2525

OUR ORDER NO. 2619.

100
48

METHOD OF PAYMENT

[X] The Commissioner is hereby authorized to
charge any fees or credit any overpayment
to Deposit Account Number: 08-2525

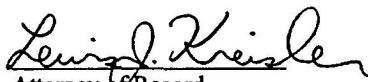
Provisional
Filing Fee
Amount \$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

[X] No

[] Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,


Attorney of Record

Lewis J. Kreisler

(Reg. No. 38522)

Telephone: (973) 235-4387

Telefax: (973) 235-2363

Date: July 2, 1999

85277

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

5

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

15

20

25

Erythropoiesis is the production of red blood cells which occurs to offset cell destruction. Erythropoiesis is a controlled physiological mechanism that enables sufficient red blood cells to be available for proper tissue oxygenation. Naturally occurring human erythropoietin (hEPO) is a glycoprotein containing 165 amino acids that is produced in the kidney and is the humoral plasma factor which stimulates red blood cell production (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W and Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). Human EPO stimulates the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Human EPO exerts its biological activity by binding to receptors on erythroid precursors (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419). Naturally occurring human erythropoietin is an acidic glycoprotein present in low concentrations in plasma to stimulate replacement of red blood cells which are lost through aging.

Erythropoietin has been manufactured biosynthetically using recombinant DNA technology (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) and is the product of a cloned human EPO gene inserted into and expressed in the ovarian tissue cells of the chinese hamster (CHO cells). Naturally occurring human EPO is first translated to a 166 aa containing polypeptide chain with arginine 166. In a postranslational modification arginine 166 is cleaved by a carboxypeptidase. The primary structure of human EPO (165 aa) is illustrated in Figure 1. The primary structure of human EPO (166 aa) is illustrated in Figure 2. There are two disulfide bridges between Cys⁷-Cys¹⁶¹ and Cys²⁹-Cys³³. The

molecular weight of the polypeptide chain of human EPO without the sugar moieties is 18,236 Da. In the intact EPO molecule, approximately 40% of the molecular weight is accounted for by the carbohydrate groups (Sasaki,H, Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

5

Because erythropoietin is essential in red blood cell formation, the hormone is useful in the treatment of blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Clinically, EPO is used in the treatment of for example anemia in chronic renal failure patients (CRF) (Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) and in AIDS and cancer patients undergoing chemotherapy (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker;1990: p. 301-324). However, the bioavailability of currently available protein therapeutics such as EPO is limited by their short plasma half-life and susceptibility to protease degradation. These shortcomings prevent them from attaining maximum clinical potency.

10

15

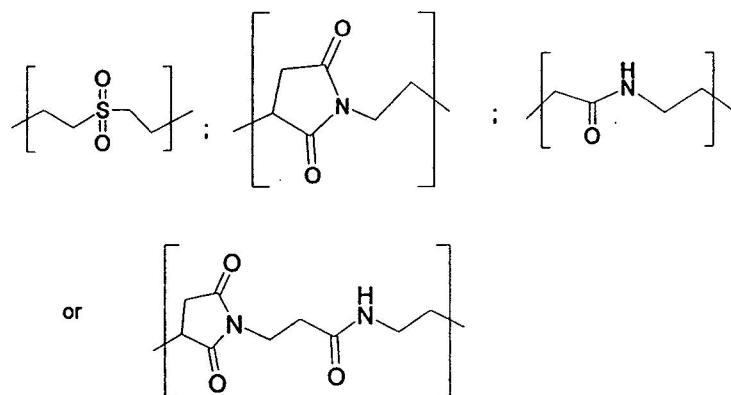
20

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention is a new class of PEG derivatives of EPO. The physiologically active PEG-EPO conjugates of this invention comprise an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-

25

alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein *via* a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the C(O) of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is



the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

Compared to unmodified EPO (i.e., EPO without a PEG attached) and conventional PEG-EPO conjugates, the present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time, decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. The conjugates of this invention have the same uses as EPO. In particular, the conjugates of this invention are useful to treat patients by stimulating the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow in the same way EPO is used to treat patients.

The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a human.

The present invention also includes a method for preparing the erythropoietin glycoprotein products which comprises covalently reacting an ϵ -amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein with a bi-functional reagent to form an intermediate with an amide linkage. The bi-functional reagent contains a reactive group and a protected thiol group. The amide-linked intermediate is then covalently reacted with an activated polyethylene glycol derivative to form the erythropoietin glycoprotein product of the present invention.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Figure 1: Primary structure of human EPO (165 amino acids).
- Figure 2: Primary structure of human EPO (166 amino acids)
- Figure 3: In vivo activity of pegylated EPO determined by normocythaemic mouse assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

The following terms shall have the definitions set out below:

The term "human erythropoietin protein", "human erythropoietin" or "human EPO" refers to the protein of Figure 1 or 2 whose biological properties relate to the stimulation of red blood cell production and the stimulation of the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Specifically, an EPO protein is defined to include any protein or polypeptide with the same biological activity and having an amino acid sequence which is substantially homologous to the amino acid sequence of Figure 1 or 2. As

used herein the term EPO protein includes such proteins modified deliberately, as for example, by site directed mutagenesis or accidentally through mutations.

5 The term "substantially homologous" means that a particular subject sequence, for example, a mutant sequence, varies from a reference sequence by one or more substitutions, deletions, or additions, the net effect of which does not result in an adverse functional dissimilarity between the reference and subject sequences. For purposes of the present invention, sequences having greater than 95 percent homology, equivalent biological properties, and equivalent expression characteristics are considered substantially
10 homologous. For purposes of determining homology, truncation of the mature sequence should be disregarded. Sequences having lesser degrees of homology, comparable bioactivity, and equivalent expression characteristics are considered substantial equivalents.

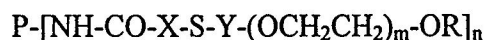
15 The term "fragment" of the EPO protein means any protein or polypeptide having the amino acid sequence of a portion or fragment of an EPO protein, and which has the biological activity of the EPO. Fragments include proteins or polypeptides produced by proteolytic degradation of the EPO protein or produced by chemical synthesis by methods routine in the art. An EPO protein or fragment thereof is biologically active when
20 administration of the protein or fragment to man results in the stimulation of red blood cell production and the stimulation of the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Determining such biological activity of the EPO protein can be carried out by conventional, well known tests utilized for such purposes on one or more species of mammals. An appropriate test which can be utilized to demonstrate such biological activity is described herein.

25

The term "therapeutically effective amount" is that amount of erythropoietin glycoprotein product necessary for the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells. The exact amount of

erythropoietin glycoprotein product is a matter of preference subject to such factors as the exact type of condition being treated, the condition of the patient being treated, as well as the other ingredients in the composition. The pharmaceutical compositions containing the erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Average therapeutically effective amounts of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

The present invention is directed to erythropoietin glycoprotein products having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells represented by Formula 1:



In Formula 1, P is an erythropoietin glycoprotein less the amino group or amino groups which form an amide linkage with X. As set out in detail below, the preparation and purification of EPO are well known in the art. By EPO is meant the natural or recombinant protein, preferably human, as obtained from any conventional source such as tissues, protein synthesis, cell culture with natural or recombinant cells. Any protein having the activity of EPO, such as muteins or otherwise modified proteins, is encompassed. Recombinant EPO may be prepared via expression in CHO-, BHK- or HeLa cell lines, by recombinant DNA technology or by endogenous gene activation. The preferred EPO species for the preparation of erythropoietin glycoprotein products are human EPO species. More preferably, the EPO species is the human EPO having the amino acid sequence set out in Figure 1.

The human erythropoietin protein may also be modified to at least one additional site for glycosylation such as, but not limited to, the amino acid sequences as set out below. The

notation below means that the sequence set forth in Figure 1 has been modified by substituting the native amino acid at the superscripted numbered position shown for the amino acid indicated to the left of the superscripted number.

- 5 Asn³⁰Thr³² Figure 1;
Asn⁵¹Thr⁵³ Figure 1;
Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figure 1;
Asn⁶⁹ Figure 1;
Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;
10 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;
Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figure 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figure 1;
15 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figure 1;
Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;
Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;
Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;
Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;
20 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figure 1;
Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figure 1;
Thr¹²⁵ Figure 1; and
Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

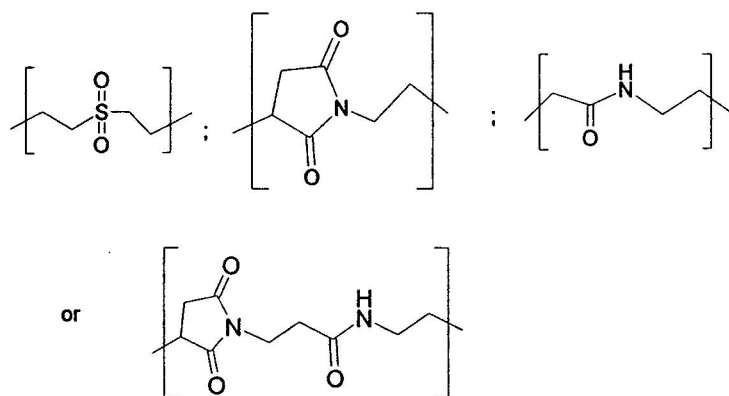
- 25 Erythropoietin analogs with additional glycosylation sites are disclosed in European Patent Publication No. 640 619, to Elliot, published March 1, 1995.

In Formula 1, R may be any lower alkyl, by which is meant a linear or branched alkyl group having from one to six carbon atoms such as methyl, ethyl, isopropyl, etc. A preferred alkyl is methyl.

5 In Formula 1, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10. Preferably, k is from 1 to about 4, more preferably, k is 1 or 2. Most preferably, X is $-(CH_2)-$

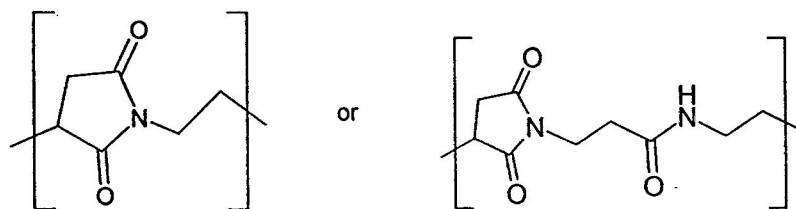
In Formula 1, Y is

10



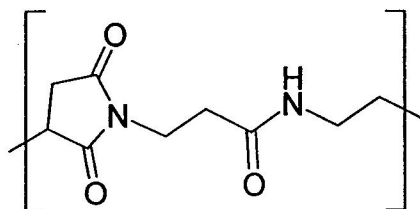
Preferably Y is

15



20

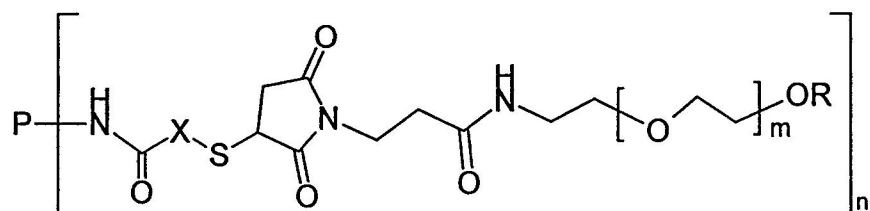
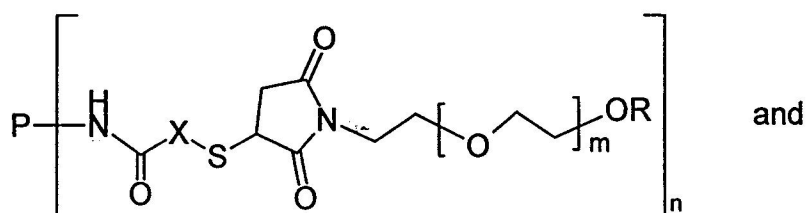
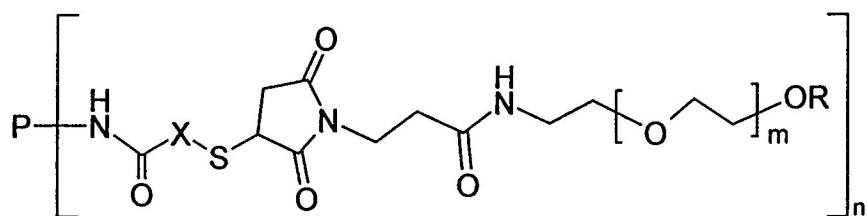
Most preferably, Y is



5 In Formula 1, the number m is selected such that the resulting conjugate of Formula 1 has a physiological activity comparable to unmodified EPO, which activity may represent the same as, more than, or a fraction of the corresponding activity of unmodified EPO. m represents the number of ethylene oxide residues in the PEG unit. A single PEG subunit of $-(OCH_2CH_2)-$ has a molecular weight of about 44 daltons. Thus, the molecular weight of the conjugate (excluding the molecular weight of the EPO) depends on the number m. A molecular weight of "about" a certain number means that it is within a reasonable range of that number as determined by conventional analytical techniques. m is an integer ranging from about 450 to about 900 (corresponding to a molecular weight of from 20 to 40 kDa), preferably m is from about 550 to about 800 (about 24 to 35 kDa), and most preferably m is from about 650 to about 700 (about 29 to about 31 kDa).

20 In Formula 1, the number n is the number of ϵ -amino groups of a lysine amino acid in an erythropoietin protein covalently bound to a PEG unit via an amide linkage. A conjugate of this invention may have one, two, or three PEG units per molecule of EPO. n is an integer ranging from 1 to 3, preferably n is 1 or 2, and more preferably n is 1.

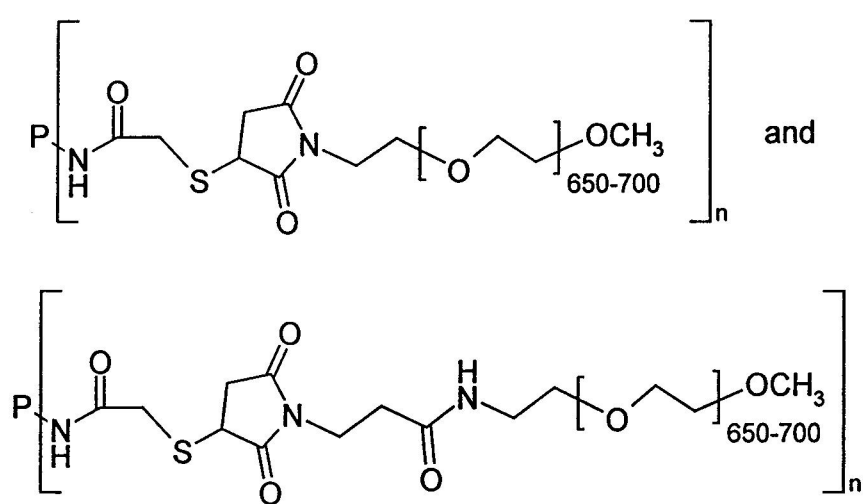
Preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:



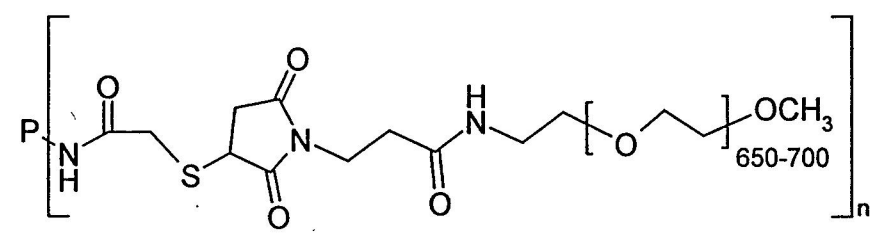
Most preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:

5

Other preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:



More preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:



5

In another embodiment, the invention is directed to a method for the treatment of anemia in a human which comprises administering to a human a therapeutically effective amount of an erythropoietin glycoprotein product represented by Formula 1.

10

In still another embodiment, the invention is directed to a method for preparing an erythropoietin glycoprotein product, having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells, which comprises the steps of:

(a) covalently reacting an ϵ -amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein represented by the formula, $P-[NH_2]_n$, with a bi-functional reagent represented by the formula, $Z-CO-X-S-Q$, to form an intermediate with an amide linkage represented by the formula:

5

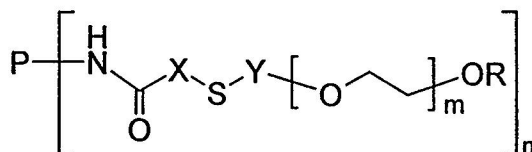


10

wherein P is an erythropoietin protein less the amino group which forms an amide linkage; n is an integer ranging from 1 to 3; Z is a reactive group, e.g. a carboxylic-NHS ester; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10; and Q is a protecting group, like alkanoyl, e.g. acetyl.

15

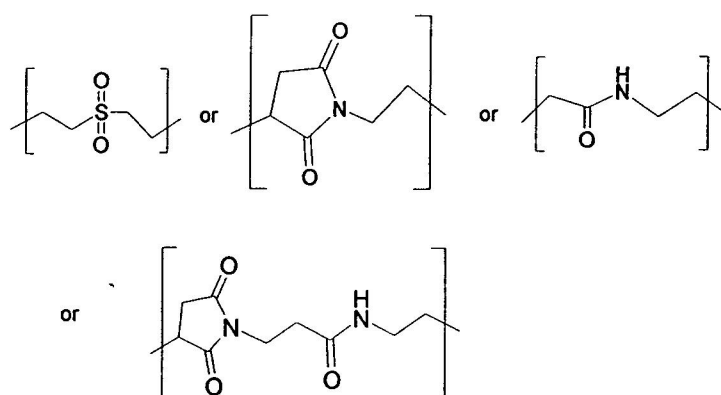
(b) covalently reacting the intermediate with an amide linkage from step (a) with an activated polyethylene glycol derivative represented by the formula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, to form an erythropoietin glycoprotein product represented by the formula:



20

wherein W is a sulfhydryl reactive form of Y; m is an integer ranging from about 450 to about 900; R is lower alkyl; and Y is

47
111



In this embodiment, the bi-functional reagent is preferably N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate or N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, Z is preferably N-hydroxy-succinimide, and the activated polyethylene glycol derivative W-[OCH₂CH₂]_m-OR is preferably selected from the group consisting of iodo-acetyl-methoxy-PEG, methoxy-PEG-vinylsulfone, and methoxy-PEG-maleimide.

Methods for Expressing EPO Proteins

Erythropoietin (EPO) is a human glycoprotein which stimulates the formation of erythrocytes. Its preparation and therapeutic application are described in detail for example in U.S. Patent Nos. 5,547,933 and 5,621,080, EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 and EP-B 0 411 678 as well as Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, an Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. Erythropoietin for therapeutic may be produced by recombinant means (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 and Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224).

112

Methods for the expression and preparation of erythropoietin in serum free medium are described for example in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, and in European Patent Publication No. 513 738, to Koch published 12 June 1992.

5 **Methods for Purifying Human EPO Protein**

10 In addition to the references mentioned above, it is known that a serum-free fermentation of recombinant CHO cells which contain an EPO gene can be carried out. Such methods are described for example in EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 and in a general form by Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. and Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

15 In EP-A 0 267 678 an ion exchange chromatography on S-Sepharose, a preparative reverse phase HPLC on a C₈ column and a gel filtration chromatography are described for the purification of EPO produced in serum-free culture after dialysis. In this connection the gel filtration chromatography step can be replaced by ion exchange chromatography on S-Sepharose fast flow. It is also proposed that a dye chromatography on a Blue Trisacryl column be carried out before the ion exchange chromatography.

20 A process for the purification of recombinant EPO is described by Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359. In this process EPO is treated however with a solution of Tween[®] 20, phenylmethylsulfonyl fluoride, ethylmaleimide, pepstatin A, copper sulfate and oxamic acid prior to the purification steps.

25 Multiple references like WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, discloses a process for preparing erythropoietin in a serum free fermentation process (EPOsf). One

method to manufacture EPO as starting material for the pegylation is explained exemplary in the following.

5 **Biological Assay for Determining Specific Activity of EPO and EPO Conjugates**

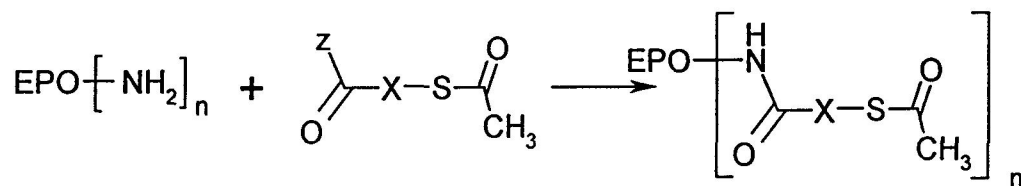
The specific activity of EPO or EPO conjugates in accordance with this invention can be determined by various assays known in the art. The biological activity of the purified EPO proteins of this invention are such that administration of the EPO protein by injection to
10 human patients results in bone marrow cells increasing production of reticulocytes and red blood cells compared to non-injected or control groups of subjects. The biological activity of the EPO proteins, or fragments thereof, obtained and purified in accordance with this invention can be tested by methods according to Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

15 Another biological assay for determining the activity of EPO protein, the normocythaemic mouse assay, is described in Example 4.

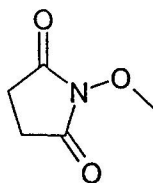
Processes for the Preparation of Pegylated EPO

20 Processes for the preparation of erythropoietin glycoprotein products represented by Formula 1 comprise the covalent linking of thiol groups to EPO ("activation") and coupling the resulting activated EPO with a poly(ethylene glycol) (PEG) derivative. The first step for the preparation of pegylated EPO according to the present invention comprises covalent
25 linking of thiol groups via NH_2 -groups of EPO. This activation of EPO is performed with bi-functional reagents which carry a protected thiol group and an additional reactive group, such as active esters (e.g., a succinimidylester), anhydrides, esters of sulphonic acids, halogenides of carboxylic acids and sulphonic acids, respectively. The thiol group is protected by groups known in the art, e.g., acetyl groups. These bi-functional reagents are able to react with the

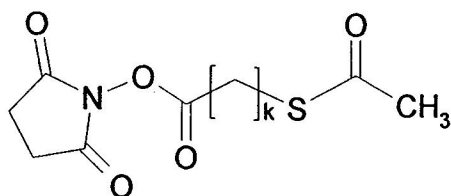
ξ -amino groups of the lysine amino acids by forming an amide linkage. The first step of the reaction is set out below:



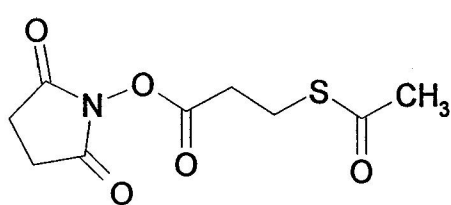
EPO, n and X are as defined above and Z is a reactive group known in the art, e.g. a N-hydroxy-succinimide (NHS) substituent of the formula



In a preferred embodiment the activation of the ϵ -amino lysine groups is performed by reaction with bi-functional reagents having a succinimidyl moiety. The bi-functional reagents may carry different spacer species, e.g. $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_k-$ moieties, wherein k is from 1 to about 10, preferably from 1 to about 4, and more preferably 1 or 2, and most preferably 1. Examples of these reagents are N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate (SATP) and N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA)

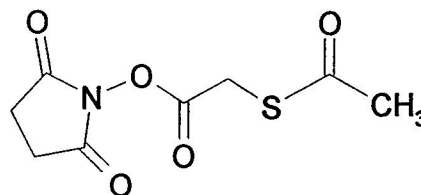


Acetylthioalkyl-carboxylic-NHS-ester, like

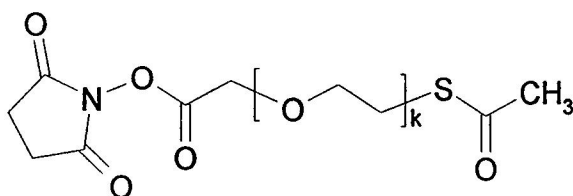


SATP

or



SATA



2-(Acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-ester

with k as defined above.

5

The preparation of the bi-functional reagents is known in the art. Precursors of 2-(acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-esters are described in DE-3924705, while the derivatization to the acetylthio compound is described by March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. SATA is commercially available (Molecular Probes, Eugene, OR, USA and Pierce, Rockford, IL).

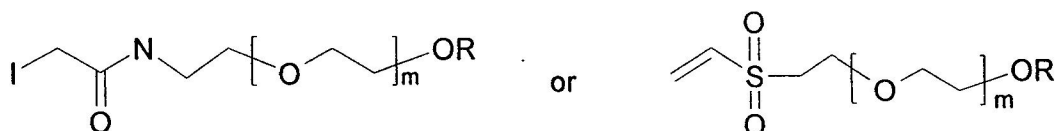
10

The number of thiol groups to be added to an EPO molecule can be selected by adjusting the reaction parameters, i.e., the protein (EPO) concentration and the protein/bi-functional reagent ratio. Preferably, the EPO is activated by covalently linking from 1 to 5 thiol groups per EPO molecule, more preferably from 1.5 to 3 thiol groups per EPO molecule. These ranges refer to the statistical distribution of the thiol group over the EPO protein population.

The reaction is carried out, for example, in an aqueous buffer solution, pH 6.5–8.0, e.g., in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The bi-functional reagent may be added in DMSO. After completion of the reaction, preferably after 30 minutes, the reaction is stopped by addition of lysine. Excess bifunctional reagent may be separated by methods known in the art, e.g., by dialysis or column filtration. The average number of thiol groups added to EPO can be determined by photometric methods described in, for example, Grasetti, D.R. and Murray, J.F. in *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41 – 49 (1967).

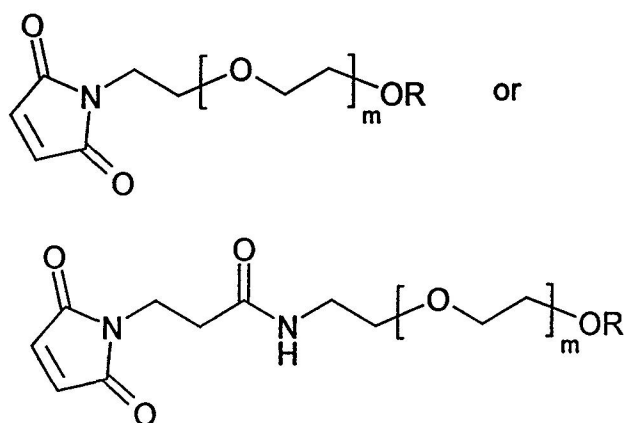
The above reaction is followed by covalent coupling of an activated polyethylene glycol (PEG) derivative. Suitable PEG derivatives are activated PEG molecules with an average molecular weight of from about 20 to about 40 kDa, more preferably from about 24 to about 35 kDa, and most preferably about 30 kDa.

Activated PEG derivatives are known in the art and are described in, for example, Morpurgo, M. et al. *J. Bioconj. Chem.* (1996) 7, page 363 ff for PEG-vinylsulfone. Linear chain and branched chain PEG species are suitable for the preparation of the compounds of Formula 1. Examples of reactive PEG reagents are iodo-acetyl-methoxy-PEG and methoxy-PEG-vinylsulfone:



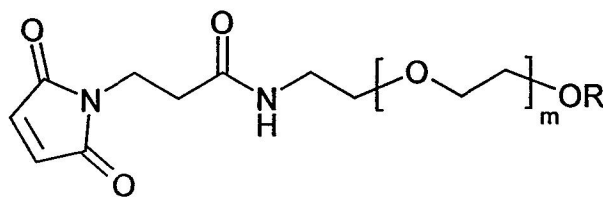
The use of these iodo-activated substances is known in the art and described e.g. by Hermanson, G. T. in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148.

Most preferably, the PEG species are activated by maleimide using (alkoxy-PEG-maleimide), such as methoxy-PEG-maleimide (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.). The structure of alkoxy-PEG-maleimide is as follows:



with R and m are as defined above.

The most preferred derivative is



The coupling reaction with alkoxy-PEG-maleimide takes place after *in situ* cleavage of the thiol protecting group in an aqueous buffer solution, e.g. 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2. The cleavage of the protecting group may be performed,

for example, with hydroxylamine in DMSO at 25°C, pH 6.2 for about 90 minutes. For the PEG modification the molar ratio of activated EPO/alkoxy-PEG-maleimide should be from about 1:3 to about 1:6, and preferably 1:4. The reaction may be stopped by addition of cysteine and reaction of the remaining thiol (-SH) groups with N-methylmaleimide or other appropriate compounds capable of forming disulfide bonds. Because of the reaction of any remaining active thiol groups with a protecting group such as N-methylmaleimide or other suitable protecting group, the EPO glycoproteins in the conjugates of this invention may contain such protecting groups. Generally the procedure described herein will produce a mixture of molecules having varying numbers of thiols protected by different numbers of the protecting group, depending on the number of activated thiol groups on the glycoprotein that were not conjugated to PEG-maleimide.

Whereas N-methylmaleimide forms the same type of covalent bond when used to block the remaining thiol-groups on the pegylated protein, disulfide compounds will lead in an intermolecular sulfide/disulfide exchange reaction to a disulfide bridged coupling of the blocking reagent. Preferred blocking reagents for that type of blocking reaction are oxidized glutathione (GSSG), cysteine and cystamine. Whereas with cysteine no additional net charge is introduced into the pegylated protein, the use of the blocking reagents GSSG or cystamine results in an additional negative or positive charge.

The further purification of the compounds of Formula 1, including the separation of mono-, di- and tri-pegylated EPO species, may be done by methods known in the art, e.g., column chromatography.

Pharmaceutical Compositions

5 The erythropoietin glycoprotein products prepared in accordance with this invention may be prepared in pharmaceutical compositions suitable for injection with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle by methods known in the art.

Treating Blood Disorders Characterized by Low or Defective Red Blood Cell Production

10 Administration of the erythropoietin glycoprotein products of the present invention results in red blood cell formation in humans. Therefore, administration of the erythropoietin glycoprotein products replenishes this EPO protein which is important in the production of red blood cells. The pharmaceutical compositions containing the erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a
15 human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production, either alone or as part condition or disease. The pharmaceutical compositions may be administered by injection such as by subcutaneous or intravenous injection. Average quantities of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

20 Throughout this application, various publications have been referenced. The disclosures in these publications are incorporated herein by reference in order to describe more fully the state of the art.

25 The present invention is further illustrated by the following examples which are presented for purposes of demonstrating, but not limiting, the preparation of the compounds and compositions of this invention.

127
120

EXAMPLE 1

Fermentation And Purification Of Human EPO

5 a) Inoculum Preparation and Fermentation

One vial of the Working Cell Bank, originating from an EPO-producing CHO cell line (ATCC CRL8695, disclosed in EP 411 678 (Genetics Institute) can be used) is taken from the gas phase of the liquid nitrogen storage tank. The cells are transferred into glass spinner flasks and cultivated in a hydrogen carbonate-buffered medium in a humidified CO₂ incubator. Typical serum free media used for the inoculum preparation and fermentation are disclosed in European Patent Application 513 738, to Koch published 12 June 1992, or WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, for example contain as medium DMEM/F12 (e.g. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, order No. 57-736) and additionally sodium hydrogencarbonate, L+glutamine, D+glucose, recombinant insulin, sodium selenite, diaminobutane, hydrocortisone, iron(II) sulfate, asparagine, aspartic acid, serine and a stabilizer for mammalian cells such as e.g. polyvinyl alcohol, methyl cellulose, polydextran, polyethylene glycol, Pluronic F68, plasma expander polygelin (HEMACCEL[®]) or polyvinyl pyrrolidone (WO 96/35718).

20 The cultures are microscopically checked for the absence of contaminating microorganisms, and the cell densities are determined. These tests are performed at each splitting step.

25 After the initial growth period, the cell culture is diluted with fresh medium to the starting cell density and undergoes another growth cycle. This procedure is repeated until a culture volume of approximately 2 l per glass spinner flask has been obtained. After approx. 12 doublings 1 to 5 liter of this culture is available which then is used as inoculum for the 10 l inoculum fermenter.

12B
121

After 3 - 5 days, the culture in the 10 l fermenter can be used as inoculum for the 100 l inoculum fermenter.

After additional 3 - 5 days of cultivation, the culture in the 100 l fermenter can be used
5 as inoculum for the 1000 l production fermenter.

b) Harvesting and Cell Separation

10 A batch refeed process is used, i.e. when the desired cell density is reached, approx. 80 % of the culture is harvested. The remaining culture is replenished with fresh culture medium and cultivated until the next harvest. One production run consists of a maximum of 10 subsequent harvests: 9 partial harvests and 1 overall harvest at the end of fermentation. Harvesting takes place every 3 - 4 days.

15 The determined harvest volume is transferred into a cooled vessel. The cells are removed by centrifugation or filtration and discarded. The EPO containing supernatant of the centrifugation step is in-line filtered and collected in a second cooled vessel. Each harvest is processed separately during purification.

20 A typical process for the purification of EPO-protein is disclosed in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996. The purification process is explained exemplary in the following.

25 a) Blue Sepharose Chromatography

Blue Sepharose (Pharmacia) consists of Sepharose beads to the surface of which the Cibacron blue dye is covalently bound. Since EPO binds more strongly to Blue Sepharose than most non-proteinaceous contaminants, some proteinaceous impurities and PVA, EPO

174
122

can be enriched in this step. The elution of the Blue Sepharose column is performed by increasing the salt concentration as well as the pH.

5 The column is filled with 80 - 100 l of Blue Sepharose, regenerated with NaOH and equilibrated with equilibration buffer (sodium/ calcium chloride and sodium acetate). The acidified and filtered fermenter supernatant is loaded. After completion of the loading, the column is washed first with a buffer similar to the equilibration buffer containing a higher sodium chloride concentration and consecutively with a Tris-base buffer. The product is eluted with a Tris-base buffer and collected in a single fraction in accordance with the master
10 elution profile.

b) Butyl Toyopearl Chromatography

15 The Butyl Toyopearl 650 C (TosoHaas) is a polystyrene based matrix to which aliphatic butyl-residues are covalently coupled. Since EPO binds more strongly to this gel than most of the impurities and PVA, it has to be eluted with a buffer containing isopropanol.

20 The column is packed with 30 - 40 l of Butyl Toyopearl 650 C, regenerated with NaOH, washed with a Tris-base buffer and equilibrated with a Tris-base buffer containing isopropanol.

25 The Blue Sepharose eluate is adjusted to the concentration of isopropanol in the column equilibration buffer and loaded onto the column. Then the column is washed with equilibration buffer with increased isopropanol concentration. The product is eluted with elution buffer (Tris-base buffer with high isopropanol content) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

c) Hydroxyapatite Ultrogel Chromatography

The Hydroxyapatite Ultrogel (Biosepra) consists of hydroxyapatite which is incorporated in an agarose matrix to improve the mechanical properties. EPO has a low affinity to hydroxyapatite and can therefore be eluted at lower phosphate concentrations than protein impurities.

The column is filled with 30 - 40 l of Hydroxyapatite Ultrogel and regenerated with a potassium phosphate/ calcium chloride buffer and NaOH followed by a Tris-base buffer. Then it is equilibrated with a Tris-base buffer containing a low amount of isopropanol and sodium chloride.

The EPO containing eluate of the Butyl Toyopearl chromatography is loaded onto the column. Subsequently the column is washed with equilibration buffer and a Tris-base buffer without isopropanol and sodium chloride. The product is eluted with a Tris-base buffer containing a low concentration of potassium phosphate and collected in a single fraction in accordance with the master elutiogram.

d) Reversed Phase HPLC on Vydac C4

The RP-HPLC material Vydac C4 (Vydac) consists of silica gel particles, the surfaces of which carry C4-alkyl chains. The separation of EPO from the proteinaceous impurities is based on differences in the strength of hydrophobic interactions. Elution is performed with an acetonitrile gradient in diluted trifluoroacetic acid.

Preparative HPLC is performed using a stainless steel column (filled with 2.8 to 3.2 liter of Vydac C4 silicagel). The Hydroxyapatite Ultrogel eluate is acidified by adding trifluoroacetic acid and loaded onto the Vydac C4 column. For washing and elution an acetonitrile

gradient in diluted trifluoroacetic acid is used. Fractions are collected and immediately neutralized with phosphate buffer. The EPO fractions which are within the IPC limits are pooled.

5 e) DEAE Sepharose Chromatography

10 The DEAE Sepharose (Pharmacia) material consists of diethylaminoethyl (DEAE) - groups which are covalently bound to the surface of Sepharose beads. The binding of EPO to the DEAE groups is mediated by ionic interactions. Acetonitrile and trifluoroacetic acid pass through the column without being retained. After these substances have been washed off, trace impurities are removed by washing the column with acetate buffer at a low pH. Then the column is washed with neutral phosphate buffer and EPO is eluted with a buffer with increased ionic strength.

15 The column is packed with DEAE Sepharose fast flow. The column volume is adjusted to assure an EPO load in the range of 3 - 10 mg EPO/ml gel. The column is washed with water and equilibration buffer (sodium/ potassium phosphate). The pooled fractions of the HPLC eluate are loaded and the column is washed with equilibration buffer. Then the column is washed with washing buffer (sodium acetate buffer) followed by washing with
20 equilibration buffer. Subsequently, EPO is eluted from the column with elution buffer (sodium chloride, sodium/ potassium phosphate) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

25 The eluate of the DEAE Sepharose column is adjusted to the specified conductivity. The resulting drug substance is sterile filtered into Teflon bottles and stored at -70°C .

EXAMPLE 2

Covalent Linking of thiol groups to EPO

5 This example discloses the determination of reaction conditions for the covalent linking of thiol groups to EPO. To determine the conditions, different amounts of a reagent containing a blocked thiol group, here SATA or SATP (dissolved in DMSO ad 10 mg/ml) were added to the EPO solution, here to 1 ml of 5 mg/ml EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The reaction was stirred for about 30 minutes (25°C) and
10 stopped by addition of 1 M lysine solution at 10 mM. Excess amounts of SATA and SATP were removed by dialysis against 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl and 2 mM EDTA, pH 6.2. After removal of the protecting acetyl group with hydroxylamine, the number of thiol groups covalently linked to EPO was determined photometrically with dithiodipyridine according to the method described by Grasetti, D.R. and Murray, J. F. in J.
15 Appl. Biochem. Biotechnol. 119, page 41-49 (1967).

The number of thiol groups covalently linked per EPO molecule is shown below.

Molar ratio EPO : SATA or SATP	Mol thiol groups / mol EPO
EPO : SATA = 1 : 3	1,5
EPO : SATA = 1 : 5	2.4
EPO : SATA = 1 : 6	3.2
EPO : SATP = 1 : 3	1.3
EPO : SATP = 1 : 4	2.5
EPO : SATP = 1 : 6	3.7

EXAMPLE 3

Modification of activated EPO with methoxy-PEG-maleimide

5

A) Activation of EPO:

100 mg EPO produced according to Example 1 (190,000 IU/ mg as determined by the normocythaemic mouse assay) were activated with SATA (molar ratio: EPO/SATA = 1/5) according to Example 2. The resulting EPO ("activated EPO") carrying covalently linked blocked thiol groups was separated from by-products like N-hydroxy-succinimide or non-reacted SATA by dialysis as described in Example 1. A solution of 4.5 mg/ml activated EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2 was obtained.

B) Pegylation of activated EPO:

15 380 mg methoxy-PEG-maleimide having the "most preferred" structure illustrated above (MW 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, USA)) was dissolved in the above solution containing 95 mg activated EPO (4.5 mg/ml in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2). The resulting molar ratio between activated EPO and methoxy-PEG-maleimide in the solution was 1 : 4. By addition of 1 M aqueous hydroxylamine solution ad 30 mM, pH 6.2 to the above solution the covalently linked blocked thiol groups of activated EPO were de-blocked. The resulting activated EPO in the reaction mixture of the solution contained free thiol (-SH) groups. De-blocking of the thiol groups was followed immediately by the coupling reaction between the activated EPO now containing free thiol (-SH) groups and methoxy-PEG-maleimide for 90 minutes (stirring, 25°C). The coupling reaction was stopped by addition of 0.2 M aqueous cysteine solution ad 2 mM to the reaction mixture. After 30 minutes excess free thiol groups of the activated EPO which did not react with methoxy-PEG-maleimide were blocked by addition of a 0.5 M N-methylmaleimide solution in DMSO to reach a concentration of 5 mM. After 30 minutes the

resulting reaction mixture now containing pegylated EPO species was dialyzed against 10 mM potassium phosphate, pH 7.5 for ≥ 15 hours.

C) Purification of pegylated EPO species:

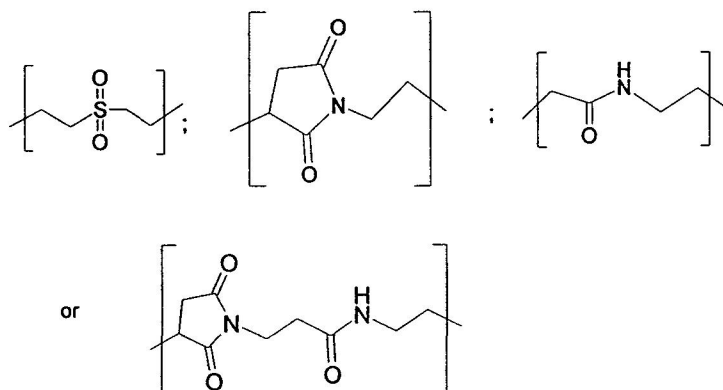
- 5 For separation of the pegylated EPO species from the reaction mixture, the following purification process was performed: A 50 ml Q-Sepharose ff column was equilibrated with 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. The reaction mixture obtained in step B) was loaded onto the column (flow rate: 3 column volumes (CV) per hour). In order to separate non-reacted methoxy-PEG-maleimide reagent, the column was washed with 5 CV's of 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. Pegylated EPO species were separated by elution with an increasing salt gradient consisting of 5 CV's buffer A (10 mM potassium phosphate, pH 7.5) and 5 CV's buffer B (10 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5) with a flow rate of 3 CV per hour. Based on the NaCl gradient, the pegylated EPO species (tri-, bi- and mono-pegylated EPO species) were eluted first, followed by the non-pegylated EPO species. The fraction of the eluate containing the pegylated EPO species (tri-, di- and mono-pegylated EPO species) was pooled and filtered (sterile filtration with a 0.2 μ m filter).

Content and purity of tri-, di- and mono-pegylated EPO species were evaluated on Coomassie-stained SDS-PAA gels (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)) while protein concentrations were measured at 280 nm according the Beer-Lambert law. The apparent molecular weights of the EPO species determined by SDS-PAA electrophoresis were about 68 kDa (mono-pegylated EPO species), about 98 kDa (di-pegylated EPO species) , and about 128 kDa (tri-pegylated EPO species).

- 25 Further separation of the tri-, di and mono-pegylated EPO species can be achieved by chromatography, e.g. by size exclusion chromatography (Superdex, pg 200; Pharmacia).

What is claimed is:

1. A conjugate, said conjugate comprising an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein *via* a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the $C(O)$ of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is



the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

2. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein is a human erythropoietin protein.

3. The conjugate of claim 2, wherein the erythropoietin glycoprotein has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

4. The conjugate of claim 3, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

5. The conjugate of claim 3, wherein k is from 1 to 4.

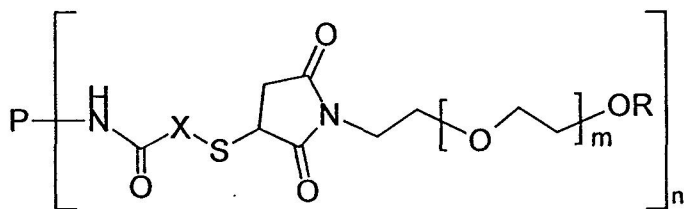
6. The conjugate of claim 3, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

7. The conjugate of claim 6, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

8. The conjugate of claim 3, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

9. The conjugate of claim 3, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

10. The conjugate of claim 3, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

11. The conjugate of claim 10, wherein X is $-CH_2-$.

12. The conjugate of claim 10, wherein m is an integer from 550 to 800.

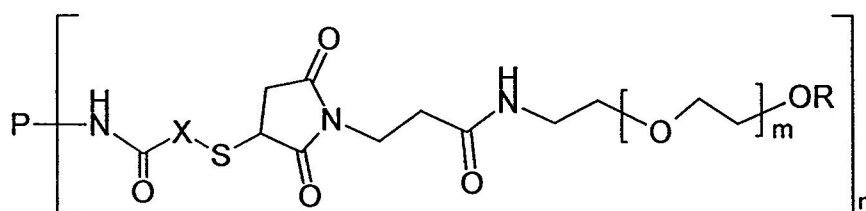
13. The conjugate of claim 12, wherein m is an integer from 650 to 700.

14. The conjugate of claim 10, wherein n is 1.

15. The conjugate of claim 10, wherein R is methyl.

16. The conjugate of claim 10, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

17. The conjugate of claim 3, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

18. The conjugate of claim 17, wherein X is $-CH_2-$.

19. The conjugate of claim 17, wherein m is an integer from 550 to 800.

5 20. The conjugate of claim 19, wherein m is an integer from 650 to 700.

21. The conjugate of claim 17, wherein R is methyl.

10 22. The conjugate of claim 17, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

23. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein has the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites.

15 24. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has a sequence selected from the group consisting of:

Asn³⁰Thr³² Figure 1;

Asn⁵¹Thr⁵³ Figure 1,

20 Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

25 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

5 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figure 1;

Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figure 1;

Thr¹²⁵ Figure 1; and

Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

10 25. The conjugate of claim 24, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

26. The conjugate of claim 24, wherein k is from 1 to 4.

15 72. The conjugate of claim 24, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

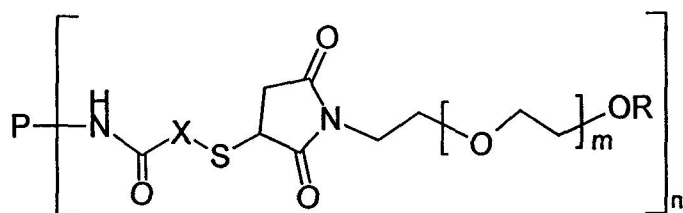
28. The conjugate of claim 27, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

20 29. The conjugate of claim 24, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

30. The conjugate of claim 24, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

25

31. The conjugate of claim 24, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

5

32. The conjugate of claim 31, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

33. The conjugate of claim 31, wherein m is an integer from 550 to 800.

10

34. The conjugate of claim 33, wherein m is an integer from 650 to 700.

35. The conjugate of claim 31, wherein n is 1.

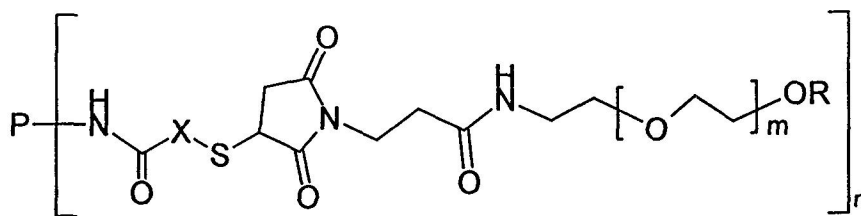
36. The conjugate of claim 31, wherein R is methyl.

15

37. The conjugate of claim 31, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

38. The conjugate of claim 24, of the formula:

20



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

39. The conjugate of claim 38, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

40. The conjugate of claim 38, wherein m is an integer from 550 to 800.

41. The conjugate of claim 40, wherein m is an integer from 650 to 700.

42. The conjugate of claim 38, wherein R is methyl.

43. The conjugate of claim 38, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

ABSTRACT

Erythropoietin glycoprotein products are disclosed which have the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells. The present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time, decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. In addition, compared with conventional PEG-EPO conjugates, the conjugates of this invention have superior clinical properties. The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a human employing the novel erythropoietin glycoprotein products as well as a method for preparing the erythropoietin glycoprotein products.

85284

139
137

Declaration and Power of Attorney for Patent Application

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name,

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

the specification of which

(check one)

☒ [X] is attached hereto.

☐ [] was filed on _____ as

Application Serial No. _____

and was amended on _____
(if applicable)

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or § 365(b) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate, or § 365(a) of any PCT International application which designated at least one country other than the United States, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent or inventor's certificate, or PCT International application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

Priority Claimed

_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ [] Yes	☐ [] No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ [] Yes	☐ [] No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ [] Yes	☐ [] No

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)	_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)
----------------------------	------------------------	----------------------------	------------------------

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s), or § 365(c) of any PCT International application designating the United States, listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

_____ (Application Serial No.)	_____ (Filing Date)	_____ (Status) (patented, pending, abandoned)
_____ (Application Serial No.)	_____ (Filing Date)	_____ (Status) (patented, pending, abandoned)

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

POWER OF ATTORNEY: As a named inventor, I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. *(list name and registration number)*

George W. Johnston	(Reg. No. 28090)	Dennis P. Tramaloni	(Reg. No. 28542)
William H. Epstein	(Reg. No. 20008)	Patricia S. Rocha-Tramaloni	(Reg. No. 31054)
Lewis J. Kreisler	(Reg. No. 38522)	John P. Parise	(Reg. No. 34403)
Briana C. Buchholz	(Reg. No. 39123)		

Send Correspondence to:
George W. Johnston, Esq., Hoffmann-La Roche Inc., 340 Kingsland Street,
Nutley, New Jersey 07110-1199

Direct Telephone Calls to: (name and telephone number)
Lewis J. Kreisler (973) 235-4387

Josef Burg
Full name of sole or first inventor

Inventor's signature _____ Date _____

Weilheim, Germany
Residence

Germany
Citizenship

An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany
Post Office Address

Bei. d Hilger

Full name of second joint inventor, if any

Second Inventor's signature

Date

Penzberg, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Post Office Address

Hans-Peter Josel

Full name of third joint inventor, if any

Third Inventor's signature

Date

Weilheim, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

Post Office Address

Full name of fourth joint inventor, if any

Fourth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

147
140

Full name of fifth joint inventor, if any

Fifth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56, duty to disclose information material to patentability provides, in part, that each individual associated with the filing and prosecution of a patent application has a duty of candor and good faith in dealing with the Office, which includes a duty to disclose to the Office all information known to that individual to be material to patentability as defined in this section. The duty to disclose information exists with respect to each pending claim until the claim is cancelled or withdrawn from consideration, or the application becomes abandoned.

Under this section, information is material to patentability when it is not cumulative to information already of record or being made of record in the application, and

- (1) It establishes, by itself or in combination with other information, a prima facie case of unpatentability of a claim; or
- (2) It refutes, or is inconsistent with, a position the applicant takes in:
 - (i) Opposing an argument of unpatentability relied on by the Office, or
 - (ii) Asserting an argument of patentability.

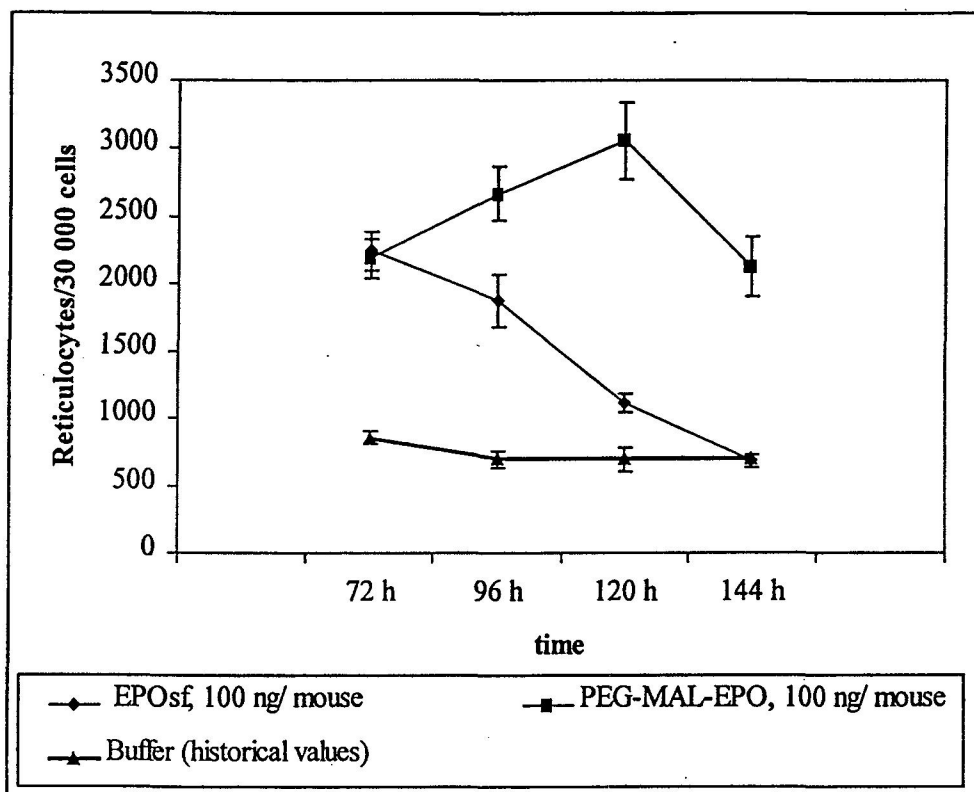
FIGURE 1

FIGURE 2

5 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
 10 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
 15 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
 20 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

25

FIGURE 3



Junio 17, 2000
Traducción Oficial No.0275
REF:F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Patente No.60/147,452

F. Hoffmann
Caso-20426

148
144

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES

Abril 07,2000

Por medio del presente documento se certifica que adjunta se encuentra una fiel copia de los registros de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, correspondientes a los documentos para la solicitud tal como se presentaron, con el fin de asignarle una fecha de registro bajo la norma del código 35 USC 111.

Número de Solicitud:60/147,452

Fecha de Registro:Agosto 5, 1999

Autorizado por:

Firma:N. WOODSON

Funcionario Encargado de Certificaciones

Hay sello realzado de la Oficina de Marcas y Patentes de color dorado.

Edwardo Calado

145

CERTIFICACION BAJO EL CODIGO 37

Codigo de Regulaciones federales 1.10

Yo por medio del presente documento certifico que éste ha sido enviado por Correo Postal - "CORREO POSTAL AL DESTINATARIO" de los Estados Unidos el 5 de Agosto de 1999, en un sobre rotulado como correo certificado al destinatario", número de registro de envío EL267098506US dirigido al "Assistant Commissioner of Patents de Washington, DC., 20231.

Nombre del depositante: PAMELA JOHNSTON

Firma: PAMELA JOHNSTON

HOJA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTE

Esta es una petición para registrar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo el código 37 CFR § 1.53 (b)(2):

Número de Caso: 1098P2

INVENTORES / SOLICITANTES

NOMBRE: Burg, Josef

RESIDENCIA: Weilheim, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: An der Barenmühle 1, 82362

Weilheim, Alemania

Eduardo Calado

150
146

NOMBRE:Hilger, Bernd

RESIDENCIA:Penzberg, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Am Katzenbuckel 21, 82377

Penzberg, Alemania

NOMBRE:Josel, Hans-Peter

RESIDENCIA:Weilheim,Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim,

Alemania

[] Los inventores adicionales se mencionaran en una hoja adjunta a la presente.

TITULO DE LA INVENCION

CONJUGADOS DE ERYTHROPOIETIN

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

Eduardo Calado

15A
147

George W. Johnston

Hoffmann-La Roche Inc.

340 Kingsland Street

Nutley, NJ 07110

PARTES DE LA SOLICITUD INCLUIDAS

(Verificar que todas apliquen)

- | | | | |
|---|----------------------|-------------------------------|---|
| ☒ [X] | ESPECIFICACIONES | ☐ [31] | Número de Páginas |
| ☒ [x] | REIVINDICACIONES | | No. de Reivindicaciones 87 (13 páginas) |
| ☐ [] | LISTADO DE SECUENCIA | ☐ [] | Número de Páginas |
| ☒ [x] | DECLARACIÓN | ☐ [4] | Número de Páginas (no firmadas) |
| ☒ [x] | GRAFICA (S) | ☐ [3] | Hojas de Gráficas |
| ☒ [x] | Otros | | <u>resumen (1 página)</u> |

FORMA DE DE PAGO DE HONORARIOS PARA LA SOLICITUD

PROVISIONAL DE ESTA PATENTE (Señalar uno)

- ☒ [x] El comisionado por la presente se encuentra autorizado a cobrar honorarios de registro y crédito al número de Cuenta Bancaria **08-2525**

Honorarios provisionales para registro = \$150.000

Eduardo Calado

152
148

La invencion fué realizada por una agencia del Gobierno de los Estados Unidos o bajo contrato con una agencia del Gobierno de los Estados Unidos.

☒ No

☐ Sí, el nombre de la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos y número de contrato son los siguientes:

Presentado atentamente,

FIRMA:Lewis J. Kreisler

No. de Registro:38522

Telefono: (973) 235-4387

Telefax: (973) 235-2363

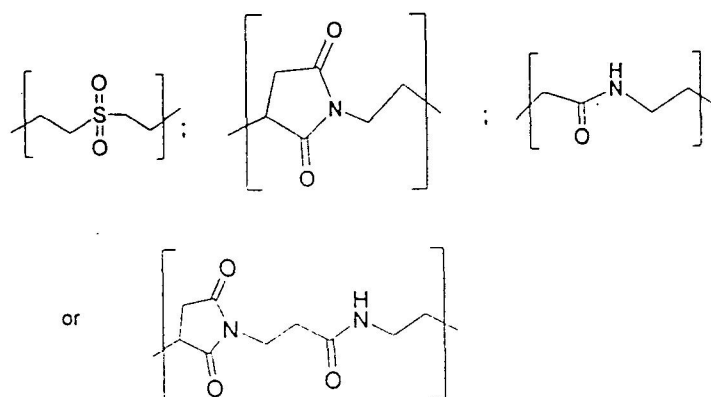
Fecha: Agosto 5, 1999

Eduardo Calado

REIVINDICACIONES :

1. Un conjugado, dicho conjugado consta de glicoproteína eritropoietin el cual tiene por lo menos un grupo de amino ácidos, el cual tiene una actividad biológica *in vivo* la cual produce en las células en la médula del hueso un incremento en la producción de reticulocitos y célula y glóbulos rojos, seleccionados de un grupo que consiste de eritropoietinas y análogos del mismo los cuales tienen la secuencia primaria de estructura de eritropoietinas humana modificadas mediante la adición desde 1 hasta 6 sitios de glicosilaciones; encontrándose dicha glicoproteína covalentemente enlazada desde uno a tres grupo de bajo alcoxi poli (etileno glicol), cada grupo de poli (etileno glicol) encontrándose covalentemente enlazado a la glicoproteína vía un enlazador de la formula $-C(O)-X-S-Y$ con el $C(O)$ del eslabonamiento el cual forma un enlace de amida con uno de los mencionados grupos de aminos, X es $-(CH_2)_k$ o $CH_2(O-CH_2-CH_2)-$, k es desde 1 hasta 10, Y es

Eduardo Celado



siendo el promedio molecular de peso de cada parte de poli (etileno glicol) aproximadamente desde 20 kilodaltones hasta alrededor de 40 kilodaltones, y el peso molecular del conjugado es de aproximadamente 51 kilodaltones hasta alrededor de 175 kilodaltones.

2. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina es una proteína eritropoietina humana.
3. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 2, en el cual la glicoproteína eritropoietina tiene una secuencia presentada en la Grafica 1 o la Gráfica 2.
4. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual X es $-(CH_2)_k-$.

Edwardo Calado

5. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en el cual k es desde 1 hasta 4.

6. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

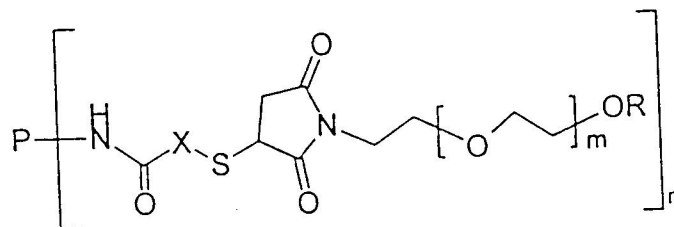
7. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 6, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.

8. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronados de poli (etileno glicol).

9. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronados mediante el metoxi.

10. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, de la fórmula:

Eduardo Calado



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(CH_2)_k$ - o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k$ -, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X .

11. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual X es $-CH_2$ -,

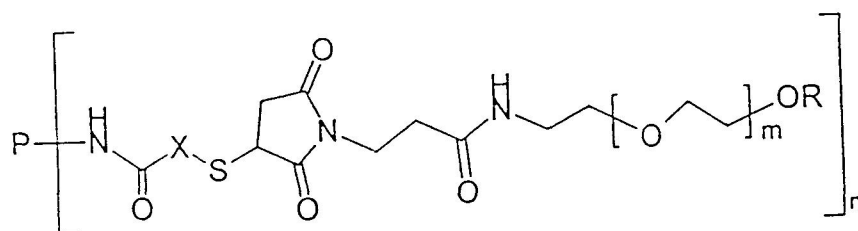
12. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

13. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 12, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

14. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual n es 1.

Eduardo Calado

15. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual R es metilo.
16. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 10, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.
17. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 3, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(CH_2)_k$ - o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k$ -, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

18. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual X es $-CH_2-$.
19. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

Eduardo Calvo

20. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 19, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

21. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual R es metilo.

22. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 17, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

23. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina tiene una estructura primaria de la eritropoietina humana modificada mediante la adición aproximada desde 1 hasta 6 sitios de glicosilación.

24. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína tiene una secuencia seleccionada desde un grupo que consiste de :

Eduardo Calado

Asn30 Thr32 Gráfica 1;

Asn51 Thr53 Gráfica 1;

Asn57 Thr59 Gráfica 1;

Asn69 Gráfica 1;

Asn69 Thr71 Gráfica 1;

Ser68Asn69 Thr71 Gráfica 1;

Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;

Ser87Asn88 Thr90 Gráfica 1;

Ser87 Asn88 Gly89 Thr90 Gráfica 1 Gráfica 1;

Ser87 Asn88 Thr90 Thr92 Gráfica 1;

Ser87 Asn88 Thr90 Ala162 Gráfica 1;

Asn69 Thr71 Ser87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;

Asn30 Thr32 Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;

Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;

Ser87 Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;

Asn136 Thr138 Gráfica 1;

Asn138 Thr138 Gráfica 1;

Asn138 Thr140 Gráfica 1;

Thr125; y

Pro124Thr125 Gráfica 1.

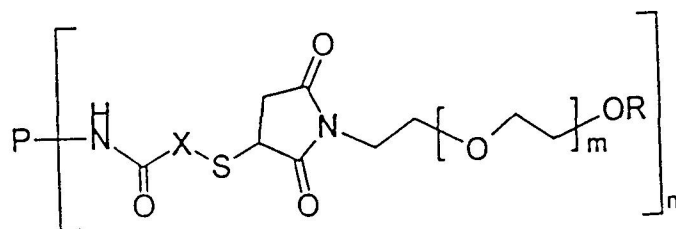
Eduardo Calado

156

25. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual X es $-(CH_2)_k$.
26. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual k es desde 1 hasta 4.
27. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.
28. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 27, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.
29. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronados de poli (etileno glicol).
- 30.. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

Eduardo

31. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

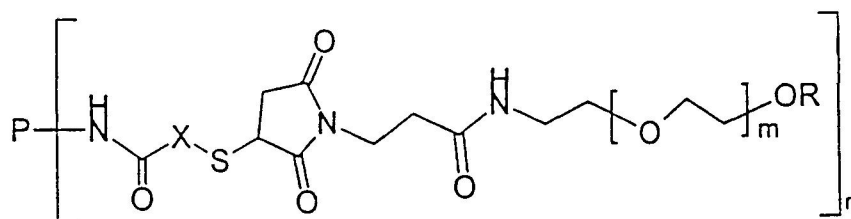
32. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual X es -CH₂-,

33. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

34. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 33, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

Eduardo Calado

35. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual n es 1.
36. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual R es metilo.
37. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 31, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.
38. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 24, de acuerdo a la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(\text{CH}_2)_k$ o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k$, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

39. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual es $-\text{CH}_2-$.

Edoardo Calacal

40. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

41. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 40, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

42. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual R es metilo.

43. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 38, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

44. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en la cual la secuencia de glicoproteína tiene una secuencia que consiste de una secuencia humana de eritropoietina y una segunda secuencia en el terminus de carboxi de la secuencia humana de eritropoietina en el cual la segunda secuencia contiene por lo menos un sitio de glicolización.

Eduardo Calado

160

45. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 44, en el cual la segunda secuencia consiste de una secuencia derivada de la secuencia terminal de carboxi de la gonadotropina chorionica humana.

46. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 45, en la cual la glicoproteina tiene una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de:

(a) la secuencia de arithropoietina humana y las secuencias 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 en el terminus de carboxi de la secuencia de erithropoietina humana;

(b) la secuencia en (a) modificada mediante Ser87 Asn88 Thr90; y

(c) la secuencia en (a) modificada mediante Asn Thr32 Val87 Asn Thr90.

47. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en el cual X es $-(CH_2)_k$.

48. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en el cual k es desde 1 hasta 4.

Eduardo Calzado

49. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

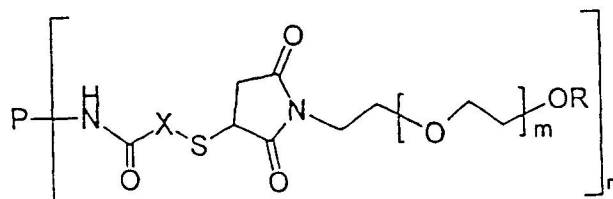
50. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 49, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.

51. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronador de poli (etileno glicol).

52. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

53. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, de la formula:

Eduardo Palado



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

54. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual X es -CH₂-,

55. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

56. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 55, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

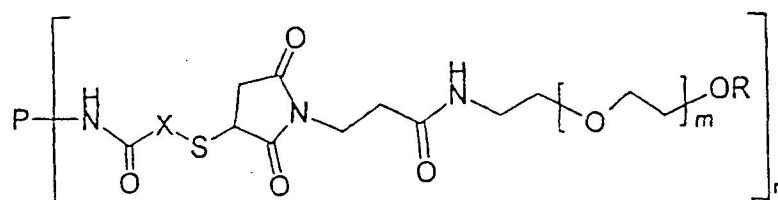
57. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual n es 1.

Eduardo Calado
Edm
-TR

58. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual R es metilo.

59. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

60. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, de acuerdo a la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(\text{CH}_2)_k$ - o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k$ -, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo o grupos de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

61. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 60, en el cual X es $-\text{CH}_2-$.

Edwards Palacios

62. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 60, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

63. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 62, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

64. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 60, en el cual R es metilo.

65. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 60, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 hasta la gráfica 2.

66. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en la cual la glicoproteína tiene una secuencia de eritropoietina modificada mediante la reorganización de por lo menos un sitio de glicosilación.

67. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 66, en el cual la reorganización consta de la anulación de cualquier sitio de glicosilación de enlace N en eritropoietina humana y la adición del sitio de glicosilación con enlace - N en la posición 88 de la secuencia de eritropoietina humana.

Eduardo Calado

109
165

68. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 67, en el cual la glicoproteína tiene una secuencia de eritropoietina humana modificada mediante una modificación seleccionada de un grupo que consiste de:

Gln 24 Ser87 Asn88 Thr90;

Gln38 Ser87 Asn88 Thr90; y

Gln83 Ser87 Asn88 Thr90.

69. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en el cual X es $-(CH_2)_k$.

70. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en el cual k es desde 1 hasta 4.

71. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

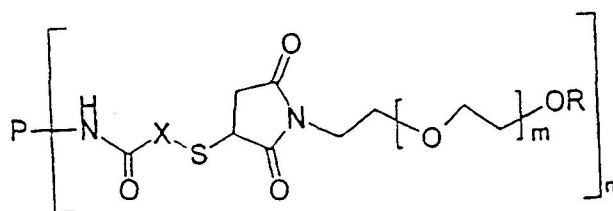
Eduardo Calasdo

72. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 71, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.

73. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronados de poli (etileno glicol).

74. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

75. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

Edwardo Calvo

76. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 75, en la cual X es -CH₂-,

77. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 75, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

78. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 77, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

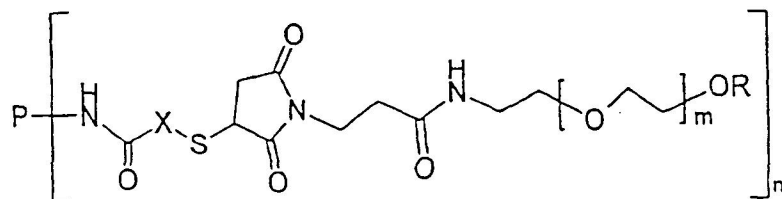
79. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 75, en la cual n es 1.

80. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 75, en la cual R es metilo.

81. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 75, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

82. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, de acuerdo a la formula:

Eduardo Calado



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X .

83. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 82, en el cual X es $-CH_2-$.

84. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 82, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

85. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 84, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

86. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 82, en el cual R es metilo.

87. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 82, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

Edwards

GRÁFICA 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Gly Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Edwards Calado

(7A)
170

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp
Thr Phe Arg Lys140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp165

Edwards Calado

(7)
171

GRÁFICA 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Gly Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Eduardo Calvo

176
122

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp

Thr Phe Arg Lys140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr

Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp166

Edwards Calado h ..

Caso:No1098P2

DECLARACION Y PODER
PARA LA SOLICITUD DE PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

Yo en mi calidad de abajo mencionado inventor, por la presente declaro:

Mi residencia, dirección de Oficina Postal y ciudadanía son mencionados a continuación como también mi nombre.

Yo creo ser el único y primer inventor (si solo se encuentra un nombre en la lista) o original, primero y co-inventor del tópico en cuestión, el cual se reivindica pidiendo la solicitud de patente de invención con el título:

TITULO DE LA INVENCION (280 Caracteres máximo)

CONJUGADOS DE ERITHROPOIETINA

cuya especificaciones:
(Indique uno)

Eduardo Calado

☒ se encuentra adjunto.

☐ Fue registrado en _____ como

No Serial de la Solicitud _____

(78)
124

y fue revisado en _____
(si aplica)

Yo por medio del presente documento declaro que he revisado y entiendo el contenido de las especificaciones anteriormente mencionadas, incluyendo las reivindicaciones.

Yo tengo conocimiento sobre mi obligación de revelar toda información que sea parte del material patentable tal como lo define el Artículo 37 C.F.R. §1.56.

Yo por la presente reivindico beneficios de prioridad bajo el Título 35, del Código de los Estados Unidos, Sección §119 (a) -(d) de cualquiera de la solicitud(es) extranjera para patente (s) o certificado como inventor o § 365 (a) de cualquier Solicitud para Patente Internacional (PCT), para la cual se ha nombrado por lo menos a un país además de los Estados Unidos, como es anteriormente mencionado e identificado, Indicando con una indicación en las cajillas , de cualquier solicitud extranjera para Patente certificado como inventor, o solicitud Internacional PCT con una fecha de registro anterior de aquella solicitud que aparece en la cual se reivindica prioridad.

Eduardo Calado

Solicitudes extranjeras con una fecha de registro anterior (es)

Prioridades Reivindicadas
[] []

179
125

(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No

Yo por medio de la presente reivindico los beneficios bajo 35 U.S.C. § 119 (e)
sobre solicitudes anteriores de los Estados Unidos mencionadas a continuación:

_____	_____	_____	_____
(No Solicitud)	(Fecha de Registro)	(No Solicitud)	(Fecha de registro)

Yo por medio de la presente reivindico beneficios bajo el Código 35
USC § 120 de solicitud de Patente registrada en los Estados Unidos,
o §365(c) de cualquier solicitud Internacional de patentes PCT en
la manera requeridas tal como se menciona anteriormente y respecto
al tópico en cuestión de cada una de las reivindicaciones de esta
solicitud la cual no se haya revelada con anterioridad en solicitudes
anteriores en los Estados Unidos de acuerdo a lo establecido por el
primer párrafo de la norma del Código 35CFR. § 112, tengo
conocimiento de mi obligación de revelar toda información que se
considere parte del material patentable a la Oficina de Marcas y
Patentes tal como lo define la norma del Código 37 C.F.R. §1.56 el
cual se hizo efectiva entre las fechas de registro de la solicitud
anterior y la fecha de registro Internacional PCT de esta solicitud.

Edwardo Caladilla

 (No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (estatus)(patentado,pendiente,
 abandonado)

 (No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (Estatus)(patentado,pendiente,
 abandonado)

Yo, por la presente afirmo que toda declaración presentada es de mi
 entero conocimiento, fiel y verdadera y tengo presente que toda
 falsa declaración es castigada mediante una multa o el
 encarcelamiento, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del
 Código de los Estados Unidos, y que cualquier declaración puede
 comprometer la validez de esta solicitud o de cualquier patente
 expedida inmediatamente después.

PODER :

Como Inventor, yo por la presente nombro al (los) siguiente (s)
 abogados y /o representante (s) para procesar esta solicitud y llevar a
 cabo toda transacción de negocios en la Oficina de Marcas y Patentes

Eduardo Palacios

187
177

relacionadas con la presente. (*listado de nombres y números de registro*)

	No. de Registro	
GEORGE W. JOHNSTON	Reg No.	28090
WILLIAM H. EPSTEIN	Reg No.	20008
LEWIS J. KREISLER	Reg No.	38522
BRIANA C. BUCHHOLZ	Reg	399123
DENNIS P. TRAMALONI	Reg No.	28542
PATRICIA S. ROCHA-TRAMALONI	Reg No.	31054
JOHN P. PARISE	Reg No.	34403

ENVIAR LA CORRESPONDENCIA A:

George W, Johnston, Esq.

HOFFMANN LA ROCHE INC.,

350 KINGSLAND STREET

NUTLEY, NEW JERSEY 07110-1199

llamadas telefónicas:Lewis J. Kreisler (973) 253-4387

Nombre: JOSEF BURG

Residencia: Weilheim, Alemania

Ciudadanía:Alemana

Eduardo Calado R.

137
178

Oficina Postal An der Barenmühle 1,82362 Weilheim, Alemania

Nombre:BERND HILGER

Residencia: Penzberg, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal: Am Kattzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Alemania

Nombre:Hans Peter Josel

Residencia: Weilheim, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal:Pratenweg 7, 82362 Welheim, Alemania

De acuerdo al Título 37, del Código de Regulaciones Federales, § 1.56, tengo conocimiento sobre mi obligación de proteger y revelar información de material patentable el cual especifica que cada persona asociada con el registro y la continuación de la solicitud de patente tiene un deber de cumplimiento y buena fe en llevar a cabo todas las negociaciones con la Oficina de Patentes, la cual se debe proteger y revelar toda información de material patentable tal como lo define ésta sección. El deber de revelar toda información respecto a cada reivindicación pendiente hasta que la reivindicación sea anulada, reservada o la solicitud sea abandonada.

Eduardo Calado R.

187
179

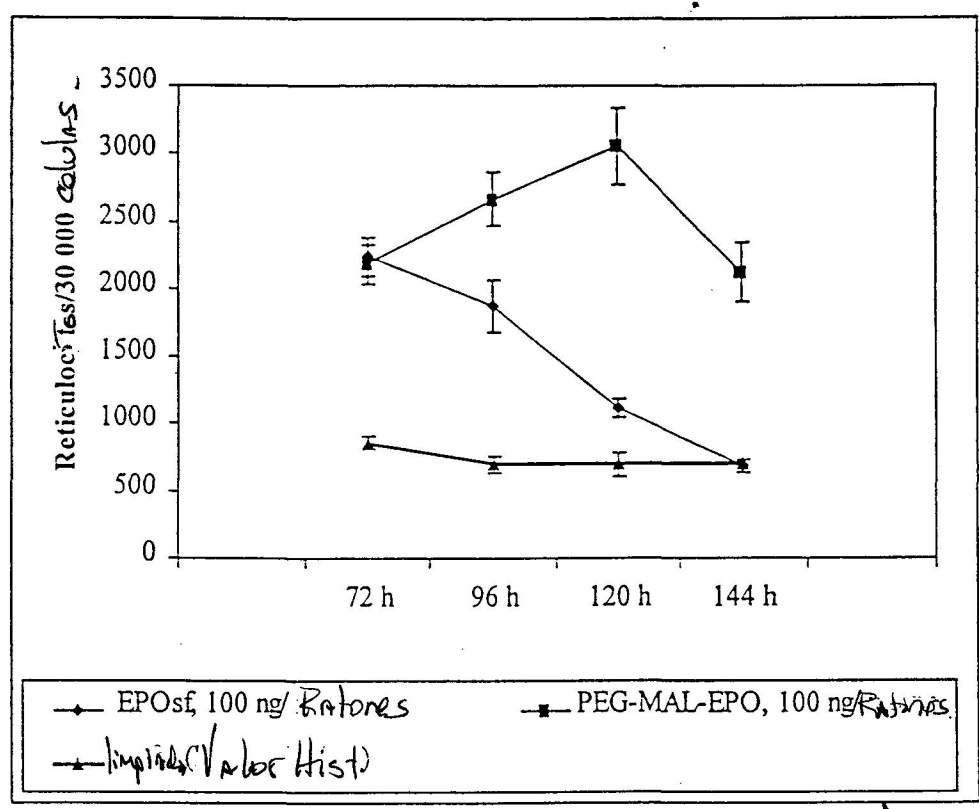
Bajo esta sección la información es material patentable hasta cuando no es cumulativo sobre información que aparezca en los registros o sean parte de los registros en la solicitud, y

- (1) Reconoce que por si sola o conjuntamente con otra información o pruebas suficientes de la patentabilidad de una reivindicación; o
- (2) Si refuta o es inconsistente con la posición de un solicitante:
 - (i) Oponerse a un argumento de no patentabilidad propuesto por la Oficina, o
 - (ii) Afirmación de un argumento sobre patentabilidad.

Eduardo Calado

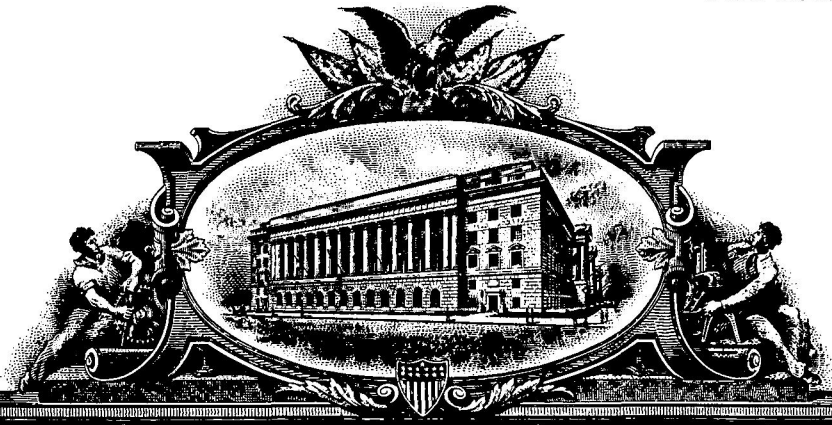
181
180

GRAFICA 3



Edwardo Calado

PA 232092



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 07, 2000

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 60/147,452

FILING DATE: August 05, 1999



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**


N. WOODSON
Certifying Officer

CERTIFICATION UNDER 37 CFR 1.10

A / PROV 182

I hereby certify that this New Application Transmittal and the documents referred to as enclosed therein are being deposited with the United States Postal Service on this date August 5, 1999 in an envelope as "Express Mail Post Office to Addressee" Mailing Label Number EL267098506US addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Pamela Johnston

(Print Name)

Pamela Johnston

(Signature)

08/05/99
JCS15 U.S. PTO

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53(b)(2).

Docket No. 1098P2

JCS42 U.S. PTO
60/147452
08/05/99

INVENTOR(s)/APPLICANT(s)

Name: Burg, Josef
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany

Name: Hilger, Bernd
Residence: Penzberg, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Name: Josel, Hans-Peter
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

[] Additional inventors are being named on sheets attached hereto

TITLE OF THE INVENTION

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

CORRESPONDENCE ADDRESS

George W. Johnston
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

- | | | | |
|---|-----------------------------|---|---------------------------|
| ☒ Specification | No. of Pages 31 | ☒ Declaration | No. of Pages 4 (unsigned) |
| ☒ Claims | No. of Claims 87 (13 pages) | ☒ Drawings | Sheets of Drawings 3 |
| ☐ Sequence Listing | No. of Pages | ☒ Other | Abstract (1 page) |

DEPOSIT ACCOUNT
NO. 08-2525
CUR ORDER NO. 2670

08/05/99 08/05/99

187
183

METHOD OF PAYMENT

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 08-2525

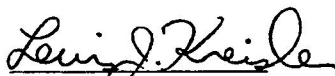
Provisional
Filing Fee
Amount \$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,


Attorney of Record

Lewis J. Kreisler
(Reg. No. 38522)
Telephone: (973) 235-4387
Telefax: (973) 235-2363
Date: August 5, 1999

86837

198
184

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

BACKGROUND OF THE INVENTION

Erythropoiesis is the production of red blood cells which occurs to offset cell destruction. Erythropoiesis is a controlled physiological mechanism that enables sufficient red blood cells to be available for proper tissue oxygenation. Naturally occurring human erythropoietin (hEPO) is a glycoprotein containing 165 amino acids that is produced in the kidney and is the humoral plasma factor which stimulates red blood cell production (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953) Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W and Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). Human EPO stimulates the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Human EPO exerts its biological activity by binding to receptors on erythroid precursors (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419). Naturally occurring human erythropoietin is an acidic glycoprotein present in low concentrations in plasma to stimulate replacement of red blood cells which are lost through aging.

Erythropoietin has been manufactured biosynthetically using recombinant DNA technology (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) and is the product of a cloned human EPO gene inserted into and expressed in the ovarian tissue cells of the chinese hamster (CHO cells). Naturally occurring human EPO is first translated to a 166 aa containing polypeptide chain with arginine 166. In a postranslational modification arginine 166 is cleaved by a carboxypeptidase. The primary structure of human EPO (165 aa) is illustrated in Figure 1. The primary structure of human EPO (166 aa) is illustrated in Figure 2. There are two disulfide bridges between Cys⁷-Cys¹⁶¹ and Cys²⁹-Cys³³. The

molecular weight of the polypeptide chain of human EPO without the sugar moieties is 18,236 Da. In the intact EPO molecule, approximately 40% of the molecular weight is accounted for by the carbohydrate groups (Sasaki,H, Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

5

Because erythropoietin is essential in red blood cell formation, the hormone is useful in the treatment of blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Clinically, EPO is used in the treatment of for example anemia in chronic renal failure patients (CRF) (Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lin, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) and in AIDS and cancer patients undergoing chemotherapy (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker;1990: p. 301-324). However, the bioavailability of currently available protein therapeutics such as EPO is limited by their short plasma half-life and susceptibility to protease degradation. These shortcomings prevent them from attaining maximum clinical potency.

10
15
20

SUMMARY OF THE INVENTION

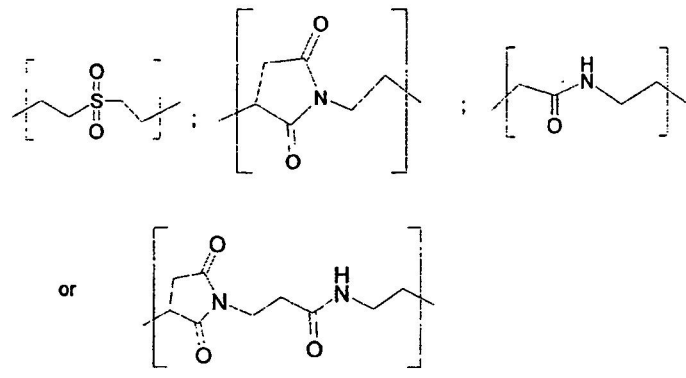
20

Accordingly, the present invention is a new class of PEG derivatives of EPO. The physiologically active PEG-EPO conjugates of this invention comprise an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-

25

alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein *via* a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the C(O) of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is

5



the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

10

Compared to unmodified EPO (i.e., EPO without a PEG attached) and conventional PEG-EPO conjugates, the present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time, decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. The conjugates of this invention have the same uses as EPO. In particular, the conjugates of this invention are useful to treat patients by stimulating the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow in the same way EPO is used to treat patients.

15

20

The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a human.

197
187

The present invention also includes a method for preparing the erythropoietin glycoprotein products which comprises covalently reacting an ϵ -amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein with a bi-functional reagent to form an intermediate with an amide linkage. The bi-functional reagent contains a reactive group and a protected thiol group. The amide-linked intermediate is then covalently reacted with an activated polyethylene glycol derivative to form the erythropoietin glycoprotein product of the present invention.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Figure 1: Primary structure of human EPO (165 amino acids).
- Figure 2: Primary structure of human EPO (166 amino acids)
- Figure 3: In vivo activity of pegylated EPO determined by normocyaemic mouse assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

The following terms shall have the definitions set out below:

The term "erythropoietin protein", "erythropoietin", "EPO", or "erythropoietin glycoprotein" refers to a glycoprotein having the sequence shown in Figure 1 or 2, or a protein or polypeptide substantially homologous thereto, whose biological properties relate to the stimulation of red blood cell production and the stimulation of the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. As used herein the term EPO protein includes such proteins modified deliberately, as for example, by site

directed mutagenesis or accidentally through mutations. These terms also include analogs having from 1 to 6 additional glycosylation sites, analogs having at least one additional amino acid at the carboxy terminal end of the protein wherein the additional amino acid(s) includes at least one glycosylation site, and analogs having an amino acid sequence which includes a rearrangement of at least one glycosylation site, such as for example the analogs disclosed in European Patent Publication No. 640 619. These terms include both natural and recombinantly produced human erythropoietin.

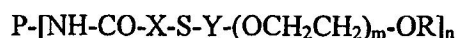
The term "substantially homologous" means that a particular subject sequence, for example, a mutant sequence, varies from a reference sequence by one or more substitutions, deletions, or additions, the net effect of which does not result in an adverse functional dissimilarity between the reference and subject sequences. For purposes of the present invention, sequences having greater than 95 percent homology, equivalent biological properties, and equivalent expression characteristics are considered substantially homologous. For purposes of determining homology, truncation of the mature sequence should be disregarded. Sequences having lesser degrees of homology, comparable bioactivity, and equivalent expression characteristics are considered substantial equivalents.

The term "fragment" of the EPO protein means any protein or polypeptide having the amino acid sequence of a portion or fragment of an EPO protein, and which has the biological activity of the EPO. Fragments include proteins or polypeptides produced by proteolytic degradation of the EPO protein or produced by chemical synthesis by methods routine in the art. An EPO protein or fragment thereof is biologically active when administration of the protein or fragment to man results in the stimulation of red blood cell production and the stimulation of the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Determining such biological activity of the EPO protein can be carried out by conventional, well known tests utilized for such purposes on one or more

species of mammals. An appropriate test which can be utilized to demonstrate such biological activity is described herein.

The term "therapeutically effective amount" is that amount of erythropoietin glycoprotein product necessary for the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells. The exact amount of erythropoietin glycoprotein product is a matter of preference subject to such factors as the exact type of condition being treated, the condition of the patient being treated, as well as the other ingredients in the composition. The pharmaceutical compositions containing the erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Average therapeutically effective amounts of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

The present invention is directed to erythropoietin glycoprotein products having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells represented by Formula 1:



In Formula 1, P is an erythropoietin glycoprotein less the amino group or amino groups which form an amide linkage with X. As set out in detail below, the preparation and purification of EPO are well known in the art. By EPO is meant the natural or recombinant protein, preferably human, as obtained from any conventional source such as tissues, protein synthesis, cell culture with natural or recombinant cells. Any protein having the activity of EPO, such as muteins or otherwise modified proteins, is encompassed. Recombinant EPO may be prepared via expression in CHO-, BHK- or HeLa cell lines, by recombinant DNA

technology or by endogenous gene activation. The preferred EPO species for the preparation of erythropoietin glycoprotein products are human EPO species. More preferably, the EPO species is the human EPO having the amino acid sequence set out in Figure 1.

5 The human erythropoietin protein may also be modified to at least one additional site for glycosylation such as, but not limited to, the amino acid sequences as set out below. The notation below means that the sequence set forth in Figure 1 has been modified by substituting the native amino acid at the superscripted numbered position shown for the amino acid indicated to the left of the superscripted number.

10

Asn³⁰Thr³² Figure 1;

Asn⁵¹Thr⁵³ Figure 1;

Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹ Figure 1;

15

Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figure 1;

20

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

25

Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figure 1;

Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figure 1;

Thr¹²⁵ Figure 1; and

Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

The human erythropoietin protein may also be an analog having at least one additional amino acid at the carboxy terminal end of the glycoprotein, wherein the additional amino acid includes at least one glycosylation site. The additional amino acid may comprise a peptide fragment derived from the carboxy terminal end of human chorionic gonadotropin. Preferably, the glycoprotein is an analog 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 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; and (c) the analog in (a) further comprising Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

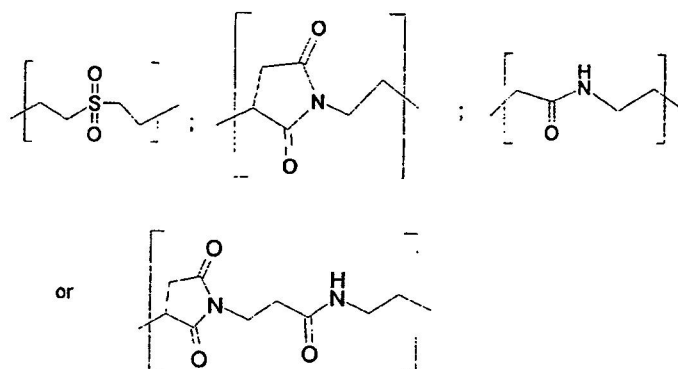
The human erythropoietin protein may also be an analog having an amino acid sequence which includes a rearrangement of at least one site for glycosylation. The rearrangement may comprise a deletion of any of the N-linked carbohydrate sites in human erythropoietin and an addition of an N-linked carbohydrate site at position 88 of the amino acid sequence of human erythropoietin. Preferably, the glycoprotein is an analog selected from the group consisting of Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; and Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

Erythropoietin analogs with additional glycosylation sites are disclosed in European Patent Publication No. 640 619, to Elliot, published March 1, 1995, the contents of which are incorporated herein by reference.

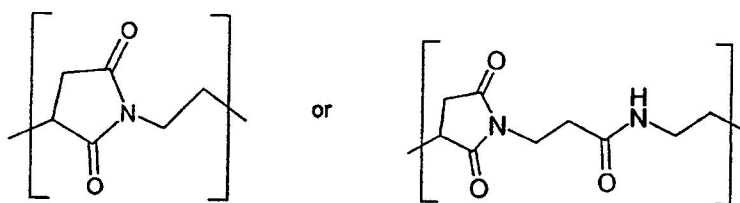
In Formula 1, R may be any lower alkyl, by which is meant a linear or branched alkyl group having from one to six carbon atoms such as methyl, ethyl, isopropyl, etc. A preferred alkyl is methyl.

In Formula 1, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10. Preferably, k is from 1 to about 4, more preferably, k is 1 or 2. Most preferably, X is $-(CH_2)-$

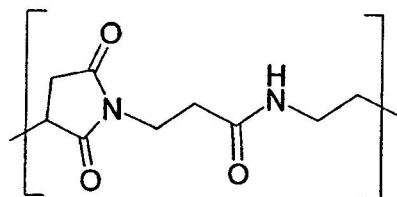
5 In Formula 1, Y is



10 Preferably Y is



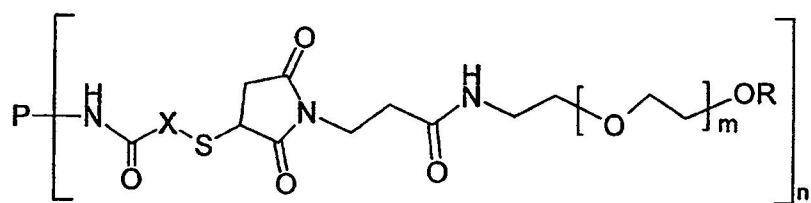
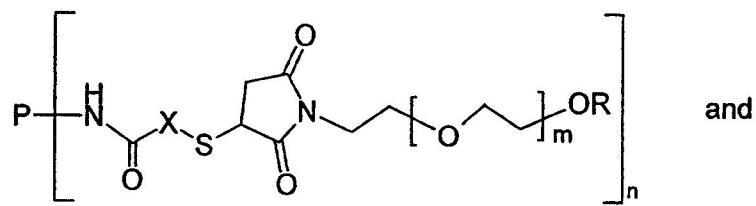
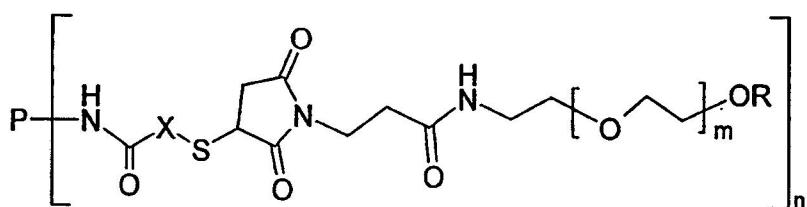
15 Most preferably, Y is



In Formula 1, the number m is selected such that the resulting conjugate of Formula 1 has a physiological activity comparable to unmodified EPO, which activity may represent the same as, more than, or a fraction of the corresponding activity of unmodified EPO. m represents the number of ethylene oxide residues in the PEG unit. A single PEG subunit of $-(OCH_2CH_2)-$ has a molecular weight of about 44 daltons. Thus, the molecular weight of the conjugate (excluding the molecular weight of the EPO) depends on the number m . A molecular weight of "about" a certain number means that it is within a reasonable range of that number as determined by conventional analytical techniques. m is an integer ranging from about 450 to about 900 (corresponding to a molecular weight of from 20 to 40 kDa), preferably m is from about 550 to about 800 (about 24 to 35 kDa), and most preferably m is from about 650 to about 700 (about 29 to about 31 kDa).

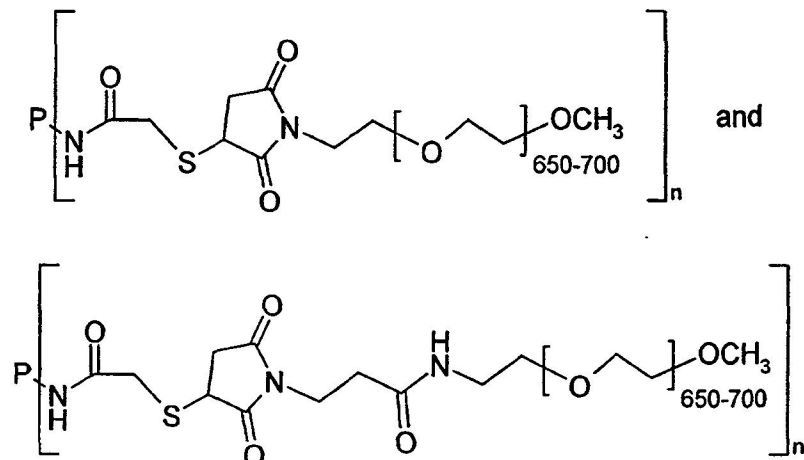
In Formula 1, the number n is the number of ϵ -amino groups of a lysine amino acid in an erythropoietin protein covalently bound to a PEG unit via an amide linkage. A conjugate of this invention may have one, two, or three PEG units per molecule of EPO. n is an integer ranging from 1 to 3, preferably n is 1 or 2, and more preferably n is 1.

Preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:

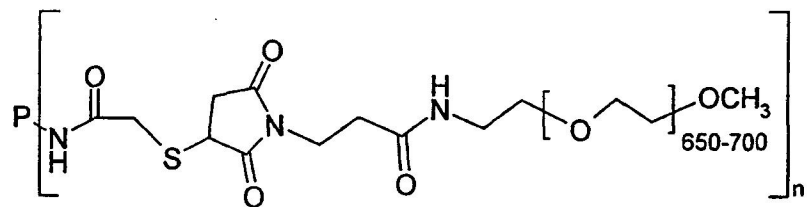


Most preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:

5 Other preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:



More preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:



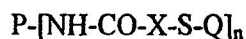
5

In another embodiment, the invention is directed to a method for the treatment of anemia in a human which comprises administering to a human a therapeutically effective amount of an erythropoietin glycoprotein product represented by Formula 1.

10

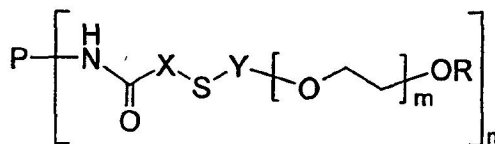
In still another embodiment, the invention is directed to a method for preparing an erythropoietin glycoprotein product, having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells, which comprises the steps of:

(a) covalently reacting an ϵ -amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein represented by the formula, $P-[NH_2]_n$, with a bi-functional reagent represented by the formula, $Z-CO-X-S-Q$, to form an intermediate with an amide linkage represented by the formula:

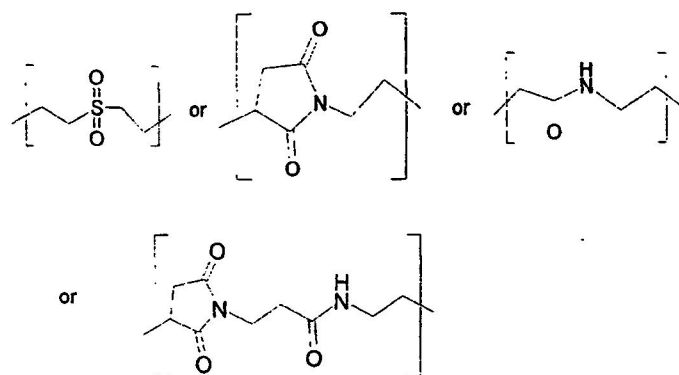


wherein P is an erythropoietin protein less the amino group which forms an amide linkage; n is an integer ranging from 1 to 3; Z is a reactive group, e.g. a carboxylic-NHS ester; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10; and Q is a protecting group, like alkanoyl, e.g. acetyl.

(b) covalently reacting the intermediate with an amide linkage from step (a) with an activated polyethylene glycol derivative represented by the formula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, to form an erythropoietin glycoprotein product represented by the formula:



wherein W is a sulfhydryl reactive form of Y; m is an integer ranging from about 450 to about 900; R is lower alkyl; and Y is



In this embodiment, the bi-functional reagent is preferably N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate or N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, Z is preferably N-hydroxy-succinimide, and the activated polyethylene glycol derivative W-[OCH₂CH₂]_m-OR is preferably selected from the group consisting of iodo-acetyl-methoxy-PEG, methoxy-PEG-vinylsulfone, and methoxy-PEG-maleimide.

Methods for Expressing EPO Proteins

Erythropoietin (EPO) is a human glycoprotein which stimulates the formation of erythrocytes. Its preparation and therapeutic application are described in detail for example in U.S. Patent Nos. 5,547,933 and 5,621,080, EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 and EP-B 0 411 678 as well as Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, an Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. Erythropoietin for therapeutic may be produced by recombinant means (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 and Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224).

Methods for the expression and preparation of erythropoietin in serum free medium are described for example in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, and in European Patent Publication No. 513 738, to Koch published 12 June 1992.

5 Methods for Purifying Human EPO Protein

In addition to the references mentioned above, it is known that a serum-free fermentation of recombinant CHO cells which contain an EPO gene can be carried out. Such methods are described for example in EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 and in a general form by Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. and Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expology 271 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

In EP-A 0 267 678 an ion exchange chromatography on S-Sepharose, a preparative reverse phase HPLC on a C₈ column and a gel filtration chromatography are described for the purification of EPO produced in serum-free culture after dialysis. In this connection the gel filtration chromatography step can be replaced by ion exchange chromatography on S-Sepharose fast flow. It is also proposed that a dye chromatography on a Blue Trisacryl column be carried out before the ion exchange chromatography.

A process for the purification of recombinant EPO is described by Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359. In this process EPO is treated however with a solution of Tween[®] 20, phenylmethylsulfonyl fluoride, ethylmaleimide, pepstatin A, copper sulfate and oxamic acid prior to the purification steps.

Multiple references like WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, discloses a process for preparing erythropoietin in a serum free fermentation process (EPOsf). One

method to manufacture EPO as starting material for the pegylation is explained exemplary in the following.

5 **Biological Assay for Determining Specific Activity of EPO and EPO Conjugates**

10 The specific activity of EPO or EPO conjugates in accordance with this invention can be determined by various assays known in the art. The biological activity of the purified EPO proteins of this invention are such that administration of the EPO protein by injection to human patients results in bone marrow cells increasing production of reticulocytes and red blood cells compared to non-injected or control groups of subjects. The biological activity of the EPO proteins, or fragments thereof, obtained and purified in accordance with this invention can be tested by methods according to Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

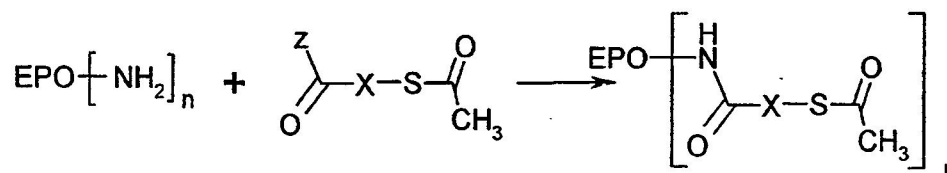
15 Another biological assay for determining the activity of EPO protein, the normocythaemic mouse assay, is described in Example 4.

20 **Processes for the Preparation of Pegylated EPO**

25 Processes for the preparation of erythropoietin glycoprotein products represented by Formula 1 comprise the covalent linking of thiol groups to EPO ("activation") and coupling the resulting activated EPO with a poly(ethylene glycol) (PEG) derivative. The first step for the preparation of pegylated EPO according to the present invention comprises covalent linking of thiol groups via NH_2 -groups of EPO. This activation of EPO is performed with bi-functional reagents which carry a protected thiol group and an additional reactive group, such as active esters (e.g., a succinimidylester), anhydrides, esters of sulphonic acids, halogenides of carboxylic acids and sulphonic acids, respectively. The thiol group is protected by groups known in the art, e.g., acetyl groups. These bi-functional reagents are able to react with the

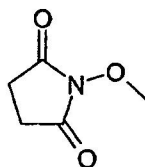
204
200

ϵ -amino groups of the lysine amino acids by forming an amide linkage. The first step of the reaction is set out below:



5

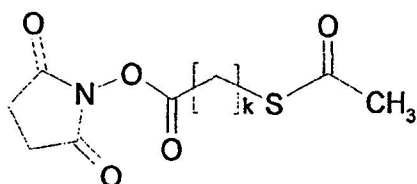
EPO, n and X are as defined above and Z is a reactive group known in the art, e.g. a N-hydroxy-succinimide (NHS) substituent of the formula



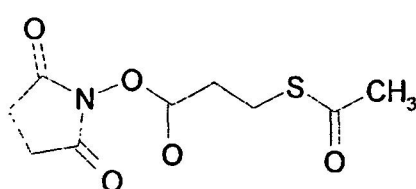
10

In a preferred embodiment the activation of the ϵ -amino lysine groups is performed by reaction with bi-functional reagents having a succinimidyl moiety. The bi-functional reagents may carry different spacer species, e.g. $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_k-$ moieties, wherein k is from 1 to about 10, preferably from 1 to about 4, and more preferably 1 or 2, and most preferably 1. Examples of these reagents are N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate (SATP) and N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA)

20

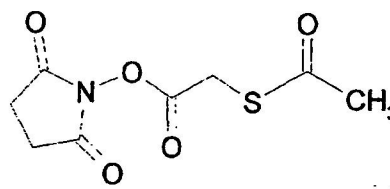


Acetylthioalkyl-carboxylic-NHS-ester, like

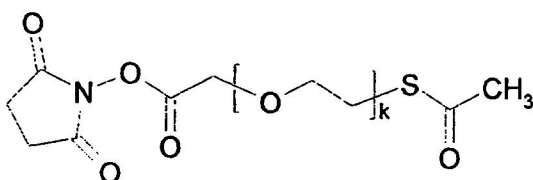


SATP

or



SATA



2-(Acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-ester

with k as defined above.

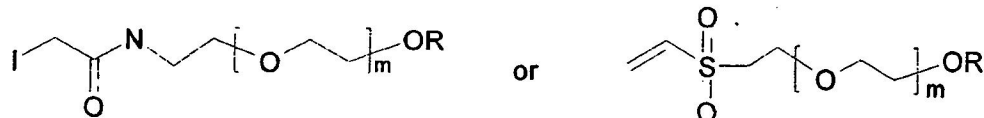
- 5 The preparation of the bi-functional reagents is known in the art. Precursors of 2-(acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-esters are described in DE-3924705, while the derivatization to the acetylthio compound is described by March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. SATA is commercially available (Molecular Probes, Eugene, OR, USA and Pierce, Rockford, IL).

The number of thiol groups to be added to an EPO molecule can be selected by adjusting the reaction parameters, i.e., the protein (EPO) concentration and the protein/bi-functional reagent ratio. Preferably, the EPO is activated by covalently linking from 1 to 5 thiol groups per EPO molecule, more preferably from 1.5 to 3 thiol groups per EPO molecule. These ranges refer to the statistical distribution of the thiol group over the EPO protein population.

The reaction is carried out, for example, in an aqueous buffer solution, pH 6.5–8.0, e.g., in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The bi-functional reagent may be added in DMSO. After completion of the reaction, preferably after 30 minutes, the reaction is stopped by addition of lysine. Excess bifunctional reagent may be separated by methods known in the art, e.g., by dialysis or column filtration. The average number of thiol groups added to EPO can be determined by photometric methods described in, for example, Grasetti, D.R. and Murray, J.F. in *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41 – 49 (1967).

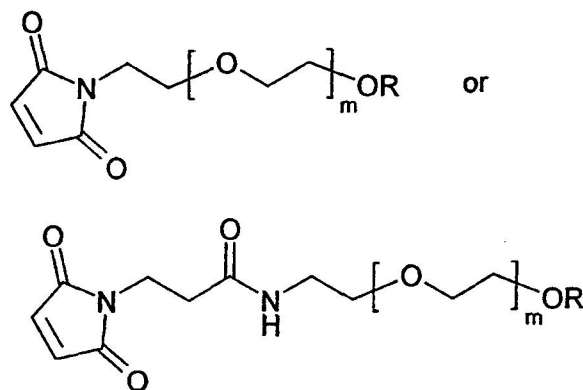
The above reaction is followed by covalent coupling of an activated polyethylene glycol (PEG) derivative. Suitable PEG derivatives are activated PEG molecules with an average molecular weight of from about 20 to about 40 kDa, more preferably from about 24 to about 35 kDa, and most preferably about 30 kDa.

Activated PEG derivatives are known in the art and are described in, for example, Morpurgo, M. et al. *J. Bioconj. Chem.* (1996) 7, page 363 ff for PEG-vinylsulfone. Linear chain and branched chain PEG species are suitable for the preparation of the compounds of Formula 1. Examples of reactive PEG reagents are iodo-acetyl-methoxy-PEG and methoxy-PEG-vinylsulfone:



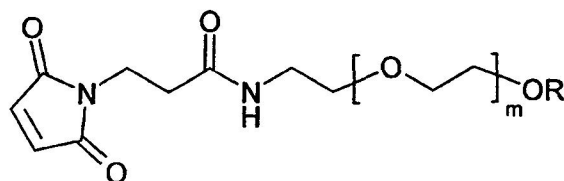
The use of these iodo-activated substances is known in the art and described e.g. by Hermanson, G. T. in *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148.

- 5 Most preferably, the PEG species are activated by maleimide using (alkoxy-PEG-maleimide), such as methoxy-PEG-maleimide (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.). The structure of alkoxy-PEG-maleimide is as follows:



with R and m are as defined above.

- 20 The most preferred derivative is



The coupling reaction with alkoxy-PEG-maleimide takes place after *in situ* cleavage of the thiol protecting group in an aqueous buffer solution, e.g. 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2. The cleavage of the protecting group may be performed,

for example, with hydroxylamine in DMSO at 25°C, pH 6.2 for about 90 minutes. For the PEG modification the molar ratio of activated EPO/alkoxy-PEG-maleimide should be from about 1:3 to about 1:6, and preferably 1:4. The reaction may be stopped by addition of cysteine and reaction of the remaining thiol (-SH) groups with N-methylmaleimide or other appropriate compounds capable of forming disulfide bonds. Because of the reaction of any remaining active thiol groups with a protecting group such as N-methylmaleimide or other suitable protecting group, the EPO glycoproteins in the conjugates of this invention may contain such protecting groups. Generally the procedure described herein will produce a mixture of molecules having varying numbers of thiols protected by different numbers of the protecting group, depending on the number of activated thiol groups on the glycoprotein that were not conjugated to PEG-maleimide.

Whereas N-methylmaleimide forms the same type of covalent bond when used to block the remaining thiol-groups on the pegylated protein, disulfide compounds will lead in an intermolecular sulfide/disulfide exchange reaction to a disulfide bridged coupling of the blocking reagent. Preferred blocking reagents for that type of blocking reaction are oxidized glutathione (GSSG), cysteine and cystamine. Whereas with cysteine no additional net charge is introduced into the pegylated protein, the use of the blocking reagents GSSG or cystamine results in an additional negative or positive charge.

The further purification of the compounds of Formula 1, including the separation of mono-, di- and tri-pegylated EPO species, may be done by methods known in the art, e.g., column chromatography.

249
205

Pharmaceutical Compositions

The erythropoietin glycoprotein products prepared in accordance with this invention may be prepared in pharmaceutical compositions suitable for injection with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle by methods known in the art.

Treating Blood Disorders Characterized by Low or Defective Red Blood Cell Production

Administration of the erythropoietin glycoprotein products of the present invention results in red blood cell formation in humans. Therefore, administration of the erythropoietin glycoprotein products replenishes this EPO protein which is important in the production of red blood cells. The pharmaceutical compositions containing the erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production, either alone or as part condition or disease. The pharmaceutical compositions may be administered by injection such as by subcutaneous or intravenous injection. Average quantities of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

Throughout this application, various publications have been referenced. The disclosures in these publications are incorporated herein by reference in order to describe more fully the state of the art.

The present invention is further illustrated by the following examples which are presented for purposes of demonstrating, but not limiting, the preparation of the compounds and compositions of this invention.

EXAMPLE 1

Fermentation And Purification Of Human EPO

5 a) Inoculum Preparation and Fermentation

One vial of the Working Cell Bank, originating from an EPO-producing CHO cell line (ATCC CRL8695, disclosed in EP 411 678 (Genetics Institute) can be used) is taken from the gas phase of the liquid nitrogen storage tank. The cells are transferred into glass spinner flasks and cultivated in a hydrogen carbonate-buffered medium in a humidified CO₂ incubator. Typical serum free media used for the inoculum preparation and fermentation are disclosed in European Patent Application 513 738, to Koch published 12 June 1992, or WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, for example contain as medium DMEM/F12 (e.g. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, order No. 57-736) and additionally sodium hydrogencarbonate, L+glutamine, D+glucose, recombinant insulin, sodium selenite, diaminobutane, hydrocortisone, iron(II) sulfate, asparagine, aspartic acid, serine and a stabilizer for mammalian cells such as e.g. polyvinyl alcohol, methyl cellulose, polydextran, polyethylene glycol, Pluronic F68, plasma expander polygelin (HEMACCEL[®]) or polyvinyl pyrrolidone (WO 96/35718).

20 The cultures are microscopically checked for the absence of contaminating microorganisms, and the cell densities are determined. These tests are performed at each splitting step.

25 After the initial growth period, the cell culture is diluted with fresh medium to the starting cell density and undergoes another growth cycle. This procedure is repeated until a culture volume of approximately 2 l per glass spinner flask has been obtained. After approx. 12 doublings 1 to 5 liter of this culture is available which then is used as inoculum for the 10 l inoculum fermenter.

2/11
202

After 3 - 5 days, the culture in the 10 l fermenter can be used as inoculum for the 100 l inoculum fermenter.

5 After additional 3 - 5 days of cultivation, the culture in the 100 l fermenter can be used as inoculum for the 1000 l production fermenter.

b) Harvesting and Cell Separation

10 A batch refeed process is used, i.e. when the desired cell density is reached, approx. 80 % of the culture is harvested. The remaining culture is replenished with fresh culture medium and cultivated until the next harvest. One production run consists of a maximum of 10 subsequent harvests: 9 partial harvests and 1 overall harvest at the end of fermentation. Harvesting takes place every 3 - 4 days.

15 The determined harvest volume is transferred into a cooled vessel. The cells are removed by centrifugation or filtration and discarded. The EPO containing supernatant of the centrifugation step is in-line filtered and collected in a second cooled vessel. Each harvest is processed separately during purification.

20 A typical process for the purification of EPO-protein is disclosed in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996. The purification process is explained exemplary in the following.

25 a) Blue Sepharose Chromatography

Blue Sepharose (Pharmacia) consists of Sepharose beads to the surface of which the Cibacron blue dye is covalently bound. Since EPO binds more strongly to Blue Sepharose than most non-proteinaceous contaminants, some proteinaceous impurities and PVA, EPO

242
208

can be enriched in this step. The elution of the Blue Sepharose column is performed by increasing the salt concentration as well as the pH.

5 The column is filled with 80 - 100 l of Blue Sepharose, regenerated with NaOH and equilibrated with equilibration buffer (sodium/ calcium chloride and sodium acetate). The acidified and filtered fermenter supernatant is loaded. After completion of the loading, the column is washed first with a buffer similar to the equilibration buffer containing a higher sodium chloride concentration and consecutively with a Tris-base buffer. The product is eluted with a Tris-base buffer and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

b) Butyl Toyopearl Chromatography

15 The Butyl Toyopearl 650 C (TosoHaas) is a polystyrene based matrix to which aliphatic butyl-residues are covalently coupled. Since EPO binds more strongly to this gel than most of the impurities and PVA, it has to be eluted with a buffer containing isopropanol.

20 The column is packed with 30 - 40 l of Butyl Toyopearl 650 C, regenerated with NaOH, washed with a Tris-base buffer and equilibrated with a Tris-base buffer containing isopropanol.

25 The Blue Sepharose eluate is adjusted to the concentration of isopropanol in the column equilibration buffer and loaded onto the column. Then the column is washed with equilibration buffer with increased isopropanol concentration. The product is eluted with elution buffer (Tris-base buffer with high isopropanol content) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

c) Hydroxyapatite Ultrogel Chromatography

5 The Hydroxyapatite Ultrogel (Biosepra) consists of hydroxyapatite which is incorporated in an agarose matrix to improve the mechanical properties. EPO has a low affinity to hydroxyapatite and can therefore be eluted at lower phosphate concentrations than protein impurities.

10 The column is filled with 30 - 40 l of Hydroxyapatite Ultrogel and regenerated with a potassium phosphate/ calcium chloride buffer and NaOH followed by a Tris-base buffer. Then it is equilibrated with a Tris-base buffer containing a low amount of isopropanol and sodium chloride.

15 The EPO containing eluate of the Butyl Toyopearl chromatography is loaded onto the column. Subsequently the column is washed with equilibration buffer and a Tris-base buffer without isopropanol and sodium chloride. The product is eluted with a Tris-base buffer containing a low concentration of potassium phosphate and collected in a single fraction in accordance with the master elutiogram.

d) Reversed Phase HPLC on Vydac C4

20

The RP-HPLC material Vydac C4 (Vydac) consists of silica gel particles, the surfaces of which carry C4-alkyl chains. The separation of EPO from the proteinaceous impurities is based on differences in the strength of hydrophobic interactions. Elution is performed with an acetonitrile gradient in diluted trifluoroacetic acid.

25

Preparative HPLC is performed using a stainless steel column (filled with 2.8 to 3.2 liter of Vydac C4 silicagel). The Hydroxyapatite Ultrogel eluate is acidified by adding trifluoroacetic acid and loaded onto the Vydac C4 column. For washing and elution an acetonitrile

BH
210

gradient in diluted trifluoroacetic acid is used. Fractions are collected and immediately neutralized with phosphate buffer. The EPO fractions which are within the IPC limits are pooled.

5 e) DEAE Sepharose Chromatography

10

The DEAE Sepharose (Pharmacia) material consists of diethylaminoethyl (DEAE) - groups which are covalently bound to the surface of Sepharose beads. The binding of EPO to the DEAE groups is mediated by ionic interactions. Acetonitrile and trifluoroacetic acid pass through the column without being retained. After these substances have been washed off, trace impurities are removed by washing the column with acetate buffer at a low pH. Then the column is washed with neutral phosphate buffer and EPO is eluted with a buffer with increased ionic strength.

15

The column is packed with DEAE Sepharose fast flow. The column volume is adjusted to assure an EPO load in the range of 3 - 10 mg EPO/ml gel. The column is washed with water and equilibration buffer (sodium/ potassium phosphate). The pooled fractions of the HPLC eluate are loaded and the column is washed with equilibration buffer. Then the column is washed with washing buffer (sodium acetate buffer) followed by washing with equilibration buffer. Subsequently, EPO is eluted from the column with elution buffer (sodium chloride, sodium/ potassium phosphate) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

20

The eluate of the DEAE Sepharose column is adjusted to the specified conductivity. The resulting drug substance is sterile filtered into Teflon bottles and stored at -70 °C.

25

245
211

EXAMPLE 2

Covalent Linking of thiol groups to EPO

5 This example discloses the determination of reaction conditions for the covalent linking of thiol groups to EPO. To determine the conditions, different amounts of a reagent containing a blocked thiol group, here SATA or SATP (dissolved in DMSO ad 10 mg/ml) were added to the EPO solution, here to 1 ml of 5 mg/ml EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The reaction was stirred for about 30 minutes (25°C) and
10 stopped by addition of 1 M lysine solution at 10 mM. Excess amounts of SATA and SATP were removed by dialysis against 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl and 2 mM EDTA, pH 6.2. After removal of the protecting acetyl group with hydroxylamine, the number of thiol groups covalently linked to EPO was determined photometrically with dithiodipyridine according to the method described by Grasetti, D.R. and Murray, J. F. in J.
15 Appl. Biochem. Biotechnol. 119, page 41-49 (1967).

The number of thiol groups covalently linked per EPO molecule is shown below.

Molar ratio EPO : SATA or SATP	Mol thiol groups / mol EPO
EPO : SATA = 1 : 3	1,5
EPO : SATA = 1 : 5	2.4
EPO : SATA = 1 : 6	3.2
EPO : SATP = 1 : 3	1.3
EPO : SATP = 1 : 4	2.5
EPO : SATP = 1 : 6	3.7

EXAMPLE 3

Modification of activated EPO with methoxy-PEG-maleimide

5

A) Activation of EPO:

100 mg EPO produced according to Example 1 (190,000 IU/ mg as determined by the normocythaemic mouse assay) were activated with SATA (molar ratio: EPO/SATA = 1/5) according to Example 2. The resulting EPO ("activated EPO") carrying covalently linked blocked thiol groups was separated from by-products like N-hydroxy-succinimide or non-reacted SATA by dialysis as described in Example 1. A solution of 4.5 mg/ml activated EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2 was obtained.

B) Pegylation of activated EPO:

380 mg methoxy-PEG-maleimide having the "most preferred" structure illustrated above (MW 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, USA)) was dissolved in the above solution containing 95 mg activated EPO (4.5 mg/ml in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2). The resulting molar ratio between activated EPO and methoxy-PEG-maleimide in the solution was 1 : 4. By addition of 1 M aqueous hydroxylamine solution ad 30 mM, pH 6.2 to the above solution the covalently linked blocked thiol groups of activated EPO were de-blocked. The resulting activated EPO in the reaction mixture of the solution contained free thiol (-SH) groups. De-blocking of the thiol groups was followed immediately by the coupling reaction between the activated EPO now containing free thiol (-SH) groups and methoxy-PEG-maleimide for 90 minutes (stirring, 25°C). The coupling reaction was stopped by addition of 0.2 M aqueous cysteine solution ad 2 mM to the reaction mixture. After 30 minutes excess free thiol groups of the activated EPO which did not react with methoxy-PEG-maleimide were blocked by addition of a 0.5 M N-methylmaleimide solution in DMSO to reach a concentration of 5 mM. After 30 minutes the

2/7
213

resulting reaction mixture now containing pegylated EPO species was dialyzed against 10 mM potassium phosphate, pH 7.5 for ≥ 15 hours.

C) Purification of pegylated EPO species:

- 5 For separation of the pegylated EPO species from the reaction mixture, the following purification process was performed: A 50 ml Q-Sepharose ff column was equilibrated with 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. The reaction mixture obtained in step B) was loaded onto the column (flow rate: 3 column volumes (CV) per hour). In order to separate non-reacted methoxy-PEG-maleimide reagent, the column was washed with 5 CV's of 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. Pegylated EPO species were separated by elution with an increasing salt gradient consisting of 5 CV's buffer A (10 mM potassium phosphate, pH 7.5) and 5 CV's buffer B (10 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5) with a flow rate of 3 CV per hour. Based on the NaCl gradient, the pegylated EPO species (tri-, bi- and mono-pegylated EPO species) were eluted first, followed by the non-pegylated EPO species. The fraction of the eluate containing the pegylated EPO species (tri-, di- and mono-pegylated EPO species) was pooled and filtered (sterile filtration with a 0.2 μ m filter).

Content and purity of tri-, di- and mono-pegylated EPO species were evaluated on Coomassie-stained SDS-PAA gels (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)) while protein concentrations were measured at 280 nm according the Beer-Lambert law. The apparent molecular weights of the EPO species determined by SDS-PAA electrophoresis were about 68 kDa (mono-pegylated EPO species), about 98 kDa (di-pegylated EPO species), and about 128 kDa (tri-pegylated EPO species).

- 25 Further separation of the tri-, di and mono-pegylated EPO species can be achieved by chromatography, e.g. by size exclusion chromatography (Superdex, pg 200; Pharmacia).

The determination of in-vivo biological activity of the eluate containing tri- di- and mono-pegylated species was performed by the method described in Example 4.

5

EXAMPLE 4

In-vivo activity of pegylated EPO determined by the normocythaemic mouse assay

10

The normocythaemic mouse bioassay is known in the art (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) and a method in the monography of erythropoietin of Ph. Eur. BRP. The samples are diluted with BSA-PBS. Normal healthy mice, 7-15 weeks old, are administered s.c. 0.2 ml of the EPO-fraction containing tri-, di- and mono-pegylated EPO as described in Example 2. Over a period of 4 days starting 72 hours after the administration, blood is drawn by puncture of the tail vein and diluted such that 1 μ l of blood is present in 1 ml of an 0.15 μ mol acridine orange staining solution. The staining time is 3 to 10 minutes. The reticulocyte counts are carried out microfluorometrically in a flow cytometer by analysis of the red fluorescence histogram. The reticulocyte counts are given in terms of absolute figures (per 30,000 blood cells analyzed). For the data presented, each group consisted of 5 mice per day, and the mice were bled only once.

20

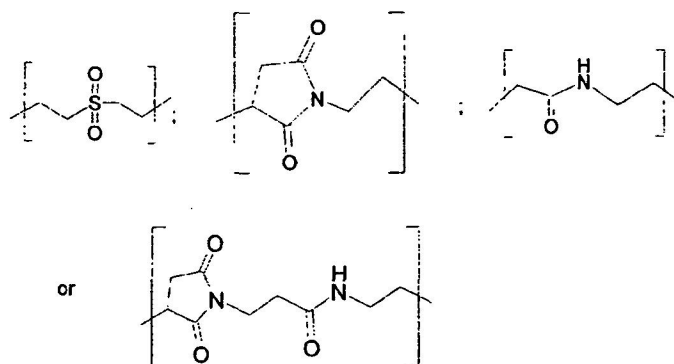
25

Methoxy-PEG-maleimide coupled to EPO according to Example 3, unmodified EPO and buffer solution were administered to mice. The results are shown in Figure 3. The results show the superior activity and the prolonged half life of the pegylated EPO species indicated by the significantly increased amounts of reticulocytes and the shift of the reticulocytes count maximum using the same dose per mouse.

219
215

What is claimed is:

1. A conjugate, said conjugate comprising an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites or by the rearrangement of at least one glycosylation site; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein via a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the C(O) of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is



- the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

2. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein is a human erythropoietin protein.

3. The conjugate of claim 2, wherein the erythropoietin glycoprotein has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

4. The conjugate of claim 3, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

5

5. The conjugate of claim 3, wherein k is from 1 to 4.

6. The conjugate of claim 3, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

10

7. The conjugate of claim 6, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

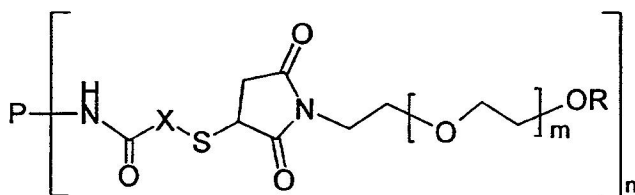
15

8. The conjugate of claim 3, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

9. The conjugate of claim 3, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

20

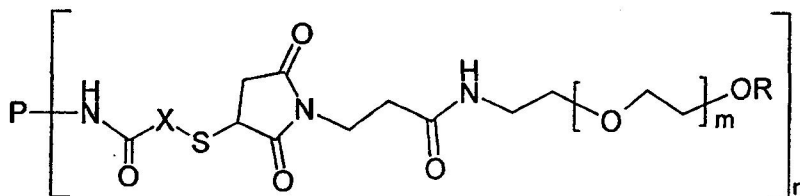
10. The conjugate of claim 3, of the formula:



217

wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

- 5 11. The conjugate of claim 10, wherein X is $-CH_2-$.
12. The conjugate of claim 10, wherein m is an integer from 550 to 800.
13. The conjugate of claim 12, wherein m is an integer from 650 to 700.
- 10 14. The conjugate of claim 10, wherein n is 1.
- 15 15. The conjugate of claim 10, wherein R is methyl.
16. The conjugate of claim 10, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.
17. The conjugate of claim 3, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

218

18. The conjugate of claim 17, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

19. The conjugate of claim 17, wherein m is an integer from 550 to 800.

5 20. The conjugate of claim 19, wherein m is an integer from 650 to 700.

21. The conjugate of claim 17, wherein R is methyl.

22. The conjugate of claim 17, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

10 2.

23. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein has the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites.

15 24. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has a sequence selected from the group consisting of:

Asn³⁰Thr³² Figure 1;

Asn⁵¹Thr⁵³ Figure 1,

20 Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

25 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

5 Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figure 1;

Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figure 1;

Thr¹²⁵ Figure 1; and

Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

10 25. The conjugate of claim 24, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

26. The conjugate of claim 24, wherein k is from 1 to 4.

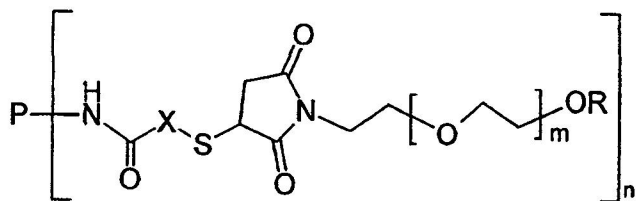
15 27. The conjugate of claim 24, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

28. The conjugate of claim 27, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

20 29. The conjugate of claim 24, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

30. The conjugate of claim 24, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

25 31. The conjugate of claim 24, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

32. The conjugate of claim 31, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

33. The conjugate of claim 31, wherein m is an integer from 550 to 800.

34. The conjugate of claim 33, wherein m is an integer from 650 to 700.

35. The conjugate of claim 31, wherein n is 1.

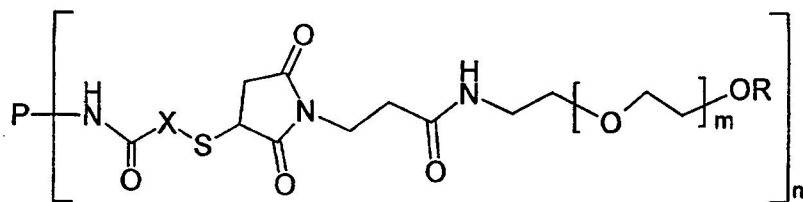
36. The conjugate of claim 31, wherein R is methyl.

37. The conjugate of claim 31, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

38. The conjugate of claim 24, of the formula:

221



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

39. The conjugate of claim 38, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

40. The conjugate of claim 38, wherein m is an integer from 550 to 800.

41. The conjugate of claim 40, wherein m is an integer from 650 to 700.

42. The conjugate of claim 38, wherein R is methyl.

43. The conjugate of claim 38, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

44. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has a sequence comprising the sequence of human erythropoietin and a second sequence at the carboxy terminus of the human erythropoietin sequence, wherein the second sequence contains at least one glycosylation site.

45. The conjugate of claim 44, wherein the second sequences comprises a sequence derived from the carboxy terminal sequence of human chorionic gonadotropin.

770
222

46. The conjugate of claim 45, wherein the glycoprotein has a sequence selected from the group consisting of:

- (a) the sequence of human erythropoietin and the 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 at the carboxy terminus of the human erythropoietin sequence;
- (b) the sequence in (a) modified by Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; and
- (c) the sequence in (a) modified by Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

47. The conjugate of claim 46, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

48. The conjugate of claim 46, wherein k is from 1 to 4.

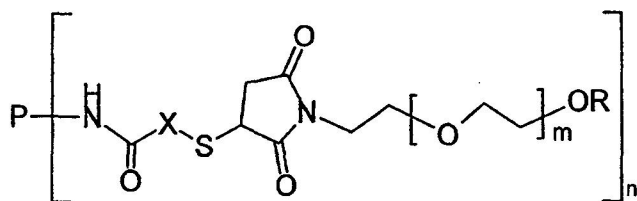
49. The conjugate of claim 46, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

50. The conjugate of claim 49, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

51. The conjugate of claim 46, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

52. The conjugate of claim 46, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

53. The conjugate of claim 46, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X .

54. The conjugate of claim 53, wherein X is $-CH_2-$.

55. The conjugate of claim 53, wherein m is an integer from 550 to 800.

56. The conjugate of claim 55, wherein m is an integer from 650 to 700.

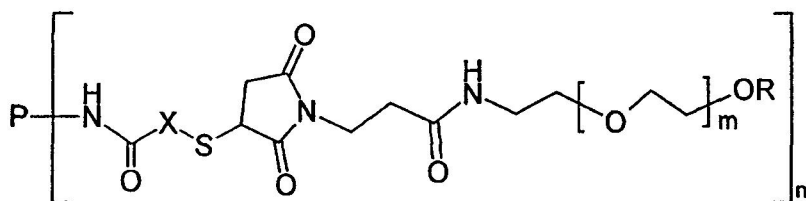
57. The conjugate of claim 53, wherein n is 1.

58. The conjugate of claim 53, wherein R is methyl.

59. The conjugate of claim 53, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

60. The conjugate of claim 46, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

61. The conjugate of claim 60, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

62. The conjugate of claim 60, wherein m is an integer from 550 to 800.

63. The conjugate of claim 62, wherein m is an integer from 650 to 700.

64. The conjugate of claim 60, wherein R is methyl.

65. The conjugate of claim 60, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

66. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has the sequence of human erythropoietin modified by a rearrangement of at least one glycosylation site.

67. The conjugate of claim 66, wherein the rearrangement comprises deletion of any of the N-linked glycosylation sites in human erythropoietin and addition of an N-linked glycosylation site at position 88 of the sequence of human erythropoietin.

225

68. The conjugate of claim 67, wherein the glycoprotein has the sequence of human erythropoietin modified by a modification selected from the group consisting of:

Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;

Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; and

5 Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

69. The conjugate of claim 68, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

70. The conjugate of claim 68, wherein k is from 1 to 4.

10 71. The conjugate of claim 68, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

15 72. The conjugate of claim 71, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

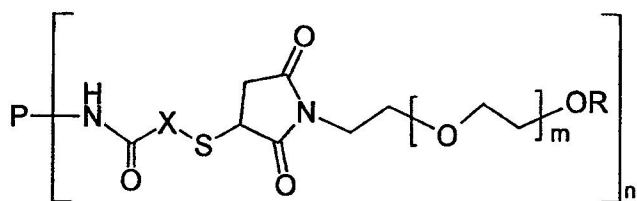
73. The conjugate of claim 68, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

20 74. The conjugate of claim 68, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

75. The conjugate of claim 68, of the formula:

25

270
226



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

76. The conjugate of claim 75, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

77. The conjugate of claim 75, wherein m is an integer from 550 to 800.

78. The conjugate of claim 77, wherein m is an integer from 650 to 700.

79. The conjugate of claim 75, wherein n is 1.

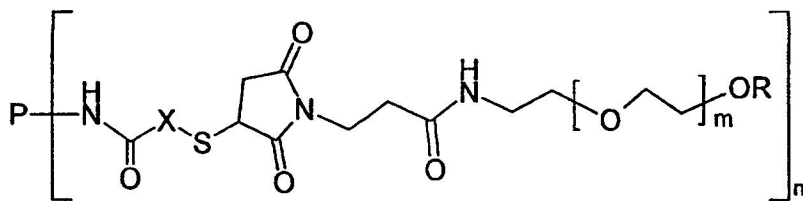
80. The conjugate of claim 75, wherein R is methyl.

81. The conjugate of claim 75, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

82. The conjugate of claim 68, of the formula:

227



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

83. The conjugate of claim 82, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

84. The conjugate of claim 82, wherein m is an integer from 550 to 800.

85. The conjugate of claim 84, wherein m is an integer from 650 to 700.

86. The conjugate of claim 82, wherein R is methyl.

87. The conjugate of claim 82, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

272
223

ABSTRACT

Erythropoietin glycoprotein products are disclosed which have the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells. The present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time, decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. In addition, compared with conventional PEG-EPO conjugates, the conjugates of this invention have superior clinical properties. The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a human employing the novel erythropoietin glycoprotein products as well as a method for preparing the erythropoietin glycoprotein products.

86935

229

FIGURE 1

5

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰

10

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰

Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰

15

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰

20

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰

Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

25

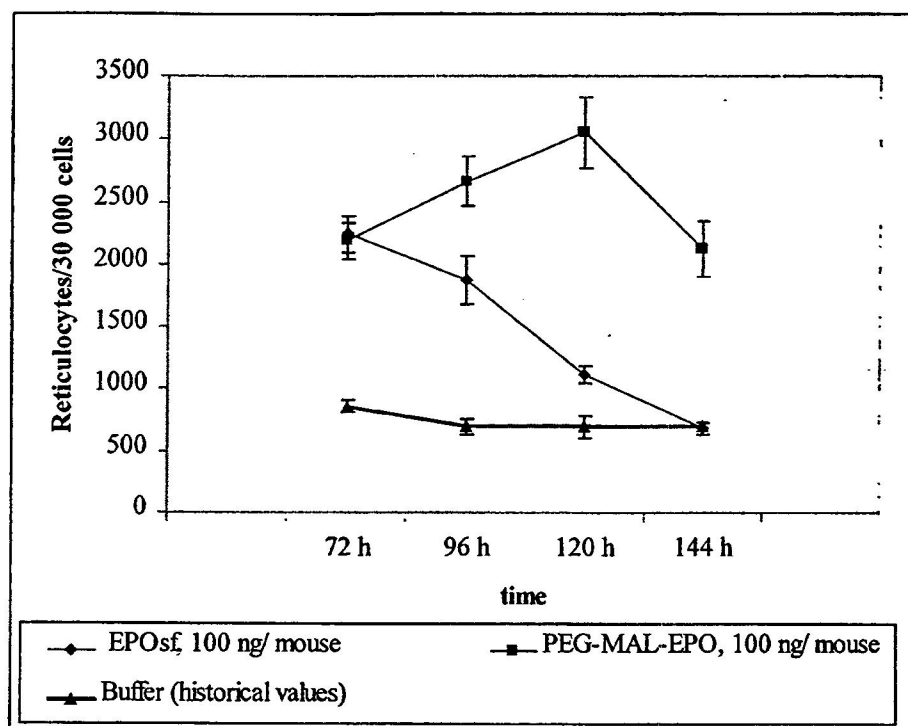
234
230

FIGURE 2

5 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
10 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
15 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
20 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

231

FIGURE 3



232

Declaration and Power of Attorney for Patent Application

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name,

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

the specification of which

(check one)

☒ is attached hereto.

☐ was filed on _____ as

Application Serial No. _____

and was amended on _____
(if applicable)

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or § 365(b) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate, or § 365(a) of any PCT International application which designated at least one country other than the United States, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent or inventor's certificate, or PCT International application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

Priority Claimed

_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)	_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)
----------------------------	------------------------	----------------------------	------------------------

233

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s), or § 365(c) of any PCT international application designating the United States, listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

(Application Serial No.)

(Filing Date)

(Status) (patented, pending, abandoned)

(Application Serial No.)

(Filing Date)

(Status) (patented, pending, abandoned)

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

POWER OF ATTORNEY: As a named inventor, I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. (list name and registration number)

George W. Johnston (Reg. No. 28090)

Dennis P. Tramaloni (Reg. No. 28542)

William H. Epstein (Reg. No. 20008)

Patricia S. Rocha-Tramaloni (Reg. No. 31054)

Lewis J. Kreisler (Reg. No. 38522)

John P. Parise (Reg. No. 34403)

Briana C. Buchholz (Reg. No. 39123)

Send Correspondence to:

George W. Johnston, Esq., Hoffmann-La Roche Inc., 340 Kingsland Street,

Nutley, New Jersey 07110-1199

Direct Telephone Calls to: (name and telephone number)

Lewis J. Kreisler (973) 235-4387

Josef Burg

Full name of sole or first inventor

Inventor's signature

Date

Weilheim, Germany

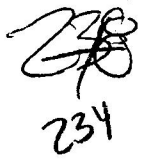
Residence

Germany

Citizenship

An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany

Post Office Address


Bernd Hilger

Full name of second joint inventor, if any

Second Inventor's signature

Date

Penzberg, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Post Office Address

Hans-Peter Josel

Full name of third joint inventor, if any

Third Inventor's signature

Date

Weilheim, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

Post Office Address

Full name of fourth joint inventor, if any

Fourth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

279
235

Full name of fifth joint inventor, if any

Fifth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56, duty to disclose information material to patentability provides, in part, that each individual associated with the filing and prosecution of a patent application has a duty of candor and good faith in dealing with the Office, which includes a duty to disclose to the Office all information known to that individual to be material to patentability as defined in this section. The duty to disclose information exists with respect to each pending claim until the claim is cancelled or withdrawn from consideration, or the application becomes abandoned.

Under this section, information is material to patentability when it is not cumulative to information already of record or being made of record in the application, and

- (1) It establishes, by itself or in combination with other information, a prima facie case of unpatentability of a claim; or
- (2) It refutes, or is inconsistent with, a position the applicant takes in:
 - (i) Opposing an argument of unpatentability relied on by the Office, or
 - (ii) Asserting an argument of patentability.

Junio 18, 2000
Traducción Oficial No.0276
REF:F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Patente No.60/151,454

F. Hoffmann
Caso-20426

241
236

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES

Abril 10,2000

Por medio del presente documento se certifica que adjunta se encuentra una fiel copia de los registros de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, correspondientes a los documentos para la solicitud tal como se presentaron, con el fin de asignarle una fecha de registro bajo la norma del código 35 USC 111.

Número de Solicitud:60/151,454

Fecha de Registro:Agosto 30, 1999

Autorizado por:

Firma: T. LAWRENCE

Funcionario Encargado de Certificaciones

Hay sello realzado de la Oficina de Marcas y Patentes de color dorado.

Eduardo Calandino

242
237

CERTIFICACION BAJO EL CODIGO 37

Codigo de Regulaciones federales 1.10

Yo por medio del presente documento certifico que éste ha sido enviado por Correo Postal - "CORREO POSTAL AL DESTINATARIO" de los Estados Unidos el 30 de Agosto de 1999, en un sobre rotulado como correo certificado al destinatario", número de registro de envío EL267098571US dirigido al "Assistant Commissioner of Patents de Washington, DC., 20231.

Nombre del depositante: PAMELA JOHNSTON

Firma: PAMELA JOHNSTON

HOJA DE SOLICITUD PROVISIONAL PARA PATENTE

Esta es una petición para registrar una SOLICITUD PROVISIONAL bajo el código 37 CFR § 1.53 (b)(2):

Número de Caso: 1098P3

INVENTORES / SOLICITANTES

NOMBRE: Burg, Josef

RESIDENCIA: Weilheim, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: An der Barenmühle 1, 82362

Weilheim, Alemania

Edwards Paludo

243
238

NOMBRE:Hilger, Bernd

RESIDENCIA:Penzberg, Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Am Katzenbuckel 21, 82377

Penzberg, Alemania

NOMBRE:Josel, Hans-Peter

RESIDENCIA:Weilheim,Alemania

CIUDADANIA: Alemania

OFICINA CORREO POSTAL: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim,

Alemania

[] Los inventores adicionales se mencionaran en una hoja adjunta a la presente.

TITULO DE LA INVENCION

CONJUGADOS DE ERYTHROPOIETIN

DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA

Edwards Calado

George W. Jonhston
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110

PARTES DE LA SOLICITUD INCLUIDAS

(Verificar que todas apliquen)

☒ [X]	ESPECIFICACIONES	☐ [31]	Número de Páginas
☒ [x]	REIVINDICACIONES		No. de Reivindicaciones 88 (13 páginas)
☐ []	LISTADO DE SECUENCIA	☐ []	Número de Páginas
☒ [x]	DECLARACIÓN	☐ [4]	Número de Páginas (no firmadas)
☒ [x]	GRAFICA (S)	☐ [3]	Hojas de Gráficas
☒ [x]	Otros		<u>resumen (1 página)</u>

FORMA DE DE PAGO DE HONORARIOS PARA LA SOLICITUD PROVISIONAL DE ESTA PATENTE (Señalar uno)

☒ [x] El comisionado por la presente se encuentra autorizado a cobrar honorarios de registro y crédito al número de Cuenta Bancaria **08-2525**

Honorarios provisionales para registro = \$150.000

La invencion fué realizada por una agencia del Gobierno de los Estados Unidos bajo contrato con una agencia del Gobierno de los Estados Unidos

Eduardo Calado

245
240

☒ No

☐ Sí, el nombre de la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos y número de contrato son los siguientes:

Presentado atentamente,

FIRMA:Lewis J. Kreisler

No. de Registro:38522

Telefono: (973) 235-4387

Telefax: (973) 235-2363

Fecha:Julio 2, 1999

Eduardo Calado

248
241

☒ No

☐ Sí, el nombre de la Agencia del Gobierno de los Estados Unidos y número de contrato son los siguientes:

Presentado atentamente,

FIRMA: Lewis J. Kreisler

No. de Registro: 38522

Telefono: (973) 235-4387

Telefax: (973) 235-2363

Fecha: Agosto 30, 1999

Eduardo P. P. P.

siendo el promedio molecular de peso de cada parte de poli (etileno glicol) aproximadamente desde 20 kilodaltones hasta alrededor de 40 kilodaltones, y el peso molecular del conjugado es de aproximadamente 51 kilodaltones hasta alrededor de 175 kilodaltones.

2. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina es una proteína eritropoietina humana.

3. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 2, en el cual la proteína eritropoietina se presenta mediante la activación endógena de genes.

4. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 2, en el cual la proteína eritropoietina tiene una secuencia que está representada en la Gráfica 1 o la Gráfica 2.

5. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, en la cual X es $-(CH_2)_k-$.

Eduardo Calvo

6. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, en el cual k es desde 1 hasta 4.
7. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.
8. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 7, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.
9. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxí coronados de poli (etileno glicol).
10. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronados mediante el metoxi.
11. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, de la fórmula:

Edwardo Ceballos

21. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 20, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

22. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 18, en el cual R es metilo.

23. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 18, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

24. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína eritropoietina tiene una estructura primaria de la eritropoietina humana modificada mediante una adición aproximada desde 1 hasta 6 sitios de glicosilación.

25. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en el cual la glicoproteína tiene una secuencia seleccionada desde un grupo que consiste de :

Asn30 Thr32 Gráfica 1;

Asn51 Thr53 Gráfica 1;

Eduardo Calado

250
245

Asn57 Thr59 Gráfica 1;
Asn69 Gráfica 1;
Asn69 Thr71 Gráfica 1;
Ser68Asn69 Thr71 Gráfica 1;
Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
Ser87Asn88 Thr90 Gráfica 1;
Ser87 Asn88 Gly89 Thr90 Gráfica 1;
Ser87 Asn88 Thr90 Thr92 Gráfica 1;
Ser87 Asn88 Thr90 Ala162 Gráfica 1;
Asn69 Thr71 Ser87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
Asn30 Thr32 Val87 Asn88 Thr90 Gráfica 1;
Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;
Ser87 Asn89 Ile90 Thr91 Gráfica 1;
Asn136 Thr138 Gráfica 1;
Asn138 Thr140 Gráfica 1;
Thr125; Gráfica 1; y
Pro124 Thr125 Gráfica 1.

26. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, en el cual
es $-(CH_2)_k$.

Edwendo Calvo

27. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, en el cual k es desde 1 hasta 4.

28. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

29. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 28, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.

30. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxí coronados de poli (etileno glicol).

31. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

32. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, de la fórmula:

Eduardo Calvo

42. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 41, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

43. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 39, en el cual R es metilo.

44. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 39, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

45. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en la cual la secuencia de glicoproteína tiene una secuencia que consiste de una secuencia humana de eritropoietina y una segunda secuencia en el terminus de carboxi de la secuencia humana de eritropoietina en el cual la segunda secuencia contiene por lo menos un sitio de glicolización.

46. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 45, en el cual la segunda secuencia consiste de una secuencia derivada de la secuencia terminal de carboxi de la gonadotropina chorionica humana.

Edwardo Palacios

243

47. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 46, en la cual la glicoproteína tiene una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de:

(a) la secuencia de arthropoietina humana y las secuencias 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 en el terminus de carboxi de la secuencia de erithropoietina humana;

(b) la secuencia en (a) modificada mediante Ser87 Asn88 Thr90; y

(c) la secuencia en (a) modificada mediante Asn Thr32 Val87 Asn88 Thr90.

48. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, en el cual X es $-(CH_2)_k$.

49. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, en el cual k es desde 1 hasta 4.

50. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

Eduardo Calado

en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es $(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X .

55. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 54, en la cual X es $-CH_2-$,

56. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 54, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

57. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 56, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

58. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 54, en la cual n es 1.

59. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 54, en la cual R es metilo.

60. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 53, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

Edwardo Calado

25/5
250

65. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 61, en el cual R es metilo.

66. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 61, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 hasta la gráfica 2.

67. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 1, en la cual la glicoproteína tiene una secuencia de eritropoietina modificada mediante la reorganización de por lo menos un sitio de glicosilación.

68. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 67, en el cual la reorganización consta de la anulación de cualquier sitio de glicosilación de enlace N en eritropoietina humana y la adición del sitio de glicosilación con enlace - N en la posición 88 de la secuencia de eritropoietina humana.

69. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 68, en el cual la glicoproteína tiene una secuencia de eritropoietina humana modificada mediante una modificación seleccionada de un grupo que consiste de:

Gln 24 Ser87 Asn88 Thr90;

Eduardo Calado

~~251~~
251

Gln38 Ser87 Asn88 Thr90; y

Gln83 Ser87 Asn88 Thr90.

70. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, en el cual X es $-(CH_2)_k$.

71. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, en el cual k es desde 1 hasta 4.

72. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 24 kilodaltones hasta alrededor de 35 kilodaltones.

73. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 72, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.

74. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxí coronados de poli (etileno glicol).

Eduardo Calado

84. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 83, en el cual X es -CH₂-.

85. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 83, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

86. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 85, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

87. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 83, en el cual R es metilo.

88. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 83, en el cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

Eduardo Calado

253

Caso:No1098P3

DECLARACION Y PODER
PARA LA SOLICITUD DE PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

Yo en mi calidad de abajo mencionado inventor, por la presente
declaro:

Mi residencia, dirección de Oficina Postal y ciudadanía son mencionados a
continuación como también mi nombre.

Yo creo ser el único y primer inventor (si solo se encuentra un nombre en
la lista) o original, primero y co-inventor del tópico en cuestión, el cual se
reivindica pidiendo la solicitud de patente de invención con el titulo:

TITULO DE LA INVENCION (280 Caracteres máximo)

CONJUGADOS DE ERITHROPOIETINA

cuya especificaciones:

(Indique uno)

Eduardo Calado H.

☒ se encuentra adjunto.

254

[] Fue registrado en _____ como
No Serial de la Solicitud _____
y fue revisado en _____
(si aplica)

Yo por medio del presente documento declaro que he revisado y
entiendo el contenido de las especificaciones anteriormente
mencionadas, incluyendo las reivindicaciones.

Yo tengo conocimiento sobre mi obligación de revelar toda
información que sea parte del material patentable tal como lo define
el Artículo 37 C.F.R. §1.56.

Yo por la presente reivindico beneficios de prioridad bajo el Título
35, del Código de los Estados Unidos, Sección §119 (a) -(d) de
cualquiera de la solicitud(es) extranjera para patente (s) o
certificado como inventor o § 365 (a) de cualquier Solicitud para
Patente Internacional (PCT), para la cual se ha nombrado por lo
menos a un país además de los Estados Unidos, como es
anteriormente mencionado e identificado, Indicando con una
indicación en las cajillas , de cualquier solicitud extranjera para
Patente certificado como inventor, o solicitud Internacional PCT con
una fecha de registro anterior de aquella solicitud que aparece en la
cual se reivindica prioridad.

Eduardo Calado

260
255

Solicitudes extranjeras con una fecha de registro anterior (es)

Prioridades Reivindicadas

_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No
_____	_____	_____	[]	[]
(Nombre)	(País)	Día/Mes/año de registro	Si	No

Yo por medio de la presente reivindico los beneficios bajo 35 U.S.C. § 119 (e) sobre solicitudes anteriores de los Estados Unidos mencionadas a continuación:

_____	_____	_____	_____
(No Solicitud)	(Fecha de Registro)	(No Solicitud)	(Fecha de registro)

Yo por medio de la presente reivindico beneficios bajo el Código 35 USC § 120 de solicitud de Patente registrada en los Estados Unidos, o §365(c) de cualquier solicitud Internacional de patentes PCT en la manera requeridas tal como se menciona anteriormente y respecto al tópico en cuestión de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud la cual no se haya revelada con anterioridad en solicitudes anteriores en los Estados Unidos de acuerdo a lo establecido por el primer párrafo de la norma del Código 35CFR. § 112, tengo conocimiento de mi obligación de revelar toda información que se considere parte del material patentable a la Oficina de Marcas y Patentes tal como lo define la norma del Código 37 C.F.R. § 1.56

Edwards Calabro

256

cual se hizo efectiva entre las fechas de registro de la solicitud anterior y la fecha de registro Internacional PCT de esta solicitud.

(No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (estatus)(patentado,pendiente,
abandonado)

(No Serial Solicitud) (Fecha de Registro) (Estatus)(patentado,pendiente,
abandonado)

Yo, por la presente afirmo que toda declaración presentada es de mi entero conocimiento, fiel y verdadera y tengo presente que toda falsa declaración es castigada mediante una multa o el encarcelamiento, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos, y que cualquier declaración puede comprometer la validez de esta solicitud o de cualquier patente expedida inmediatamente después.

PODER :

Como Inventor, yo por la presente nombro al (los) siguiente(s)
abogados y /o representante (s) para procesar esta solicitud y llevar a

Edward Calzado

262
257

cabo toda transacción de negocios en la Oficina de Marcas y Patentes
relacionadas con la presente. (*listado de nombres y números de
registro*)

No. de Registro

GEORGE W. JOHNSTON	Reg No.	28090
WILLIAM H. EPSTEIN	Reg No.	20008
LEWIS J. KREISLER	Reg No.	38522
BRIANA C. BUCHHOLZ	Reg	399123
DENNIS P. TRAMALONI	Reg No.	28542
PATRICIA S. ROCHA-TRAMALONI	Reg No.	31054
JOHN P. PARISE	Reg No.	34403

ENVIAR LA CORRESPONDENCIA A:

George W, Johnston, Esq.

HOFFMANN LA ROCHE INC.,

350 KINGSLAND STREET

NUTLEY, NEW JERSEY 07110-1199

llamadas telefónicas: Lewis J. Kreisler (973) 253-4387

Nombre: JOSEF BURG

Residencia: Weilheim, Alemania

Eduardo Caland...

243
258

Ciudadanía:Alemana

Oficina Postal An der Barenmühle 1,82362 Weilheim, Alemania

Nombre:BERND HILGER

Residencia: Penzberg, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal: Am Kattzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Alemania

Nombre:Hans Peter Josel

Residencia: Weilheim, Alemania

Ciudadanía: Alemana

Oficina Postal:Pratenweg 7, 82362 Welheim, Alemania

De acuerdo al Título 37, del Código de Regulaciones Federales, § 1.56, tengo conocimiento sobre mi obligación de proteger y revelar información de material patentable el cual especifica que cada persona asociada con el registro y la continuación de la solicitud de patente tiene un deber de cumplimiento y buena fe en llevar a cabo todas las negociaciones con la Oficina de Patentes, la cual se debe proteger y revelar toda información de material patentable tal como lo define ésta sección. El deber de revelar toda información respecto a cada reivindicación pendiente hasta que la reivindicación sea anulada, reservada o la solicitud sea abandonada.

Eduardo Calzado

Bajo esta sección la información es material patentable hasta cuando no es cumulativo sobre información que aparezca en los registros o sean parte de los registros en la solicitud, y

- (1) Reconoce que por si sola o conjuntamente con otra información o pruebas suficientes de la patentabilidad de una reivindicación; o
- (2) Si refuta o es inconsistente con la posición de un solicitante:
 - (i) Oponerse a un argumento de no patentabilidad propuesto por la Oficina, o
 - (ii) Afirmación de un argumento sobre patentabilidad.

Eduardo Calado

265
260

GRÁFICA 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Gly Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Edwards Calado

~~261~~
261

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp
Thr Phe Arg Lys140

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp165

Eduardo Calado H

GRÁFICA 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg10 Val Leu Glu Arg Tyr Leu
Leu Glu Ala Lys20

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Gly Cys Ala30 Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
Ile Thr40

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala50 Trp Lys Arg Met Glu Val
Gly Gln Gln Ala60

Val Glu Val Trp Cln Cli Leu Ala Leu Leu70 Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
Gln Ala Leu80

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro90 Leu Gln Leu His Val Asp Lys
Ala Val Ser100

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg110 Ala Leu Glu Ala Gln Lys
Glu Ala Ile Ser120

Eduardo Calvo

263

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu130 Arg Thr Ile Thr Ala Asp
Thr Phe Arg Lys140

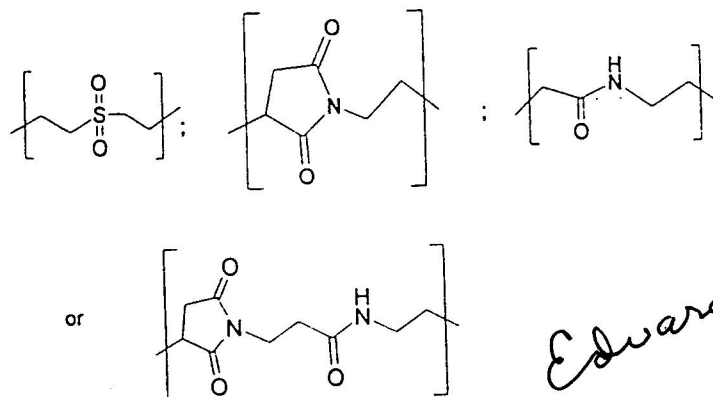
Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg150 Gly Lys Leu Lys Leu Tyr
Thr Gly Glu Ala160

Cys Arg Thr Cgy Asp166

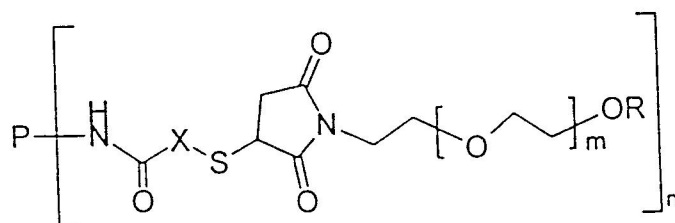
Edwards Calado

REIVINDICACIONES :

1. Un conjugado, dicho conjugado consta de glicoproteína eritropoietin el cual tiene por lo menos un grupo de amino ácidos, el cual tiene una actividad biológica *in vivo* la cual produce en las células en la médula del hueso un incremento en la producción de reticulocitos y célula y glóbulos rojos, seleccionados de un grupo que consiste de eritropoietinas y análogos del mismo los cuales tienen la secuencia primaria de estructura de eritropoietinas humana modificadas mediante la adición desde 1 hasta 6 sitios de glicosilaciones; encontrándose dicha glicoproteína covalentemente enlazada desde uno a tres grupo de bajo alcoxi poli (etileno glicol), cada grupo de poli (etileno glicol) encontrándose covalentemente enlazado a la glicoproteína vía un enlazador de la formula $-C(O)-X-S-Y$ con el $C(O)$ del eslabonamiento el cual forma un enlace de amida con uno de los mencionados grupos de aminos, X es $-(CH_2)_k-$ o $CH_2(O-CH_2-CH_2)-$, k es desde 1 hasta 10, Y es



Eduardo Calado



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

12. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 11, en la cual X es -CH₂-,

13. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 11, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

14. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 13, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

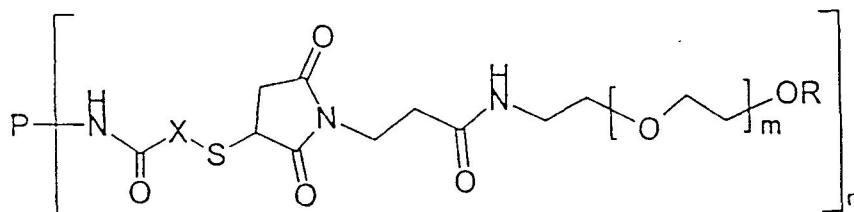
15. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 11, en la cual n es 1.

Eduardo Calado

16. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 11, en la cual R es metilo.

17. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 11, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

18. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 4, de la formula:

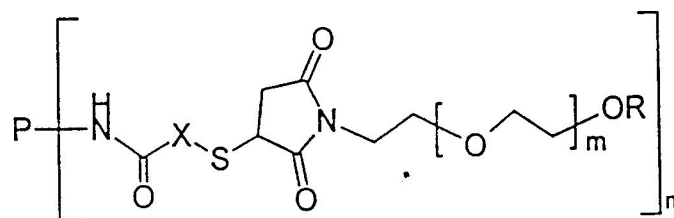


en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

19. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 18, en el cual X es -CH₂-.

20. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 18, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

Eduardo Caladash



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

33. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 32, en la cual X es -CH₂-,

34. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 32, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

35. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 34, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

36. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 32, en la cual n es 1.

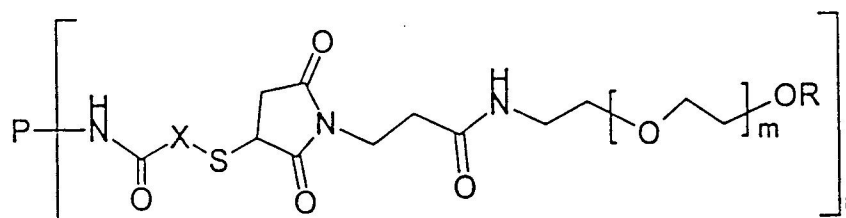
Edmundo Calado

273
268

37. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 32, en la cual R es metilo.

38. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 32, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

39. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 25, de acuerdo a la formula:



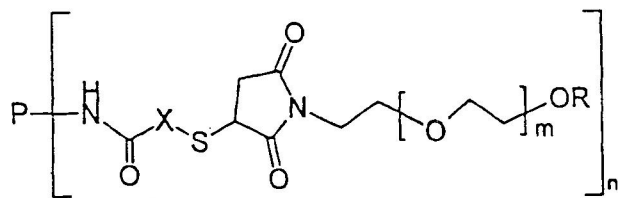
en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

40. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 39, en el cual X es -CH₂-.

41. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 39, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

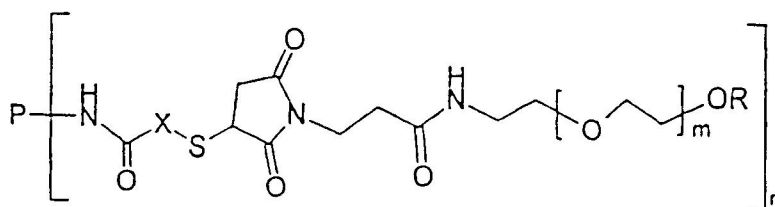
Eduardo Caladad

51. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 50, en el cual el promedio de peso molecular de cada parte de poli(etileno glicol) es aproximadamente de 30 kilodaltones.
52. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, en la cual la glicoproteína se encuentra enlazada covalentemente a uno o dos partes de bajo alcoxi coronador de poli (etileno glicol).
53. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.
54. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, de la formula:



Eduardo Caladash

61. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 47, de acuerdo a la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo o grupos de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

62. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 61, en el cual X es -CH₂-.

63. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 61, en el cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

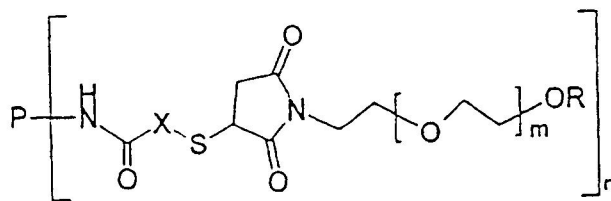
64. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 63, en el cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

Eduardo Calado

276
221

75. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, en la cual las partes de poli (etileno glicol) son coronadas mediante el metoxi.

76. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, de la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

77. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 76, en la cual X es -CH₂-,

78. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 76, en la cual m es un número entero desde 550 hasta 800.

Edwardo Calvado

277
272

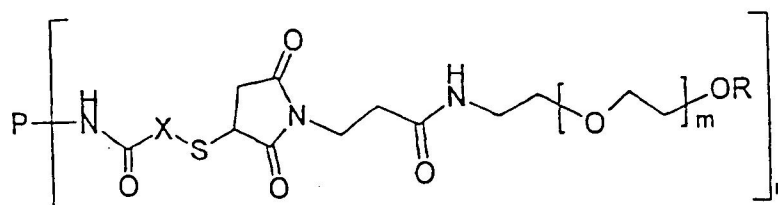
79. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 78, en la cual m es un número entero desde 650 hasta 700.

80. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 76, en la cual n es 1.

81. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 76, en la cual R es metilo.

82. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 76, en la cual P tiene una secuencia que se presenta en la gráfica 1 o la gráfica 2.

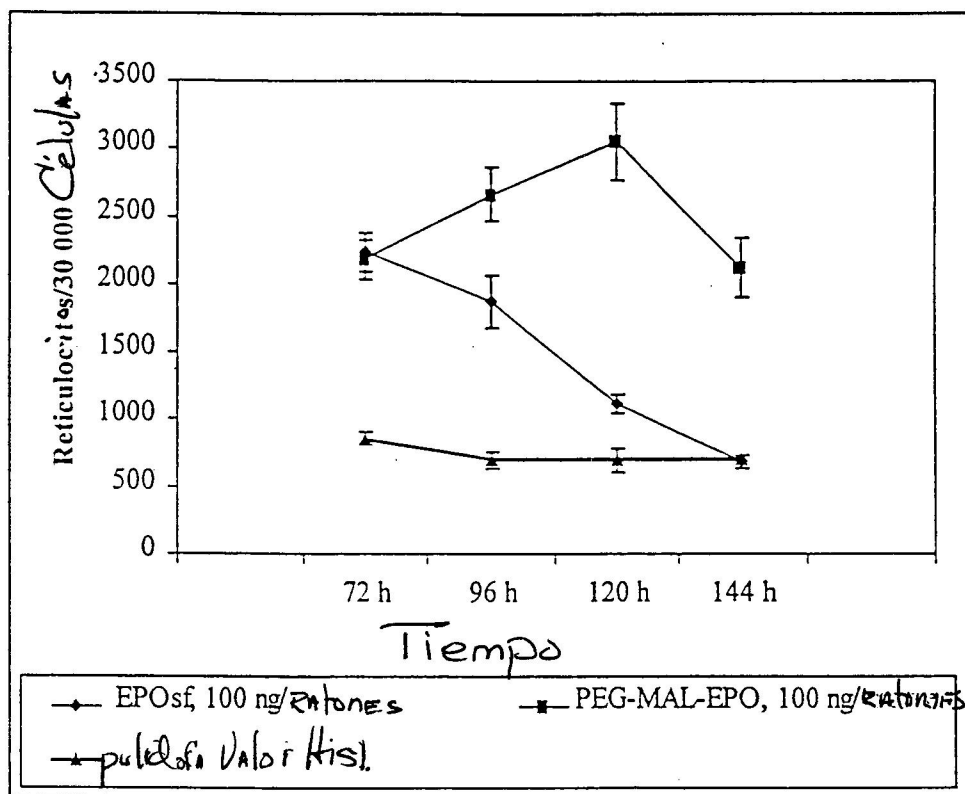
83. El conjugado de acuerdo a la reivindicación 69, de acuerdo a la formula:



en el cual n es un número entero del 1 al 3; m es un número entero desde 450 hasta 900; R es un bajo alquilo; X es (CH₂)^k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)^k-, y P es un residuo de glicoproteína eritropoietina sin el grupo de amino ácidos el cual forma un enlace de amida con X.

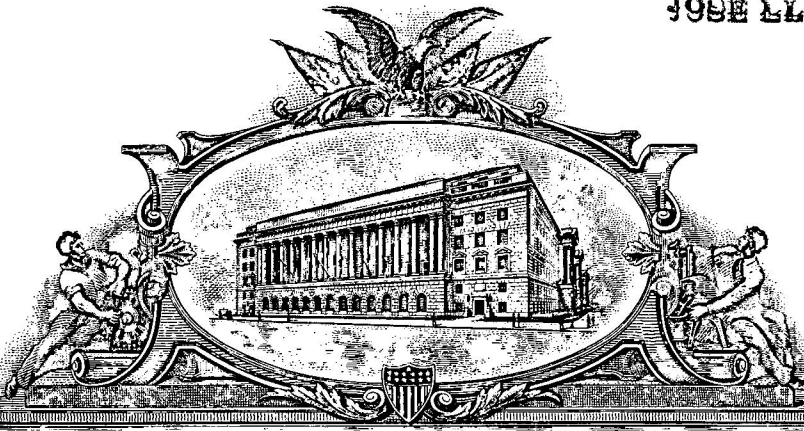
Edwardo Calvo

GRAFICA 3



1998 LLOREDA FAMILIAR & CO.
12 Route 136
20426
214

PA 232730



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 10, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/151,454

FILING DATE: August 30, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

A/prov ²⁰⁶
275
+
pro

JCS53 U.S. PRO
60/151454
00/30/99

Pamela Johnston
(Signature)

JC604 U.S. PTO
08/30/99

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53(b)(2).

Docket No. 1098P3

Name: Burg, Josef
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany

Name: Hilger, Bernd
Residence: Penzberg, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Name: Josel, Hans-Peter
Residence: Weilheim, Germany
Citizenship: Germany
Post Office Address: Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

[] Additional inventors are being named on sheets attached hereto

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

George W. Johnston
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110

☒ Specification	No. of Pages 31	☒ Declaration	No. of Pages 4 (unsigned)
☒ Claims	No. of Claims 88 (13 pages)	☒ Drawings	Sheets of Drawings 3
☐ Sequence Listing	No. of Pages	☒ Other	Abstract (1 page)

DEPOSIT ACCOUNT
NO. 08-2525
OUR ORDER NO. 2709

286
276

METHOD OF PAYMENT

☒ The Commissioner is hereby authorized to
charge any fees or credit any overpayment
to Deposit Account Number: 08-2525

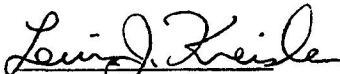
Provisional
Filing Fee
Amount \$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted,


Attorney of Record

Lewis J. Kreiser
(Reg. No. 38522)
Telephone: (973) 235-4387
Telefax: (973) 235-2363
Date: August 30, 1999

88Q10

000000-15115103

297
277

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

BACKGROUND OF THE INVENTION

Erythropoiesis is the production of red blood cells which occurs to offset cell destruction. Erythropoiesis is a controlled physiological mechanism that enables sufficient red blood cells to be available for proper tissue oxygenation. Naturally occurring human erythropoietin (hEPO) is a glycoprotein containing 165 amino acids that is produced in the kidney and is the humoral plasma factor which stimulates red blood cell production (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W and Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4). Human EPO stimulates the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. Human EPO exerts its biological activity by binding to receptors on erythroid precursors (Krantz, BS (1991) Blood 77: 419). Naturally occurring human erythropoietin is an acidic glycoprotein present in low concentrations in plasma to stimulate replacement of red blood cells which are lost through aging.

Erythropoietin has been manufactured biosynthetically using recombinant DNA technology (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224) and is the product of a cloned human EPO gene inserted into and expressed in the ovarian tissue cells of the chinese hamster (CHO cells). Naturally occurring human EPO is first translated to a 166 aa containing polypeptide chain with arginine 166. In a postranslational modification arginine 166 is cleaved by a carboxypeptidase. The primary structure of human EPO (165 aa) is illustrated in Figure 1. The primary structure of human EPO (166 aa) is illustrated in Figure 2. There are two disulfide bridges between Cys⁷-Cys¹⁶¹ and Cys²⁹-Cys³³. The

molecular weight of the polypeptide chain of human EPO without the sugar moieties is 18,236 Da. In the intact EPO molecule, approximately 40% of the molecular weight is accounted for by the carbohydrate groups (Sasaki,H, Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

Because erythropoietin is essential in red blood cell formation, the hormone is useful in the treatment of blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Clinically, EPO is used in the treatment of for example anemia in chronic renal failure patients (CRF) (Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin, RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) and in AIDS and cancer patients undergoing chemotherapy (Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker;1990: p. 301-324). However, the bioavailability of currently available protein therapeutics such as EPO is limited by their short plasma half-life and susceptibility to protease degradation. These shortcomings prevent them from attaining maximum clinical potency.

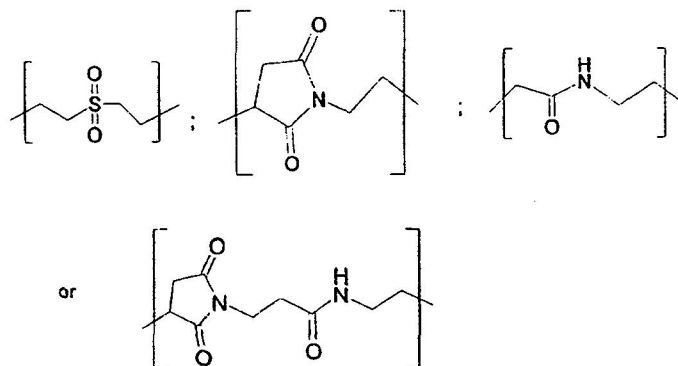
SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, the present invention is a new class of PEG derivatives of EPO. The physiologically active PEG-EPO conjugates of this invention comprise an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-

279

alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein *via* a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the C(O) of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is

5



the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

Compared to unmodified EPO (i.e., EPO without a PEG attached) and conventional PEG-EPO conjugates, the present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time, decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. The conjugates of this invention have the same uses as EPO. In particular, the conjugates of this invention are useful to treat patients by stimulating the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow in the same way EPO is used to treat patients.

The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a human.

285
280

The present invention also includes a method for preparing the erythropoietin glycoprotein products which comprises covalently reacting an ϵ -amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein with a bi-functional reagent to form an intermediate with an amide linkage. The bi-functional reagent contains a reactive group and a protected thiol group. The amide-linked intermediate is then covalently reacted with an activated polyethylene glycol derivative to form the erythropoietin glycoprotein product of the present invention.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Primary structure of human EPO (165 amino acids).

Figure 2: Primary structure of human EPO (166 amino acids)

Figure 3: In vivo activity of pegylated EPO determined by normocythaemic mouse assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

The following terms shall have the definitions set out below:

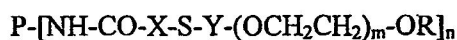
The term "erythropoietin protein", "erythropoietin", "EPO", or "erythropoietin glycoprotein" refers to a glycoprotein having the sequence shown in Figure 1 or 2, or a protein or polypeptide substantially homologous thereto, whose biological properties relate to the stimulation of red blood cell production and the stimulation of the division and differentiation of committed erythroid progenitors in the bone marrow. As used herein the term EPO protein includes such proteins modified deliberately, as for example, by site

287
232

species of mammals. An appropriate test which can be utilized to demonstrate such biological activity is described herein.

5 The term "therapeutically effective amount" is that amount of erythropoietin glycoprotein product necessary for the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells. The exact amount of erythropoietin glycoprotein product is a matter of preference subject to such factors as the exact type of condition being treated, the condition of the patient being treated, as well as the other ingredients in the composition. The pharmaceutical compositions containing the
10 erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production. Average therapeutically effective amounts of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

15 The present invention is directed to erythropoietin glycoprotein products having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells represented by Formula 1:



In Formula 1, P is an erythropoietin glycoprotein less the amino group or amino groups which form an amide linkage with X. As set out in detail below, the preparation and purification of EPO are well known in the art. By EPO is meant the natural or recombinant
25 protein, preferably human, as obtained from any conventional source such as tissues, protein synthesis, cell culture with natural or recombinant cells. Any protein having the activity of EPO, such as muteins or otherwise modified proteins, is encompassed. Recombinant EPO may be prepared via expression in CHO-, BHK- or HeLa cell lines, by recombinant DNA

~~283~~
283

5

10

15

20

75

289
234

Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

The human erythropoietin protein may also be an analog having at least one additional amino acid at the carboxy terminal end of the glycoprotein, wherein the additional amino acid includes at least one glycosylation site. The additional amino acid may comprise a peptide fragment derived from the carboxy terminal end of human chorionic gonadotropin. Preferably, the glycoprotein is an analog 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 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; and (c) the analog in (a) further comprising Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

The human erythropoietin protein may also be an analog having an amino acid sequence which includes a rearrangement of at least one site for glycosylation. The rearrangement may comprise 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. Preferably, the glycoprotein is an analog selected from the group consisting of Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; and Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

Erythropoietin analogs with additional glycosylation sites are disclosed in European Patent Publication No. 640 619, to Elliot, published March 1, 1995, the contents of which are incorporated herein by reference.

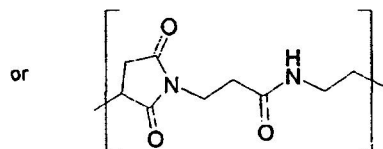
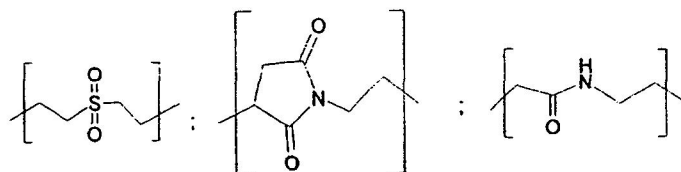
In Formula 1, R may be any lower alkyl, by which is meant a linear or branched alkyl group having from one to six carbon atoms such as methyl, ethyl, isopropyl, etc. A preferred alkyl is methyl.

290
285

In Formula 1, X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10. Preferably, k is from 1 to about 4, more preferably, k is 1 or 2. Most preferably, X is $-(CH_2)-$.

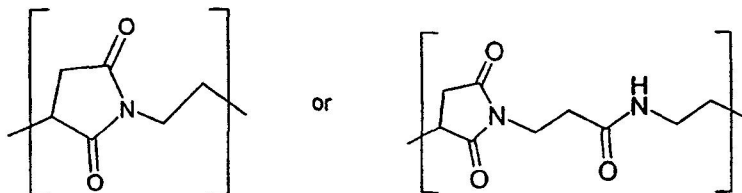
In Formula 1, Y is

5

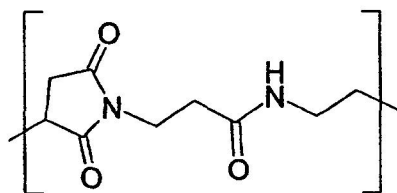


Preferably Y is

10



Most preferably, Y is



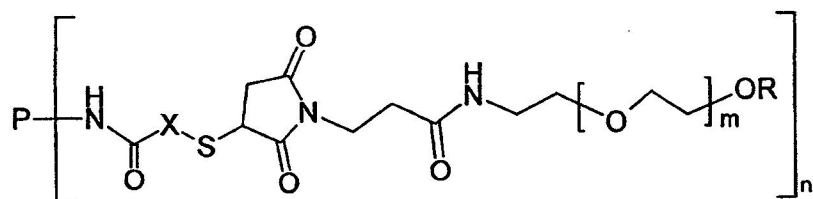
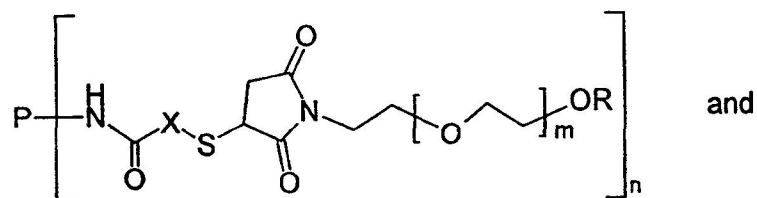
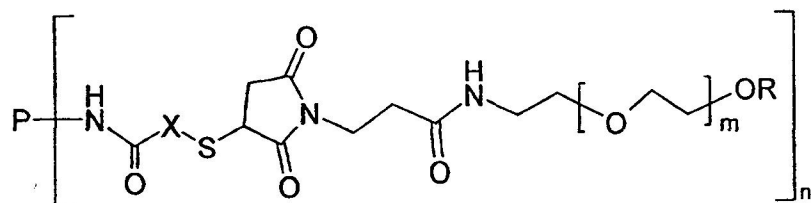
15

In Formula 1, the number m is selected such that the resulting conjugate of Formula 1 has a physiological activity comparable to unmodified EPO, which activity may represent the same as, more than, or a fraction of the corresponding activity of unmodified EPO. m represents the number of ethylene oxide residues in the PEG unit. A single PEG subunit of $-(OCH_2CH_2)-$ has a molecular weight of about 44 daltons. Thus, the molecular weight of the conjugate (excluding the molecular weight of the EPO) depends on the number m . A molecular weight of "about" a certain number means that it is within a reasonable range of that number as determined by conventional analytical techniques. m is an integer ranging from about 450 to about 900 (corresponding to a molecular weight of from 20 to 40 kDa), preferably m is from about 550 to about 800 (about 24 to 35 kDa), and most preferably m is from about 650 to about 700 (about 29 to about 31 kDa).

In Formula 1, the number n is the number of ϵ -amino groups of a lysine amino acid in an erythropoietin protein covalently bound to a PEG unit via an amide linkage. A conjugate of this invention may have one, two, or three PEG units per molecule of EPO. n is an integer ranging from 1 to 3, preferably n is 1 or 2, and more preferably n is 1.

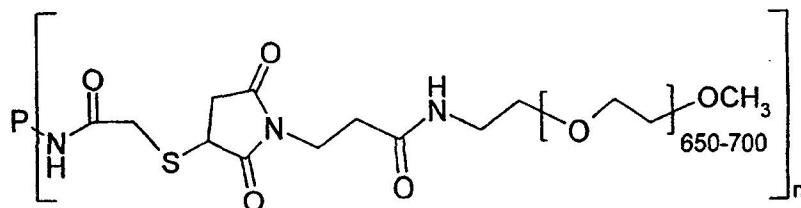
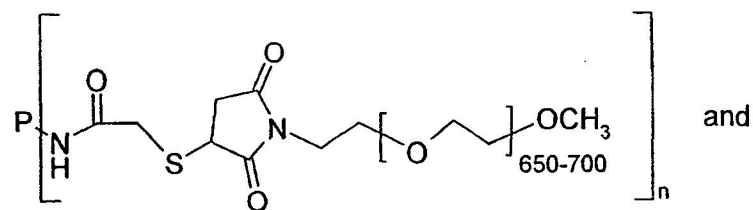
Preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:

282
237

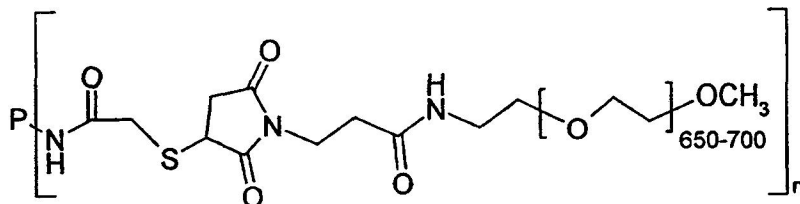


Most preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:

5 Other preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formulae:



More preferred erythropoietin glycoprotein products are represented by the formula:



5

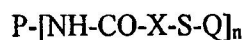
In another embodiment, the invention is directed to a method for the treatment of anemia in a human which comprises administering to a human a therapeutically effective amount of an erythropoietin glycoprotein product represented by Formula 1.

10

In still another embodiment, the invention is directed to a method for preparing an erythropoietin glycoprotein product, having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells, which comprises the steps of:

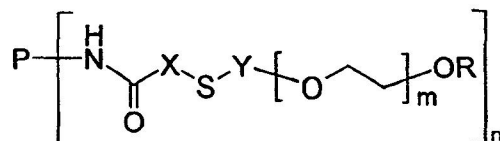
289
289

(a) covalently reacting an ε-amino group of a lysine amino acid of an erythropoietin protein represented by the formula, $P-[NH_2]_n$, with a bi-functional reagent represented by the formula, $Z-CO-X-S-Q$, to form an intermediate with an amide linkage represented by the formula:

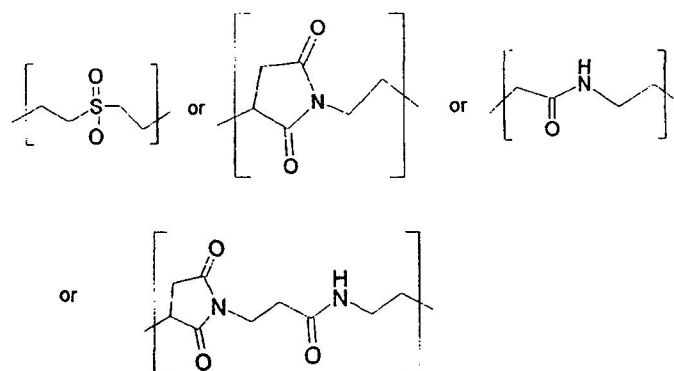


wherein P is an erythropoietin protein less the amino group which forms an amide linkage; n is an integer ranging from 1 to 3; Z is a reactive group, e.g. a carboxylic-NHS ester; X is $-(CH_2)_k-$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, wherein k is from 1 to about 10; and Q is a protecting group, like alkanoyl, e.g. acetyl:

(b) covalently reacting the intermediate with an amide linkage from step (a) with an activated polyethylene glycol derivative represented by the formula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, to form an erythropoietin glycoprotein product represented by the formula:



wherein W is a sulfhydryl reactive form of Y; m is an integer ranging from about 450 to about 900; R is lower alkyl; and Y is



In this embodiment, the bi-functional reagent is preferably N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate or N-succinimidyl-S-acetylthioacetate, Z is preferably N-hydroxy-succinimide, and the activated polyethylene glycol derivative W-[OCH₂CH₂]_m-OR is preferably selected from the group consisting of iodo-acetyl-methoxy-PEG, methoxy-PEG-vinylsulfone, and methoxy-PEG-maleimide.

Methods for Expressing EPO Proteins

Erythropoietin (EPO) is a human glycoprotein which stimulates the formation of erythrocytes. Its preparation and therapeutic application are described in detail for example in U.S. Patent Nos. 5,547,933 and 5,621,080, EP-B 0 148 605, Huang, S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 and EP-B 0 411 678 as well as Lai, P.H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, an Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. Erythropoietin for therapeutic use may be produced by recombinant means (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 and Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J. et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224). Expression of proteins, including EPO, by endogenous gene activation is well known in the art and is disclosed, for example in U.S. Patents Nos. 5,733,761, 5,641,670, and 5,733,746, and international patent publication Nos.

WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 and WO 91/09955, the contents of each of which are incorporated herein by reference.

5 Methods for the expression and preparation of erythropoietin in serum free medium are described for example in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, and in European Patent Publication No. 513 738, to Koch published 12 June 1992.

Methods for Purifying Human EPO Protein

10 In addition to the references mentioned above, it is known that a serum-free fermentation of recombinant CHO cells which contain an EPO gene can be carried out. Such methods are described for example in EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 and in a general form by Kawamoto, T. et al., Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, EP-A 0 248 656, Kowar, J. and Franek, F., Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271
15 (1981) 45-51, EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 88/00967.

20 In EP-A 0 267 678 an ion exchange chromatography on S-Sepharose, a preparative reverse phase HPLC on a Cg column and a gel filtration chromatography are described for the purification of EPO produced in serum-free culture after dialysis. In this connection the gel filtration chromatography step can be replaced by ion exchange chromatography on S-Sepharose fast flow. It is also proposed that a dye chromatography on a Blue Trisacryl column be carried out before the ion exchange chromatography.

25 A process for the purification of recombinant EPO is described by Nobuo, I. et al., J. Biochem. 107 (1990) 352-359. In this process EPO is treated however with a solution of Tween® 20, phenylmethylsulfonyl fluoride, ethylmaleimide, pepstatin A, copper sulfate and oxamic acid prior to the purification steps.

Multiple references like WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, discloses a process for preparing erythropoietin in a serum free fermentation process (EPOsf). One method to manufacture EPO as starting material for the pegylation is explained exemplary in the following.

5

Biological Assay for Determining Specific Activity of EPO and EPO Conjugates

The specific activity of EPO or EPO conjugates in accordance with this invention can be determined by various assays known in the art. The biological activity of the purified EPO proteins of this invention are such that administration of the EPO protein by injection to human patients results in bone marrow cells increasing production of reticulocytes and red blood cells compared to non-injected or control groups of subjects. The biological activity of the EPO proteins, or fragments thereof, obtained and purified in accordance with this invention can be tested by methods according to Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

10

15

Another biological assay for determining the activity of EPO protein, the normocythaemic mouse assay, is described in Example 4.

20

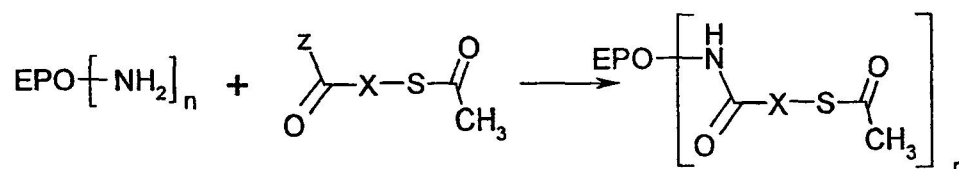
Processes for the Preparation of Pegylated EPO

Processes for the preparation of erythropoietin glycoprotein products represented by Formula 1 comprise the covalent linking of thiol groups to EPO ("activation") and coupling the resulting activated EPO with a poly(ethylene glycol) (PEG) derivative. The first step for the preparation of pegylated EPO according to the present invention comprises covalent linking of thiol groups via NH_2 -groups of EPO. This activation of EPO is performed with bi-functional reagents which carry a protected thiol group and an additional reactive group, such as active esters (e.g., a succinimidylester), anhydrides, esters of sulphonic acids, halogenides

25

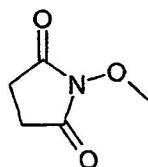
of carboxylic acids and sulphonic acids, respectively. The thiol group is protected by groups known in the art, e.g., acetyl groups. These bi-functional reagents are able to react with the ϵ -amino groups of the lysine amino acids by forming an amide linkage. The first step of the reaction is set out below:

5



EPO, n and X are as defined above and Z is a reactive group known in the art, e.g. a N-hydroxy-succinimide (NHS) substituent of the formula

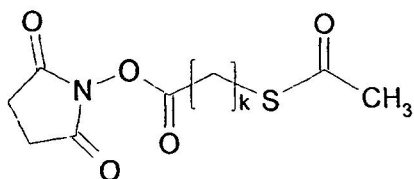
10



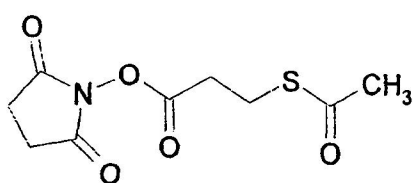
15

In a preferred embodiment the activation of the ϵ -amino lysine groups is performed by reaction with bi-functional reagents having a succinimidyl moiety. The bi-functional reagents may carry different spacer species, e.g. $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_k-$ moieties, wherein k is from 1 to about 10, preferably from 1 to about 4, and more preferably 1 or 2, and most preferably 1. Examples of these reagents are N-succinimidyl-S-acetylthiopropionate (SATP) and N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA)

20

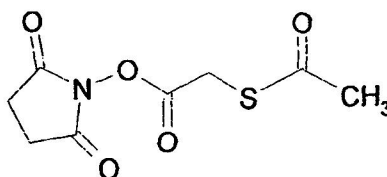


Acetylthioalkyl-carboxylic-NHS-ester, like

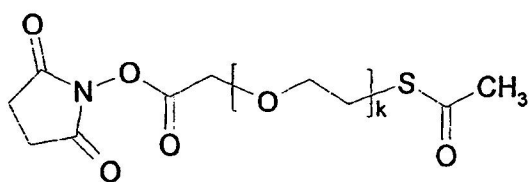


SATP

or



SATA



2-(Acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-ester

with k as defined above.

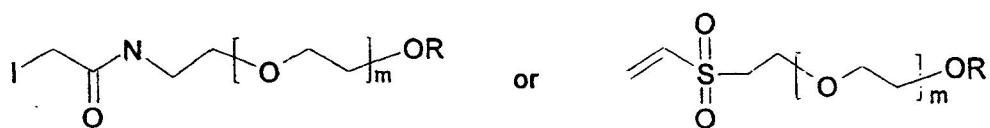
- 5 The preparation of the bi-functional reagents is known in the art. Precursors of 2-(acetylthio)-(ethoxy)_k-acetic-acid-NHS-esters are described in DE-3924705, while the derivatization to the acetylthio compound is described by March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. SATA is commercially available (Molecular Probes, Eugene, OR, USA and Pierce, Rockford, IL).

The number of thiol groups to be added to an EPO molecule can be selected by adjusting the reaction parameters, i.e., the protein (EPO) concentration and the protein/bi-functional reagent ratio. Preferably, the EPO is activated by covalently linking from 1 to 5 thiol groups per EPO molecule, more preferably from 1.5 to 3 thiol groups per EPO molecule. These ranges refer to the statistical distribution of the thiol group over the EPO protein population.

The reaction is carried out, for example, in an aqueous buffer solution, pH 6.5–8.0, e.g., in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The bi-functional reagent may be added in DMSO. After completion of the reaction, preferably after 30 minutes, the reaction is stopped by addition of lysine. Excess bifunctional reagent may be separated by methods known in the art, e.g., by dialysis or column filtration. The average number of thiol groups added to EPO can be determined by photometric methods described in, for example, Grasetti, D.R. and Murray, J.F. in *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41 – 49 (1967).

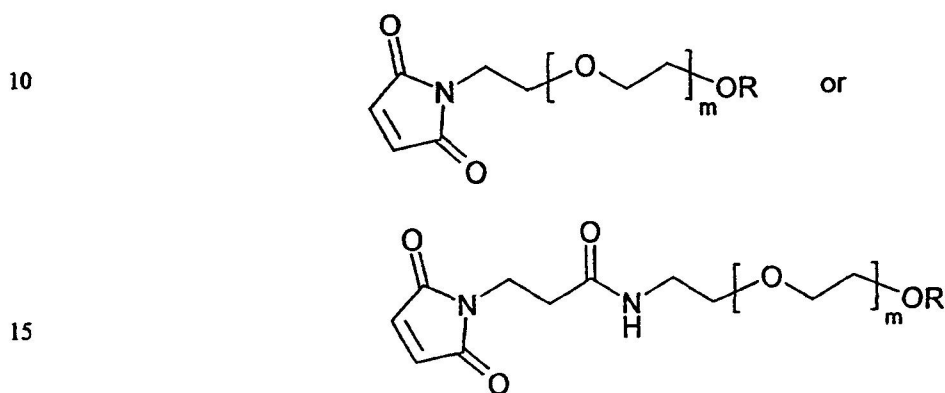
The above reaction is followed by covalent coupling of an activated polyethylene glycol (PEG) derivative. Suitable PEG derivatives are activated PEG molecules with an average molecular weight of from about 20 to about 40 kDa, more preferably from about 24 to about 35 kDa, and most preferably about 30 kDa.

Activated PEG derivatives are known in the art and are described in, for example, Morpurgo, M. et al. *J. Bioconj. Chem.* (1996) 7, page 363 ff for PEG-vinylsulfone. Linear chain and branched chain PEG species are suitable for the preparation of the compounds of Formula 1. Examples of reactive PEG reagents are iodo-acetyl-methoxy-PEG and methoxy-PEG-vinylsulfone:



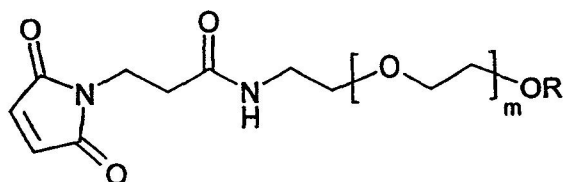
The use of these iodo-activated substances is known in the art and described e.g. by Hermanson, G. T. in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) p. 147-148.

- 5 Most preferably, the PEG species are activated by maleimide using (alkoxy-PEG-maleimide), such as methoxy-PEG-maleimide (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.). The structure of alkoxy-PEG-maleimide is as follows:



with R and m are as defined above.

- 20 The most preferred derivative is



The coupling reaction with alkoxy-PEG-maleimide takes place after *in situ* cleavage of the thiol protecting group in an aqueous buffer solution, e.g. 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2. The cleavage of the protecting group may be performed,

for example, with hydroxylamine in DMSO at 25°C, pH 6.2 for about 90 minutes. For the PEG modification the molar ratio of activated EPO/alkoxy-PEG-maleimide should be from about 1:3 to about 1:6, and preferably 1:4. The reaction may be stopped by addition of cysteine and reaction of the remaining thiol (-SH) groups with N-methylmaleimide or other appropriate compounds capable of forming disulfide bonds. Because of the reaction of any remaining active thiol groups with a protecting group such as N-methylmaleimide or other suitable protecting group, the EPO glycoproteins in the conjugates of this invention may contain such protecting groups. Generally the procedure described herein will produce a mixture of molecules having varying numbers of thiols protected by different numbers of the protecting group, depending on the number of activated thiol groups on the glycoprotein that were not conjugated to PEG-maleimide.

Whereas N-methylmaleimide forms the same type of covalent bond when used to block the remaining thiol-groups on the pegylated protein, disulfide compounds will lead in an intermolecular sulfide/disulfide exchange reaction to a disulfide bridged coupling of the blocking reagent. Preferred blocking reagents for that type of blocking reaction are oxidized glutathione (GSSG), cysteine and cystamine. Whereas with cysteine no additional net charge is introduced into the pegylated protein, the use of the blocking reagents GSSG or cystamine results in an additional negative or positive charge.

The further purification of the compounds of Formula 1, including the separation of mono-, di- and tri-pegylated EPO species, may be done by methods known in the art, e.g., column chromatography.

303
298

Pharmaceutical Compositions

5 The erythropoietin glycoprotein products prepared in accordance with this invention may be prepared in pharmaceutical compositions suitable for injection with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle by methods known in the art.

Treating Blood Disorders Characterized by Low or Defective Red Blood Cell Production

10 Administration of the erythropoietin glycoprotein products of the present invention results in red blood cell formation in humans. Therefore, administration of the erythropoietin glycoprotein products replenishes this EPO protein which is important in the production of red blood cells. The pharmaceutical compositions containing the erythropoietin glycoprotein products may be formulated at a strength effective for administration by various means to a
15 human patient experiencing blood disorders characterized by low or defective red blood cell production, either alone or as part condition or disease. The pharmaceutical compositions may be administered by injection such as by subcutaneous or intravenous injection. Average quantities of the erythropoietin glycoprotein product may vary and in particular should be based upon the recommendations and prescription of a qualified physician.

20 Throughout this application, various publications have been referenced. The disclosures in these publications are incorporated herein by reference in order to describe more fully the state of the art.

25 The present invention is further illustrated by the following examples which are presented for purposes of demonstrating, but not limiting, the preparation of the compounds and compositions of this invention.

367
299

EXAMPLE 1

Fermentation And Purification Of Human EPO

5 a) Inoculum Preparation and Fermentation

One vial of the Working Cell Bank, originating from an EPO-producing CHO cell line (ATCC CRL8695, disclosed in EP 411 678 (Genetics Institute) can be used) is taken from the gas phase of the liquid nitrogen storage tank. The cells are transferred into glass spinner
10 flasks and cultivated in a hydrogen carbonate-buffered medium in a humidified CO₂ incubator. Typical serum free media used for the inoculum preparation and fermentation are disclosed in European Patent Application 513 738, to Koch published 12 June 1992, or WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996, for example contain as medium DMEM/F12 (e.g. JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, order No. 57-736) and additionally sodium hydrogencarbonate, L+glutamine, D+glucose, recombinant insulin,
15 sodium selenite, diaminobutane, hydrocortisone, iron(II) sulfate, asparagine, aspartic acid, serine and a stabilizer for mammalian cells such as e.g. polyvinyl alcohol, methyl cellulose, polydextran, polyethylene glycol, Pluronic F68, plasma expander polygelin (HEMACCEL®) or polyvinyl pyrrolidone (WO 96/35718).

20 The cultures are microscopically checked for the absence of contaminating microorganisms, and the cell densities are determined. These tests are performed at each splitting step.

After the initial growth period, the cell culture is diluted with fresh medium to the
25 starting cell density and undergoes another growth cycle. This procedure is repeated until a culture volume of approximately 2 l per glass spinner flask has been obtained. After approx. 12 doublings 1 to 5 liter of this culture is available which then is used as inoculum for the 10 l inoculum fermenter.

After 3 - 5 days, the culture in the 10 l fermenter can be used as inoculum for the 100 l inoculum fermenter.

After additional 3 - 5 days of cultivation, the culture in the 100 l fermenter can be used as inoculum for the 1000 l production fermenter.

b) Harvesting and Cell Separation

A batch refeed process is used, i.e. when the desired cell density is reached, approx. 80 % of the culture is harvested. The remaining culture is replenished with fresh culture medium and cultivated until the next harvest. One production run consists of a maximum of 10 subsequent harvests: 9 partial harvests and 1 overall harvest at the end of fermentation. Harvesting takes place every 3 - 4 days.

The determined harvest volume is transferred into a cooled vessel. The cells are removed by centrifugation or filtration and discarded. The EPO containing supernatant of the centrifugation step is in-line filtered and collected in a second cooled vessel. Each harvest is processed separately during purification.

A typical process for the purification of EPO-protein is disclosed in WO 96/35718, to Burg published 14 November 1996. The purification process is explained exemplary in the following.

a) Blue Sepharose Chromatography

Blue Sepharose (Pharmacia) consists of Sepharose beads to the surface of which the Cibacron blue dye is covalently bound. Since EPO binds more strongly to Blue Sepharose than most non-proteinaceous contaminants, some proteinaceous impurities and PVA, EPO

can be enriched in this step. The elution of the Blue Sepharose column is performed by increasing the salt concentration as well as the pH.

5 The column is filled with 80 - 100 l of Blue Sepharose, regenerated with NaOH and equilibrated with equilibration buffer (sodium/ calcium chloride and sodium acetate). The acidified and filtered fermenter supernatant is loaded. After completion of the loading, the column is washed first with a buffer similar to the equilibration buffer containing a higher sodium chloride concentration and consecutively with a Tris-base buffer. The product is eluted with a Tris-base buffer and collected in a single fraction in accordance with the master
10 elution profile.

b) Butyl Toyopearl Chromatography

15 The Butyl Toyopearl 650 C (TosoHaas) is a polystyrene based matrix to which aliphatic butyl-residues are covalently coupled. Since EPO binds more strongly to this gel than most of the impurities and PVA, it has to be eluted with a buffer containing isopropanol.

20 The column is packed with 30 - 40 l of Butyl Toyopearl 650 C, regenerated with NaOH, washed with a Tris-base buffer and equilibrated with a Tris-base buffer containing isopropanol.

25 The Blue Sepharose eluate is adjusted to the concentration of isopropanol in the column equilibration buffer and loaded onto the column. Then the column is washed with equilibration buffer with increased isopropanol concentration. The product is eluted with elution buffer (Tris-base buffer with high isopropanol content) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

c) Hydroxyapatite Ultrogel Chromatography

5 The Hydroxyapatite Ultrogel (Biosepra) consists of hydroxyapatite which is incorporated in an agarose matrix to improve the mechanical properties. EPO has a low affinity to hydroxyapatite and can therefore be eluted at lower phosphate concentrations than protein impurities.

10 The column is filled with 30 - 40 l of Hydroxyapatite Ultrogel and regenerated with a potassium phosphate/ calcium chloride buffer and NaOH followed by a Tris-base buffer. Then it is equilibrated with a Tris-base buffer containing a low amount of isopropanol and sodium chloride.

15 The EPO containing eluate of the Butyl Toyopearl chromatography is loaded onto the column. Subsequently the column is washed with equilibration buffer and a Tris-base buffer without isopropanol and sodium chloride. The product is eluted with a Tris-base buffer containing a low concentration of potassium phosphate and collected in a single fraction in accordance with the master elutiogram.

d) Reversed Phase HPLC on Vydac C4

20 The RP-HPLC material Vydac C4 (Vydac) consists of silica gel particles, the surfaces of which carry C4-alkyl chains. The separation of EPO from the proteinaceous impurities is based on differences in the strength of hydrophobic interactions. Elution is performed with an acetonitrile gradient in diluted trifluoroacetic acid.

25 Preparative HPLC is performed using a stainless steel column (filled with 2.8 to 3.2 liter of Vydac C4 silicagel). The Hydroxyapatite Ultrogel eluate is acidified by adding trifluoroacetic acid and loaded onto the Vydac C4 column. For washing and elution an acetonitrile

gradient in diluted trifluoroacetic acid is used. Fractions are collected and immediately neutralized with phosphate buffer. The EPO fractions which are within the IPC limits are pooled.

5 e) DEAE Sepharose Chromatography

The DEAE Sepharose (Pharmacia) material consists of diethylaminoethyl (DEAE) - groups which are covalently bound to the surface of Sepharose beads. The binding of EPO to the DEAE groups is mediated by ionic interactions. Acetonitrile and trifluoroacetic acid pass through the column without being retained. After these substances have been washed off, trace impurities are removed by washing the column with acetate buffer at a low pH. Then the column is washed with neutral phosphate buffer and EPO is eluted with a buffer with increased ionic strength.

The column is packed with DEAE Sepharose fast flow. The column volume is adjusted to assure an EPO load in the range of 3 - 10 mg EPO/ml gel. The column is washed with water and equilibration buffer (sodium/ potassium phosphate). The pooled fractions of the HPLC eluate are loaded and the column is washed with equilibration buffer. Then the column is washed with washing buffer (sodium acetate buffer) followed by washing with equilibration buffer. Subsequently, EPO is eluted from the column with elution buffer (sodium chloride, sodium/ potassium phosphate) and collected in a single fraction in accordance with the master elution profile.

The eluate of the DEAE Sepharose column is adjusted to the specified conductivity. The resulting drug substance is sterile filtered into Teflon bottles and stored at -70 °C.

EXAMPLE 2

Covalent Linking of thiol groups to EPO

5 This example discloses the determination of reaction conditions for the covalent linking of thiol groups to EPO. To determine the conditions, different amounts of a reagent containing a blocked thiol group, here SATA or SATP (dissolved in DMSO ad 10 mg/ml) were added to the EPO solution, here to 1 ml of 5 mg/ml EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, pH 7.3. The reaction was stirred for about 30 minutes (25°C) and
10 stopped by addition of 1 M lysine solution at 10 mM. Excess amounts of SATA and SATP were removed by dialysis against 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl and 2 mM EDTA, pH 6.2. After removal of the protecting acetyl group with hydroxylamine, the number of thiol groups covalently linked to EPO was determined photometrically with dithiodipyridine according to the method described by Grasetti, D.R. and Murray, J. F. in J.
15 Appl. Biochem. Biotechnol. 119, page 41-49 (1967).

The number of thiol groups covalently linked per EPO molecule is shown below.

Molar ratio EPO : SATA or SATP	Mol thiol groups / mol EPO
EPO : SATA = 1 : 3	1,5
EPO : SATA = 1 : 5	2.4
EPO : SATA = 1 : 6	3.2
EPO : SATP = 1 : 3	1.3
EPO : SATP = 1 : 4	2.5
EPO : SATP = 1 : 6	3.7

3/8
305

EXAMPLE 3

Modification of activated EPO with methoxy-PEG-maleimide

5

A) Activation of EPO:

10

100 mg EPO produced according to Example 1 (190,000 IU/ mg as determined by the normocythaemic mouse assay) were activated with SATA (molar ratio: EPO/SATA = 1/5) according to Example 2. The resulting EPO ("activated EPO") carrying covalently linked blocked thiol groups was separated from by-products like N-hydroxy-succinimide or non-reacted SATA by dialysis as described in Example 1. A solution of 4.5 mg/ml activated EPO in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2 was obtained.

B) Pegylation of activated EPO:

15

380 mg methoxy-PEG-maleimide having the "most preferred" structure illustrated above (MW 30.000; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville (Alabama, USA)) was dissolved in the above solution containing 95 mg activated EPO (4.5 mg/ml in 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.2). The resulting molar ratio between activated EPO and methoxy-PEG-maleimide in the solution was 1 : 4. By addition of 1 M aqueous hydroxylamine solution ad 30 mM, pH 6.2 to the above solution the covalently linked blocked thiol groups of activated EPO were de-blocked. The resulting activated EPO in the reaction mixture of the solution contained free thiol (-SH) groups. De-blocking of the thiol groups was followed immediately by the coupling reaction between the activated EPO now containing free thiol (-SH) groups and methoxy-PEG-maleimide for 90 minutes (stirring, 25°C). The coupling reaction was stopped by addition of 0.2 M aqueous cysteine solution ad 2 mM to the reaction mixture. After 30 minutes excess free thiol groups of the activated EPO which did not react with methoxy-PEG-maleimide were blocked by addition of a 0.5 M N-methylmaleimide solution in DMSO to reach a concentration of 5 mM. After 30 minutes the

25

resulting reaction mixture now containing pegylated EPO species was dialyzed against 10 mM potassium phosphate, pH 7.5 for ≥ 15 hours.

C) Purification of pegylated EPO species:

- 5 For separation of the pegylated EPO species from the reaction mixture, the following purification process was performed: A 50 ml Q-Sepharose ff column was equilibrated with 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. The reaction mixture obtained in step B) was loaded onto the column (flow rate: 3 column volumes (CV) per hour). In order to separate non-reacted methoxy-PEG-maleimide reagent, the column was washed with 5 CV's of 10 mM potassium phosphate, pH 7.5. Pegylated EPO species were separated by elution with an increasing salt gradient consisting of 5 CV's buffer A (10 mM potassium phosphate, pH 7.5) and 5 CV's buffer B (10 mM potassium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.5) with a flow rate of 3 CV per hour. Based on the NaCl gradient, the pegylated EPO species (tri-, bi- and mono-pegylated EPO species) were eluted first, followed by the non-pegylated EPO species. The fraction of the eluate containing the pegylated EPO species (tri-, di- and mono-pegylated EPO species) was pooled and filtered (sterile filtration with a 0.2 μ m filter).
- 15
- 20 - Content and purity of tri-, di- and mono-pegylated EPO species were evaluated on Coomassie-stained SDS-PAA gels (Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)) while protein concentrations were measured at 280 nm according the Beer-Lambert law. The apparent molecular weights of the EPO species determined by SDS-PAA electrophoresis were about 68 kDa (mono-pegylated EPO species), about 98 kDa (di-pegylated EPO species) , and about 128 kDa (tri-pegylated EPO species).
- 25 Further separation of the tri-, di and mono-pegylated EPO species can be achieved by chromatography, e.g. by size exclusion chromatography (Superdex, pg 200; Pharmacia).

3A
302

The determination of in-vivo biological activity of the eluate containing tri- di- and mono-pegylated species was performed by the method described in Example 4.

5

EXAMPLE 4

In-vivo activity of pegylated EPO determined by the normocythaemic mouse assay

10 The normocythaemic mouse bioassay is known in the art (Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) and a method in the monography of erythropoietin of Ph. Eur. BRP. The samples are diluted with BSA-PBS. Normal healthy mice, 7-15 weeks old, are administered s.c. 0.2 ml of the EPO-fraction containing tri-, di- and mono-pegylated EPO as described in Example 2. Over a period of 4 days starting 72 hours after the administration, blood is drawn by puncture of the tail vein and diluted such that 1 µl of blood is present in 1
15 ml of an 0.15 µmol acridine orange staining solution. The staining time is 3 to 10 minutes. The reticulocyte counts are carried out microfluorometrically in a flow cytometer by analysis of the red fluorescence histogram. The reticulocyte counts are given in terms of absolute figures (per 30,000 blood cells analyzed). For the data presented, each group consisted of 5 mice per day, and the mice were bled only once.

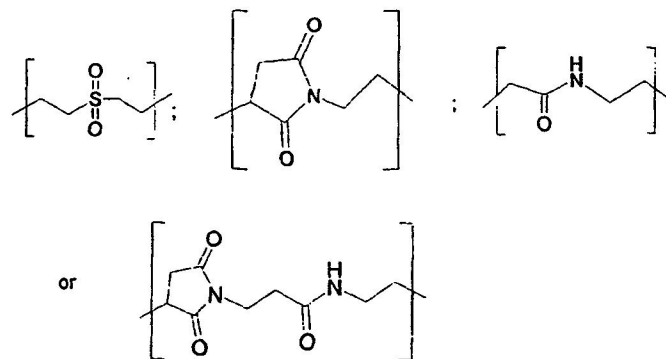
20

Methoxy-PEG-maleimide coupled to EPO according to Example 3, unmodified EPO and buffer solution were administered to mice. The results are shown in Figure 3. The results show the superior activity and the prolonged half life of the pegylated EPO species indicated by the significantly increased amounts of reticulocytes and the shift of the reticulocytes count
25 maximum using the same dose per mouse.

31B
308

What is claimed is:

1. A conjugate, said conjugate comprising an erythropoietin glycoprotein having at least one free amino group and having the *in vivo* biological activity of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells and selected from the group consisting of human erythropoietin and analogs thereof which have the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites or by the rearrangement of at least one glycosylation site; said glycoprotein being covalently linked to from one to three lower-alkoxy poly(ethylene glycol) groups, each poly(ethylene glycol) group being covalently linked to the glycoprotein via a linker of the formula $-C(O)-X-S-Y-$ with the C(O) of the linker forming an amide bond with one of said amino groups, X is $(CH_2)_k$ or $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k is from 1 to 10, Y is



the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 20 kilodaltons to about 40 kilodaltons, and the molecular weight of the conjugate is from about 51 kilodaltons to about 175 kilodaltons.

2. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein is a human erythropoietin protein.

3. The conjugate of claim 2, wherein the human erythropoietin protein is expressed by endogenous gene activation.

5 4. The conjugate of claim 2, wherein the erythropoietin glycoprotein has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

5. The conjugate of claim 4, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

10 6. The conjugate of claim 4, wherein k is from 1 to 4.

7. The conjugate of claim 4, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

15 8. The conjugate of claim 7, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

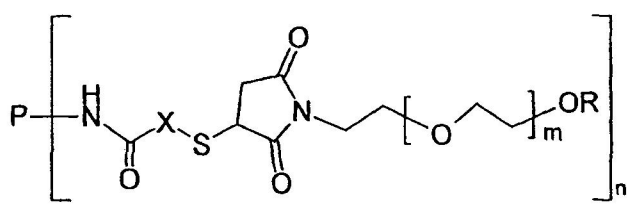
9. The conjugate of claim 4, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

20 10. The conjugate of claim 4, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

11. The conjugate of claim 4, of the formula:

25

3/5
310



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is -
(CH₂)_k- or -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein
without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

5

12. The conjugate of claim 11, wherein X is -CH₂-.

13. The conjugate of claim 11, wherein m is an integer from 550 to 800.

10

14. The conjugate of claim 13, wherein m is an integer from 650 to 700.

15. The conjugate of claim 11, wherein n is 1.

16. The conjugate of claim 11, wherein R is methyl.

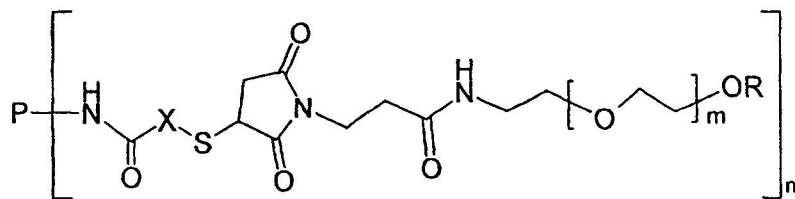
15

17. The conjugate of claim 11, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

18. The conjugate of claim 4, of the formula:

20



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

19. The conjugate of claim 18, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

20. The conjugate of claim 18, wherein m is an integer from 550 to 800.

21. The conjugate of claim 20, wherein m is an integer from 650 to 700.

22. The conjugate of claim 18, wherein R is methyl.

23. The conjugate of claim 18, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

24. The conjugate of claim 1, wherein the erythropoietin glycoprotein has the primary structure of human erythropoietin modified by the addition of from 1 to 6 glycosylation sites.

25. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has a sequence selected from the group consisting of:

Asn³⁰Thr³² Figure 1;

Asn⁵¹Thr⁵³ Figure 1,

Asn⁵⁷Thr⁵⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹ Figure 1;

Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹ Figure 1;

5 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹² Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶² Figure 1;

10 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ Figure 1;

Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹ Figure 1;

Asn¹³⁶Thr¹³⁸ Figure 1;

15 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰ Figure 1;

Thr¹²⁵ Figure 1; and

Pro¹²⁴Thr¹²⁵ Figure 1.

26. The conjugate of claim 25, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

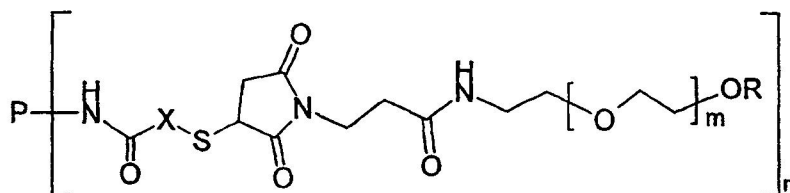
27. The conjugate of claim 25, wherein k is from 1 to 4.

28. The conjugate of claim 25, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

29. The conjugate of claim 28, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

38. The conjugate of claim 32, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

39. The conjugate of claim 25, of the formula:



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

40. The conjugate of claim 39, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

41. The conjugate of claim 39, wherein m is an integer from 550 to 800.

42. The conjugate of claim 41, wherein m is an integer from 650 to 700.

43. The conjugate of claim 39, wherein R is methyl.

44. The conjugate of claim 39, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

45. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has a sequence comprising the sequence of human erythropoietin and a second sequence at the carboxy terminus of the

human erythropoietin sequence, wherein the second sequence contains at least one glycosylation site.

5 46. The conjugate of claim 45, wherein the second sequences comprises a sequence derived from the carboxy terminal sequence of human chorionic gonadotropin.

47. The conjugate of claim 46, wherein the glycoprotein has a sequence selected from the group consisting of:

10 (a) the sequence of human erythropoietin and the 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 at the carboxy terminus of the human erythropoietin sequence;

(b) the sequence in (a) modified by Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; and

(c) the sequence in (a) modified by Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

15 48. The conjugate of claim 47, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

49. The conjugate of claim 47, wherein k is from 1 to 4.

20 50. The conjugate of claim 47, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

51. The conjugate of claim 50, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

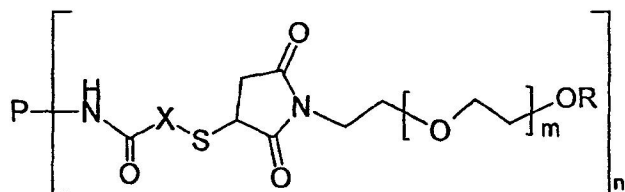
25 52. The conjugate of claim 47, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

374
316

53. The conjugate of claim 47, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

54. The conjugate of claim 47, of the formula:

5



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

10

55. The conjugate of claim 54, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

56. The conjugate of claim 54, wherein m is an integer from 550 to 800.

15

57. The conjugate of claim 56, wherein m is an integer from 650 to 700.

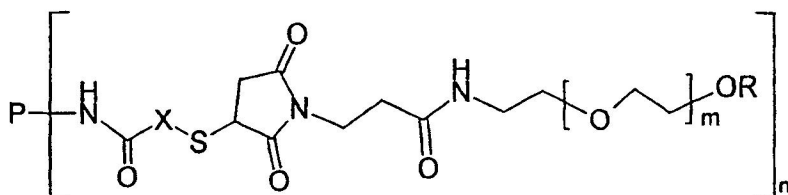
58. The conjugate of claim 54, wherein n is 1.

59. The conjugate of claim 54, wherein R is methyl.

20

60. The conjugate of claim 54, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure 2.

61. The conjugate of claim 47, of the formula:



5 wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is -
(CH₂)_k- or -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein
without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

62. The conjugate of claim 61, wherein X is -CH₂- .

10 63. The conjugate of claim 61, wherein m is an integer from 550 to 800.

64. The conjugate of claim 63, wherein m is an integer from 650 to 700.

15 65. The conjugate of claim 61, wherein R is methyl.

66. The conjugate of claim 61, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure
2.

20 67. The conjugate of claim 1, wherein the glycoprotein has the sequence of human
erythropoietin modified by a rearrangement of at least one glycosylation site.

68. The conjugate of claim 67, wherein the rearrangement comprises deletion of any of
the N-linked glycosylation sites in human erythropoietin and addition of an N-linked
glycosylation site at position 88 of the sequence of human erythropoietin.

69. The conjugate of claim 68, wherein the glycoprotein has the sequence of human erythropoietin modified by a modification selected from the group consisting of:

Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;

5 Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; and

Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

70. The conjugate of claim 69, wherein X is $-(CH_2)_k-$.

10 71. The conjugate of claim 69, wherein k is from 1 to 4.

72. The conjugate of claim 69, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is from about 24 kilodaltons to about 35 kilodaltons.

15 73. The conjugate of claim 72, wherein the average molecular weight of each poly(ethylene glycol) moiety is about 30 kilodaltons.

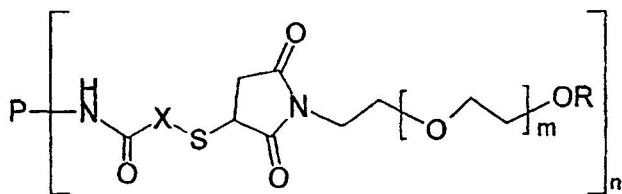
74. The conjugate of claim 69, wherein the glycoprotein is covalently linked to one or two lower-alkoxy capped poly(ethylene glycol) moieties.

20 75. The conjugate of claim 69, wherein the poly(ethylene glycol) moieties are capped by methoxy.

76. The conjugate of claim 69, of the formula:

25

660E80-154T5T09



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

5

77. The conjugate of claim 76, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

78. The conjugate of claim 76, wherein m is an integer from 550 to 800.

10

79. The conjugate of claim 78, wherein m is an integer from 650 to 700.

80. The conjugate of claim 76, wherein n is 1.

81. The conjugate of claim 76, wherein R is methyl.

15

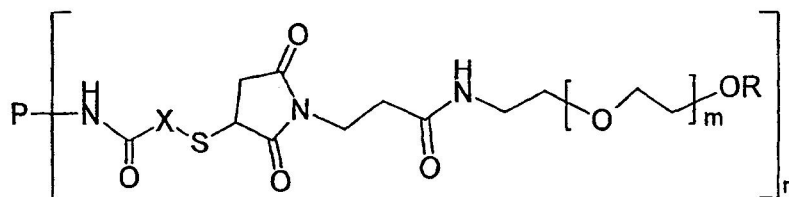
82. The conjugate of claim 76, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

2.

83. The conjugate of claim 69, of the formula:

20

37
320



wherein n is an integer from 1 to 3; m is an integer from 450 to 900; R is lower alkyl; X is $-(\text{CH}_2)_k-$ or $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, and P is the residue of the erythropoietin glycoprotein without the amino group or groups which form an amide linkage with X.

5

84. The conjugate of claim 83, wherein X is $-\text{CH}_2-$.

85. The conjugate of claim 83, wherein m is an integer from 550 to 800.

10

86. The conjugate of claim 85, wherein m is an integer from 650 to 700.

87. The conjugate of claim 83, wherein R is methyl.

88. The conjugate of claim 83, wherein P has the sequence set out in Figure 1 or Figure

15

2.

ABSTRACT

Erythropoietin glycoprotein products are disclosed which have the *in vivo* biological activity
5 of causing bone marrow cells to increase production of reticulocytes and red blood cells.
The present conjugates have an increased circulating half-life and plasma residence time,
decreased clearance, and increased clinical activity *in vivo*. In addition, compared with
conventional PEG-EPO conjugates, the conjugates of this invention have superior clinical
properties. The present invention also includes a method for the treatment of anemia in a
10 human employing the novel erythropoietin glycoprotein products as well as a method for
preparing the erythropoietin glycoprotein products.

COPIES

15

• 87667

322

Declaration and Power of Attorney for Patent Application

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name,

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled

ERYTHROPOIETIN CONJUGATES

the specification of which

(check one)

[X] is attached hereto.

[] was filed on _____ as

Application Serial No. _____

and was amended on _____
(if applicable)

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or § 365(b) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate, or § 365(a) of any PCT International application which designated at least one country other than the United States, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent or inventor's certificate, or PCT International application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)			Priority Claimed	
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
_____ (Number)	_____ (Country)	_____ (Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)	_____ (Application No.)	_____ (Filing Date)
----------------------------	------------------------	----------------------------	------------------------

378
323

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s), or § 365(c) of any International application designating the United States, listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

(Application Serial No.)	(Filing Date)	(Status) (patented, pending, abandoned)
(Application Serial No.)	(Filing Date)	(Status) (patented, pending, abandoned)

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

POWER OF ATTORNEY: As a named inventor, I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. (list name and registration number)

George W. Johnston	(Reg. No. 28090)	Dennis P. Tramaloni	(Reg. No. 28542)
William H. Epstein	(Reg. No. 20008)	Patricia S. Rocha-Tramaloni	(Reg. No. 31054)
Lewis J. Kreisler	(Reg. No. 38522)	John P. Parise	(Reg. No. 34403)
Briana C. Buchholz	(Reg. No. 39123)		

Send Correspondence to:
George W. Johnston, Esq., Hoffmann-La Roche Inc., 340 Kingsland Street,
Nutley, New Jersey 07110-1199

Direct Telephone Calls to: (name and telephone number)
Lewis J. Kreisler (973) 235-4387

Josef Burg
Full name of sole or first inventor

Inventor's signature Date
Weilheim, Germany
Residence
Germany
Citizenship
An der Bärenmühle 1, 82362 Weilheim, Germany
Post Office Address

379
324

E 1 Hilger

Full name of second joint inventor, if any

Second Inventor's signature

Date

Penzberg, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Am Katzenbuckel 21, 82377 Penzberg, Germany

Post Office Address

Hans-Peter Josel

Full name of third joint inventor, if any

Third Inventor's signature

Date

Weilheim, Germany

Residence

Germany

Citizenship

Prälatenweg 7, 82362 Weilheim, Germany

Post Office Address

Full name of fourth joint inventor, if any

Fourth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

325

Full name of fifth joint inventor, if any

Fifth Inventor's signature

Date

Residence

Citizenship

Post Office Address

Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56, duty to disclose information material to patentability provides, in part, that each individual associated with the filing and prosecution of a patent application has a duty of candor and good faith in dealing with the Office, which includes a duty to disclose to the Office all information known to that individual to be material to patentability as defined in this section. The duty to disclose information exists with respect to each pending claim until the claim is cancelled or withdrawn from consideration, or the application becomes abandoned.

Under this section, information is material to patentability when it is not cumulative to information already of record or being made of record in the application, and

- (1) It establishes, by itself or in combination with other information, a prima facie case of unpatentability of a claim; or
- (2) It refutes, or is inconsistent with, a position the applicant takes in:
 - (i) Opposing an argument of unpatentability relied on by the Office, or
 - (ii) Asserting an argument of patentability.

FIGURE 1

5

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰

10

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰

Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰

15

Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰

20

Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰

25

Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

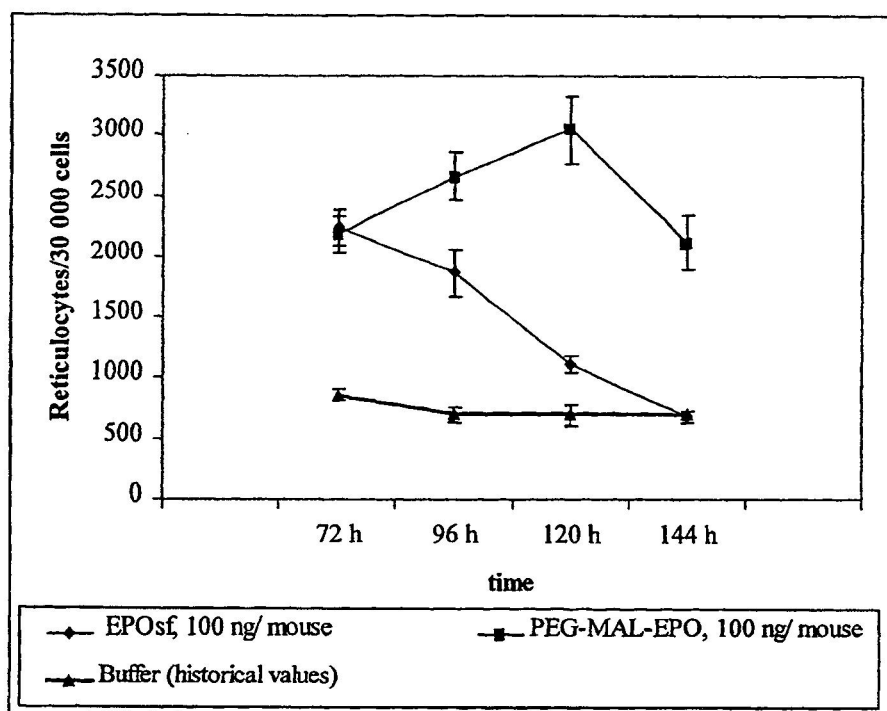
FIGURE 2

1. 1. The first
 2. 2. The second
 3. 3. The third
 4. 4. The fourth
 5. 5. The fifth
 6. 6. The sixth
 7. 7. The seventh
 8. 8. The eighth
 9. 9. The ninth
 10. 10. The tenth
 11. 11. The eleventh
 12. 12. The twelfth
 13. 13. The thirteenth
 14. 14. The fourteenth
 15. 15. The fifteenth
 16. 16. The sixteenth
 17. 17. The seventeenth
 18. 18. The eighteenth
 19. 19. The nineteenth
 20. 20. The twentieth
 21. 21. The twenty-first
 22. 22. The twenty-second
 23. 23. The twenty-third
 24. 24. The twenty-fourth
 25. 25. The twenty-fifth
 26. 26. The twenty-sixth
 27. 27. The twenty-seventh
 28. 28. The twenty-eighth
 29. 29. The twenty-ninth
 30. 30. The thirtieth
 31. 31. The thirty-first
 32. 32. The thirty-second
 33. 33. The thirty-third
 34. 34. The thirty-fourth
 35. 35. The thirty-fifth
 36. 36. The thirty-sixth
 37. 37. The thirty-seventh
 38. 38. The thirty-eighth
 39. 39. The thirty-ninth
 40. 40. The fortieth
 41. 41. The forty-first
 42. 42. The forty-second
 43. 43. The forty-third
 44. 44. The forty-fourth
 45. 45. The forty-fifth
 46. 46. The forty-sixth
 47. 47. The forty-seventh
 48. 48. The forty-eighth
 49. 49. The forty-ninth
 50. 50. The fiftieth
 51. 51. The fifty-first
 52. 52. The fifty-second
 53. 53. The fifty-third
 54. 54. The fifty-fourth
 55. 55. The fifty-fifth
 56. 56. The fifty-sixth
 57. 57. The fifty-seventh
 58. 58. The fifty-eighth
 59. 59. The fifty-ninth
 60. 60. The sixtieth
 61. 61. The sixty-first
 62. 62. The sixty-second
 63. 63. The sixty-third
 64. 64. The sixty-fourth
 65. 65. The sixty-fifth
 66. 66. The sixty-sixth
 67. 67. The sixty-seventh
 68. 68. The sixty-eighth
 69. 69. The sixty-ninth
 70. 70. The seventieth
 71. 71. The seventy-first
 72. 72. The seventy-second
 73. 73. The seventy-third
 74. 74. The seventy-fourth
 75. 75. The seventy-fifth
 76. 76. The seventy-sixth
 77. 77. The seventy-seventh
 78. 78. The seventy-eighth
 79. 79. The seventy-ninth
 80. 80. The eightieth
 81. 81. The eighty-first
 82. 82. The eighty-second
 83. 83. The eighty-third
 84. 84. The eighty-fourth
 85. 85. The eighty-fifth
 86. 86. The eighty-sixth
 87. 87. The eighty-seventh
 88. 88. The eighty-eighth
 89. 89. The eighty-ninth
 90. 90. The ninetieth
 91. 91. The ninety-first
 92. 92. The ninety-second
 93. 93. The ninety-third
 94. 94. The ninety-fourth
 95. 95. The ninety-fifth
 96. 96. The ninety-sixth
 97. 97. The ninety-seventh
 98. 98. The ninety-eighth
 99. 99. The ninety-ninth
 100. 100. The hundredth

5 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
10 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
15 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
20 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶

323
373
308

FIGURE 3



5

335
329



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [✓]

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante (1)
- Nombre e identificación del Inventor (1)
- Título o nombre de la Invención (1)
- Descripción (6)
- Reivindicaciones (57)
- Resumen (5)
- Comprobante de Pago (2)

- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]

COMPLETA [✓]

INCOMPLETA []

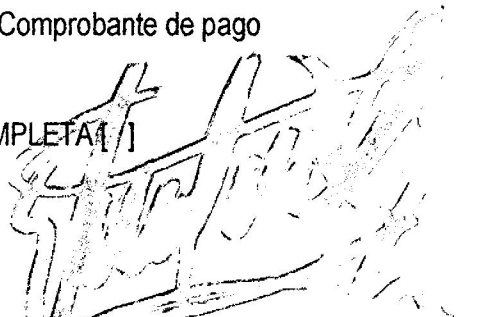
DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

- []
- []
- []
- []
- []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-48531

Fecha: 30 de Junio del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 22 de junio de 1994,
del folio 76.618 al folio 76.623 del
libro de Protocolo N° 259, obra el poder
N° 15.256 conferido por F. HOFFMANN LA
ROCHE A.G.

domiciliado(a) en Basilea - Suiza

al doctor JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO
LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos

Facultad para desistir SI.

Revisado _____.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-48531

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI [X] NO [] **NO APLICABLE []** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [X] NO [] **NO APLICABLE []** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [X] NO [] **NO APLICABLE []** Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI [X] NO [] **EXTEMPORANEAMENTE []** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.

SI [X] NO [] **NO APLICABLE []** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [X] NO [] **NO APLICABLE []** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [X] NO [] **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [X] NO [] Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [X] NO [] Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 30 de Junio del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

202022

1º EXAMEN DE FORMA

Radicación nº 00048531

430

2000 - 09 - 25

CONCEPTO TÉCNICO Nº 157

IPC:a61k 38/02, 35/12

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-c).
- SI ☐ NO ☒ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☒ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Bogotá, D.C., 25 de septiembre de 2000

202012

1º EXAMEN DE FORMA

339 333
372
2000-09-25

CONCEPTO TÉCNICO N° 1572

Radicación n° 00-48531

IPC: A61K 38/02, 35/12

- -La reivindicación 1 no es clara, porque en primer lugar el texto de la reivindicación esta recargado de comentarios y términos que no contienen un significado específico como "análogos de la misma", no es lo suficientemente claro para determinar de manera inequívoca a que compuestos se refiere, tampoco es claro lo que se quiere significar con "alcoxi- inferior"; tampoco es aceptable definir cantidades con términos ambiguos como "... entre alrededor de... y alrededor de...".
- -La reivindicación 2 no es clara en la parte donde dice "alquilo inferior", no se sabe inequívocamente que se quiere significar con esa expresión.
- -La reivindicación 12 no es clara donde se define el peso molecular medio en términos ambiguos como "... entre alrededor de... y alrededor de...".
- -La reivindicación 14 no es clara en la parte donde dice "alcoxilo inferior", no se sabe inequívocamente que se quiere significar con esa expresión.
- -La reivindicación 18 no es clara en la parte donde dice "... eritropoyetina humana expresada mediante activación génica endógena ", porque no es suficiente para definir de manera inequívoca un compuesto químico, entonces sino se sabe inequívocamente a que compuesto se refiere no esta delimitado el alcance de la invención.
- -La reivindicación 19 debe incluir explícitamente la secuencia "SEQ ID NO: 1." y la secuencia "SEQ ID NO: 2"
- -La reivindicación 20 debe adjuntar explícitamente la secuencia "SEQ ID NO:1".
- -La reivindicación 17 no es claro el compuesto que se quiere significar con "conjugado de la reivindicación 16 en donde la nueva disposición comprende la delección de cualquiera de los sitios de glicosilación con unión N en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de glicosilación con unión N...".
- -La reivindicación 29 no es clara porque es una composición que se refiere a "...cada uno de dichos conjugados" y no se a referido a esta altura de la

reivindicación a ningún conjugado específico para que utilice esos términos, además trata de definir los compuestos por los resultados farmacológicos a obtener, por demás contiene los mismos defectos que la reivindicación 1.

- -En las reivindicaciones 30 a 32 no es claro lo que se quiere significar con la expresión "... el porcentaje de conjugados donde n es 1 es al menos del noventa por ciento."
- -En la reivindicación 33 no es claro lo que se quiere significar con "...el porcentaje de conjugados donde n es 1 esta comprendido entre el noventa por ciento...".

202012

Santa Fe de Bogotá D.C., 25 de septiembre de 2000.

335

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

430
2000-10-05

EXPEDIENTE 00-48531

AUTO 2265

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor JOSE ANTONIO LLOREDA, como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

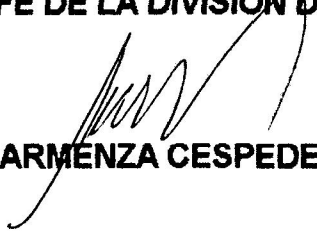
ARTICULO SEGUNDO: De acuerdo con lo previsto en los artículos 60 y 61 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena y en concordancia con lo establecido en los artículos 12 y 13 del Decreto 117 de 1994, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemento o aclare los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 05 de octubre de 2000, notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA