



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2144923 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 1/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.07.01
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.02.13
(86)	Europeisk søknadsnr	08744881.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.04.01
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.01.20
(30)	Prioritet	2007.04.03, US, 909917 P 2007.04.13, US, 911788 P 2007.11.07, US, 986240 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	BioGeneriX AG, Janderstrasse 3, 68199 Mannheim, DE-Tyskland
(72)	Oppfinner	ZOPF, David, A., 560 West Beechtree Lane, Wayne, PA 19087, US-USA LUBENAU, Heinz, An der Eselshaut 12, 67435 Neustadt, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Metoder for behandling ved anvendelse av glykopeglyert G-CSF
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2007 014 759 WO-A2-2005/055946 WO-A2-2006/074467 ARSLAN ET AL: "Mobilization of peripheral blood stem cells" TRANSFUSION AND APHERESIS SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.TRANSCI.2007.08.002, vol. 37, no. 2, 5 November 2007 (2007-11-05), pages 179-185, XP022394206 ISSN: 1473-0502 CAPOCCIA BENJAMIN J ET AL: "G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism" BLOOD, vol. 108, no. 7, October 2006 (2006-10), pages 2438-2445, XP002606573 ISSN: 0006-4971 CASHEN A F ET AL: "Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF?" BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 39, no. 10, 19 March 2007 (2007-03-19), pages 577-588, XP002606576 ISSN: 0268-3369 DEFREES ET AL.: 'GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in Escherichia coli' GLYCOBIOLOGY vol. 16, no. 9, September 2006, pages 833 - 443, XP002403450 FLOMENBERG N ET AL: "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone" BLOOD 20050901 US LNKD- DOI:10.1182/BLOOD-2005-02-0468, vol. 106, no. 5, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1867-1874, XP002606574 ISSN: 0006-4971

HILL G R ET AL: "Allogeneic Stem Cell Transplantation with Peripheral Blood Stem Cells Mobilized by Pegylated G-CSF" BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, KLUGE CARDEN JENNINGS PUBLISHING, CHARLOTTESVILLE, VA, US LNKD-DOI:10.1016/J.BBMT.2006.03.001, vol. 12, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 603-607, XP024918695 ISSN: 1083-8791 [retrieved on 2006-06-01]

HÜBEL K ET AL: "Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary." ANNALS OF HEMATOLOGY APR 2003 LNKD- PUBMED:12707722, vol. 82, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 207-213, XP002606583 ISSN: 0939-5555

KROSCHINSKY F ET AL: "The role of pegfilgrastim in mobilization of hematopoietic stem cells" TRANSFUSION AND APHERESIS SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, LONDON, GB LNKD-DOI:10.1016/J.TRANSCI.2008.04.007, vol. 38, no. 3, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 237-244, XP022716857 ISSN: 1473-0502 [retrieved on 2008-06-01]

LILES W CONRAD ET AL: "Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist." TRANSFUSION MAR 2005 LNKD-PUBMED:15752146, vol. 45, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 295-300, XP002606575 ISSN: 0041-1132

Beskrivelse

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Granulocyt-kolonistimulerende faktor (G-CSF) er et glykoprotein som stimulerer overlevelse, proliferasjon, differensiering og funksjon av nøytrofil granulocyt progenitorceller og modne nøytrofiler. De to formene av rekombinant human G-CSF i klinisk bruk er potente stimulatorer av nøytrofil granulopoese og har vist effekt ved forebygging av infeksiose komplikasjoner av noen nøytropeni-tilstander. De kan anvendes for å fremskynde nøytrofil restitusjon etter myelosuppressiv behandling.

G-CSF reduserer morbiditeten av kjemoterapi ved kreft ved å redusere forekomsten av febril nøytropeni, morbiditeten av høydose kjemoterapi støttet ved margtransplantasjon, og forekomsten og varigheten av infeksjon hos pasienter med alvorlig kronisk nøytropeni. Videre har G-CSF blitt vist å ha terapeutisk effekt ved administrering etter debut av myokardinfarkt.

Akutt myelosuppresjon som en konsekvens av cytotoksisk kjemoterapi er velkjent som en dosebegrensende faktor ved kreftbehandling. Selv om andre normale vev kan bli negativt påvirket, er benmarg spesielt følsom for proliferasjonsspesifikk behandling slik som kjemoterapi og strålebehandling. For noen kreftpasienter begrenser hematopoetisk toksisitet ofte muligheten for doseeskalering av kjemoterapi. Gjentatte eller høydose kjemoterapisykluser kan føre til stamcelle deplesjon av hematopoetiske stamceller og deres etterkommere.

Forebygging av og beskyttelse mot bivirkningene av kjemoterapi og strålebehandling ville ha stor nytte for kreftpasienter. G-CSF og andre vekstfaktorer har blitt vist å lindre slike bivirkninger ved å øke antallet av normale kritiske målceller, spesielt hematopoetiske progenitorceller.

Den humane formen av G-CSF ble klonet av grupper fra Japan og USA i 1986 (se f.eks. Nagata et al. Nature 319: 415-418, 1986). Det naturlige humane glykoproteinet finnes i to former, ett med 175 og det andre med 178 aminosyrer. Den mer tallrike og mer aktive formen på 175 aminosyrer har blitt anvendt ved utvikling av farmasøytiske produkter ved rekombinant DNA-teknologi.

Rekombinant human G-CSF syntetisert i et *E. coli* ekspresjonssystem kalles filgrastim. Strukturen av filgrastim er litt forskjellig fra det naturlige glykoproteinet. Den andre formen av rekombinant human G-CSF kalles *lenograstim* og blir syntetisert i ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler).

hG-CSF er et monomert protein som dimeriserer G-CSF-reseptoren ved dannelse av et 2:2-kompleks av 2 G-CSF-molekyler og 2 reseptorer (Horan et al. Biochemistry, 35(15): 4886-96 (1996)). De følgende hG-CSF-restene har blitt identifisert ved

røntgenkrystallografiske studier som del av de reseptorbindende kontaktflatene: G4, P5, A6, S7, S8, L9, P10, Q11, S12, L15, K16, E19, Q20, L108, D109, D112, T115, T116, Q119, E122, E123 og L124 (se f.eks. Aritomi et al., (1999) Nature 401: 713).

De kommersielt tilgjengelige formene av rhG-CSF har en kortsiktig farmakologisk effekt og må ofte administreres mer enn én gang daglig så lenge leukopeni-tilstanden varer. Et molekyl med en lengre halveringstid i sirkulasjonen ville redusere antall administreringer nødvendig for å lindre leukopeni og forebygge følgende infeksjoner. Et annet problem med rG-CSF-produkter som for øyeblikket er tilgjengelige er forekomsten av doseavhengig bensmerte. Siden bensmerte erfares hos pasienter som en betydelig bivirkning ved behandling med rG-CSF, ville det være ønskelig å tilveiebringe et rG-CSF-produkt som ikke forårsaker bensmerte, enten ved hjelp av et produkt som i seg selv ikke har denne effekten eller som er effektiv i en dose som er tilstrekkelig liten til å ikke forårsake bensmerte. Følgelig er det et klart behov for forbedrede rekombinante G-CSF-molekyler.

Proteinkonstruksjon-varianter av hG-CSF har blitt rapportert (US. Pat. Nr. 5,581,476, US. 5,214,132, US. 5,362,853, US. 4,904,584 og Riedhaar-Olson et al. Biochemistry 35: 9034-9041, 1996). Modifikasjon av hG-CSF og andre polypeptider for å introdusere minst én ytterligere karbohydratkjede sammenlignet med det native polypeptidet har også blitt rapportert (US Pat. Nr. 5,218,092). I tillegg har polymermodifikasjoner av nativ hG-CSF, inkludert binding av PEG-grupper, blitt rapportert og studert (se f.eks. Satake-Ishikawa et al., (1992) Cell Structure and Function 17: 157; Bowen et al. (1999) Experimental Hematology 27: 425; US Pat. Nr. 5,824,778, US 5,824,784, WO 96/11953, WO 95/21629 og WO 94/20069).

Binding av syntetiske polymerer til peptid-ryggraden i et forsøk på å forbedre de farmakokinetiske egenskapene av glykoprotein-terapeutika er kjent på området. Et eksempel på polymer som har blitt konjugert til peptider er poly(etylenglykol) ("PEG"). Anvendelse av PEG for å derivatisere peptid-terapeutika har blitt vist å redusere immunogenisiteten av peptidene. For eksempel beskriver US Pat. Nr. 4,179,337 (Davis et al.) ikke-immunogene polypeptider slik som enzymer og peptidhormoner bundet til polyetylenglykol (PEG) eller polypropylenglykol. I tillegg til redusert immunogenisitet blir "clearance-tiden" i sirkulasjonen forlenget på grunn av den økte størrelsen av PEG-konjugatet av de aktuelle polypeptidene.

En metode for binding av PEG (og derivater derav) til peptider er en ikke-spesifikk binding gjennom en aminosyrerest i peptidet (se f.eks. US Patent Nr. 4,088,538 US Patent Nr. 4,496,689, US Patent Nr. 4,414,147, US Patent Nr. 4,055,635 og PCT WO 87/00056). En annen metode for binding av PEG til peptider er gjennom ikke-spesifikk oksidasjon av glykosylrester på et glykopeptid (se f.eks. WO 94/05332).

I disse ikke-spesifikke metodene blir poly(etylenglykol) tilføyd på en tilfeldig, ikke-spesifikk måte til reaktive rester i en peptid-rygggrad. Selvfølgelig har tilfeldig tilføyelse av PEG-molekyler sine ulemper, inkludert mangel på homogenitet av sluttproduktet, og muligheten for reduksjon av den biologiske eller enzymatiske aktiviteten av peptidet. Derfor er, for fremstilling av terapeutiske peptider, en derivatiseringsstrategi som fører til dannelse av et spesifikt merket, lett karakteriserbart, hovedsakelig homogent produkt bedre. Slike fremgangsmåter har blitt utviklet.

Spesifikt merkede, homogene peptid-terapeutika kan fremstilles *in vitro* gjennom virkningen av enzymer. I motsetning til de typiske ikke-spesifikke metodene for binding av en syntetisk polymer eller annet merke til et peptid, har enzymbasert syntese fordelene med regioselektivitet og stereoselektivitet. To hovedklasser av enzymer for anvendelse ved syntese av merkede peptider er glykosyltransferaser (f.eks. sialyltransferaser, oligosakkaryl-transferaser, N-acetylglukosaminyltransferaser) og glykosidaser. Disse enzymene kan anvendes for spesifikk binding av sukker som deretter kan modifiseres til å omfatte en terapeutisk gruppe. Alternativt kan glykosyltransferaser og modifiserte glykosidaser anvendes for å direkte overføre modifiserte sukkere til en peptidrygggrad (se f.eks. US Patent 6,399,336 og US Patentsøknader publikasjon 20030040037, 20040132640, 20040137557, 20040126838 og 20040142856), hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. Metoder som kombinerer både kjemisk og enzymatisk syntetiske elementer er også kjent (se f.eks. Yamamoto *et al.* *Carbohydr. Res.* 305: 415-422 (1998) og US Patentsøknad publikasjon 20040137557).

WO 2005/055946 A2 og WO 2006/074467 A2 beskriver begge konjugater mellom G-CSF og PEG-grupper. Heri er konjugatene forbundet via en intakt glykosyl bindingsgruppe som er anbrakt mellom og kovalent bundet til peptidet og den modifiserende gruppen.

DeFrees *et al.* (2006) rapporterer om pegylering av G-CSF, interferon-alfa2b (IFN-a2b) og granulocyttemakrofagstimulerende faktor (GM-CSF) ved anvendelse av glykosyltransferase for binding av PEG til O-glykaner.

Hill *et al.* (2006) er en studie som analyserer muligheten for mobilisering av stamceller fra normale donorer med N-terminalt PEGylert G-CSF og disse cellenes evne til gjenopprettelse av hematopoese hos mottakere av allogene transplantater etter myeloablativ kondisjonering.

Hübel og Engert (2003) er en gjennomgåelse av kliniske anvendelser av G-CSF som fokuserer på standard G-CSF.

Capoccia *et al.* (2006) beskriver G-CSF og AMD3100 i forbindelse med mobilisering av monocytter inn i blodet som kan stimulere angiogenese *in vivo* gjennom en parakrin mekanisme.

Flomenberg *et al.* (2005) er en studie av anvendelse av AMD3100 med G-CSF i autolog hematopoetisk forløpercelle-mobilisering.

Liles *et al.* (2005) rapporterer om forøkt mobilisering og oppsamling av CD34+ hematopoetiske celler fra normale humane frivillige stimulert med G-CSF ved enkeltdose administrering av AMD3100 og konkluderer med at AMD3100 også kan anvendes alene.

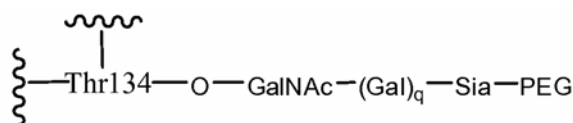
I respons til behovet for forbedret terapeutisk G-CSF, tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en glyko-pegylert G-CSF som er terapeutisk aktivt og som har farmakokinetiske parametere og egenskaper som er forbedret relativt til et identisk, eller nært analogt G-CSF-peptid som ikke er glyko-pegylert. Videre tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å øke hematopoese hos en pasient, spesielt en pasient som har mottatt eller vil motta stråle- eller kjemoterapibehandling.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen, i ett aspekt, fremgangsmåter og preparater for mobilisering av stamcelleproduksjon hos en mottaker av benmargstransplantat. Disse fremgangsmåtene og preparatene omfatter å administrere til en mottaker av benmargstransplantat en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter og preparater for å øke antallet av granulocytter hos en pasient. Fremgangsmåten omfatter trinnet med å administrere til pasienten en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. I ett aspekt har G-CSF-peptidet aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 1.

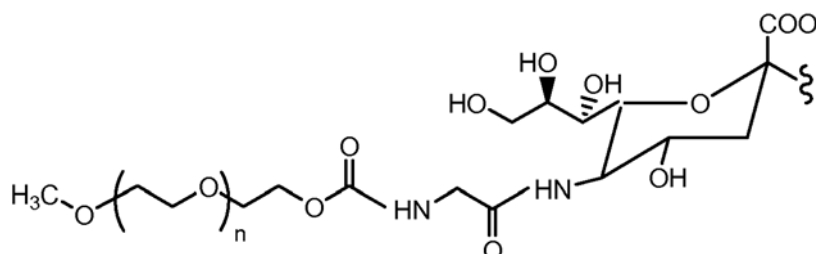
I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter og preparater for økning av stamcelleproduksjon hos en pasient. Fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til pasienten en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur i henhold til formelen



hvor

q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur i henhold til formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for forebygging, behandling og lindring av myelosuppresjon, spesielt myelosuppresjon som skyldes kreftbehandling. I ett aspekt omfatter denne fremgangsmåten å administrere til en mottaker en mengde av et peptid, som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for behandling av nøytropeni hos et pattedyr. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere en farmasøytisk effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for behandling av trombocytopeni hos et pattedyr. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere en farmasøytisk effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for ekspansjon av hematopoetiske stamceller i kultur. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til stamcellene en effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for stimulering av hematopoese hos en pasient. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til pasienten en effektiv mengde av et peptid, som er et kovalent konjugat

mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å øke antallet av hematopoetiske forløperceller hos en pasient. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til pasienten en effektiv mengde av et peptid, som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for mobilisering av stamcelleproduksjon hos en donor. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til donoren en effektiv mengde av et peptid, som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å fremme langvarig innpoding av benmarg gitt til en mottaker. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til mottakeren av benmargen et peptid, som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for mobilisering av hematopoetiske progenitorceller hos en pasient. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til pasienten et første preparat omfattende en forbindelse ifølge formel 1,1'-[1,4-fenyl-bis-(metylen)-bis-1,4,8,11-tetraazasyklo-tetradekan (AMD3100) og et andre preparat omfattende et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. Det første og andre preparatet kan administreres til pasienten sekvensielt i hvilken som helst rekkefølge eller samtidig.

Også beskrevet er en oral doseringsform. Denne orale doseringsformen kan omfatte komponentene: (a) et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe. Den polymerisk modifierende gruppen kan være kovalent bundet til G-CSF-peptidet ved en glykosyl eller aminosyrerest fra G-CSF-peptidet via en intakt glykosyl bindingsgruppe; (b) surfaktant(er); (c) fettsyre(r); og (d) enterisk materiale. Komponentene (a), (b) og (c) blandes i væskefase og lyofiliseres før kombinasjon med komponent (d).

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å øke stamcelleproduksjon hos en donor, hvori fremgangsmåten omfatter trinnene med å administrere til donoren en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. I et enda ytterligere aspekt er mengden av peptidet

administrert til donoren i området fra omtrent 1 mg til omtrent 20 mg.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å øke stamcelleproduksjon hos en donor, hvori fremgangsmåten omfatter trinnene med å administrere til donoren en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. Mengden av peptidet administrert til donoren er i en enhetsdoseform. Enhetsdosen er valgt fra: 25 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg og 200 µg/kg.

BESKRIVELSE AV FIGURENE

FIG. 1 illustrerer data relatert til absolutt nøytrofilitall (ANC) i respons til XM22 (25 µg/kg; 50 µg/kg; 100 µg/kg) og Neulasta (100 µg/kg).

FIG. 2 illustrerer data relatert til CD34+ celletall i respons til XM22 (25 µg/kg; 50 µg/kg; 100 µg/kg) og Neulasta (100 µg/kg).

FIG. 3 er en tabell over data relatert til farmakokinetiske parametere for fire forskjellige testgrupper.

FIG. 4 illustrerer data relatert til absolutt nøytrofilitall (ANC) i respons til XM22 (6 mg) og Neulasta (6 mg).

FIG. 5 illustrerer data relatert til CD34+ celletall i respons til XM22 (6 mg) og Neulasta (6 mg).

FIG. 6 illustrerer farmakodynamiske data relatert til nøytrofilitall i respons til G-CSF, GlykoPEG-G-CSF, Neulasta og et kontrollpreparat i cynomolgusaper.

FIG. 7 illustrerer farmakokinetiske data relatert til plasmakonsentrasjoner av de angitte forbindelsene hos cynomolgusaper.

FIG. 8 er en skjematisk modell av strukturen av Glyko-PEG-GCSF og dens reseptor.

FIG. 9 illustrerer data relatert til serumkonsentrasjon av XM22 og Neulasta etter administrering av tre forskjellige doser av XM22 og av 100 µg/kg Neulasta.

FIG. 10 illustrerer data relatert til serumkonsentrasjon av XM22 og Neulasta etter administrering av 6 mg XM22 og 6 mg Neulasta.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN OG FORETRUKNE UTFØRELSESFORMER

Forkortelser

PEG, poly(etylenglykol); PPG, poly(propylenglykol); Ara, arabinosyl; Fru, fruktosyl; Fuc, fukosyl; Gal, galaktosyl; GalNAc, N-acetylgalaktosaminy; Glc, glukosyl; GlcNAc, N-acetylglukosaminy; Man, mannosyl; ManAc, mannosaminyacetat; Xyl, xylosyl; og NeuAc, sialyl (N-acetylneuraminy); M6P, mannose-6-fosfat; Sia, sialinsyre, N-acetylneuraminy og derivater og analoger derav.

"G-CSF" refererer til granulocyt-kolonistimulerende faktor.

Definisjoner

Dersom ikke angitt på annen måte har alle tekniske og vitenskapelige betegnelser anvendt heri generelt samme betydning som vanligvis forstått av fagfolk på det området som foreliggende oppfinnelse tilhører. Generelt er nomenklaturen anvendt heri og laboratoriemetodene innenfor cellekultur, molekylær genetikk, organisk kjemi og nukleinsyrekjemi og hybridisering slike som er velkjent og vanlig anvendt på området. Standardteknikker anvendes for nukleinsyre- og peptidsyntese. Teknikkene og fremgangsmåtene blir generelt utført i henhold til konvensjonelle metoder innenfor området og forskjellige generelle referanser (se generelt, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., som er inntatt heri ved referanse), som er gitt gjennom hele foreliggende dokument. Nomenklaturen anvendt heri og laboratoriemetodene innenfor analytisk kjemi, og organisk syntese beskrevet nedenfor er slike som er velkjente og vanlig anvendt på området. Standardteknikker, eller modifikasjoner derav, blir anvendt for kjemisk syntese og kjemiske analyser.

Alle oligosakkarider beskrevet heri er beskrevet med navnet eller forkortelsen for det ikke-reduserende sakkaridet (dvs., Gal), fulgt av konfigurasjonen av glykosidbindingen (α eller β), ring-bindingen (1 eller 2), ring-posisjonen av det reduserende sakkaridet involvert i bindingen (2, 3, 4, 6 eller 8), og deretter navnet eller forkortelsen for det reduserende sakkaridet (dvs., GlcNAc). Hvert sakkarid er foretrukket en pyranose. For en gjennomgang av standard glykobiologinomenklatur, se, Essentials of Glycobiology Varki et al. eds. CSHL Press (1999).

Oligosakkarider anses å ha en reduserende ende og en ikke-reduserende ende, hva enten sakkaridet ved den reduserende enden faktisk er et reduserende sukker eller ikke. I overensstemmelse med akseptert nomenklatur blir oligosakkarider skildret heri med den ikke-reduserende enden på venstre side og den reduserende enden på høyre side.

Betegnelsen "sialinsyre" refererer til hvilket som helst medlem av en familie av ni-karbon karboksylerte sukker. Det mest vanlige medlemmet av sialinsyrefamilien er N-acetyl-neuraminsyre (2-keto-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glysero-D-galaktononulopyranos-1-onsyre (ofte forkortet til Neu5Ac, NeuAc eller NANA). Et andre

medlem av familien er N-glykoly-neuraminsyre (Neu5Gc eller NeuGc), hvor N-acetylgruppen av NeuAc er hydroksylert. Et tredje medlem av sialinsyrefamilien er 2-keto-3-deoksy-nonulosonsyre (KDN) (Nadano et al. (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550-11557; Kanamori et al., J. Biol. Chem. 265: 21811-21819 (1990)). Også omfattet er 9-substituerte sialinsyrer slik som en 9-O-C₁-C₆ acyl-Neu5Ac som 9-O-laktyl-Neu5Ac eller 9-O-acetyl-Neu5Ac, 9-deoksy-9-fluor-Neu5Ac og 9-azido-9-deoksy-Neu5Ac. For gjennomgang av sialinsyrefamilien, se f.eks. Varki, Glycobiology 2: 25-40 (1992); Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)). Syntese og anvendelse av sialinsyreforbindelser i en metode for sialylering er beskrevet i internasjonal søknad WO 92/16640, publisert 1. oktober, 1992.

"Peptid" refererer til en polymer hvor monomerene er aminosyrer og er bundet sammen gjennom amidbindinger, alternativt referert til som et polypeptid. I tillegg er unaturlige aminosyrer, for eksempel, β -alanin, fenyglysin og homoarginin også omfattet. Aminosyrer som ikke kodes for av genene kan også anvendes i foreliggende oppfinnelse. Videre kan aminosyrer som har blitt modifisert til å omfatte reaktive grupper, glykosylerings seter, polymerer, terapeutiske grupper, biomolekyler og lignende også anvendes i oppfinnelsen. Alle aminosyrene anvendt i foreliggende oppfinnelse kan være enten D- eller L-isomeren. L-isomeren er generelt foretrukket. I tillegg er også andre peptidomimetika anvendelige i foreliggende oppfinnelse. Som anvendt heri refererer "peptid" til både glykosylerte og ikke-glykosylerte peptider. Også omfattet er peptider som er ufullstendig glykosylert av et system som uttrykker peptidet. For en generell gjennomgang, se, Spatola, A. F., i CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, s. 267 (1983).

Aminosyre- eller nukleinsyresekvensen for et peptid er "homolog" med en annen dersom det er en viss grad av sekvensidentitet mellom de to. Foretrukket vil en homolog sekvens ha minst omtrent 85 % sekvensidentitet med referansesekvensen, foretrukket med minst omtrent 90 % til 100% sekvensidentitet, mer foretrukket med minst omtrent 91 % sekvensidentitet, med minst omtrent 92 % sekvensidentitet, med minst omtrent 93 % sekvensidentitet, med minst omtrent 94 % sekvensidentitet, enda mer foretrukket med minst omtrent 95 % til 99 % sekvensidentitet, foretrukket med minst omtrent 96% sekvensidentitet, med minst omtrent 97 % sekvensidentitet, med minst omtrent 98 % sekvensidentitet, enda mer foretrukket med minst omtrent 99 % sekvensidentitet, og omtrent 100 % sekvensidentitet med referanse aminosyre- eller nukleotidsekvens.

Betegnelsen "peptidkonjugat," refererer til spesier ifølge oppfinnelsen hvor et peptid er konjugert til et modifisert sukker som vist heri.

Betegnelsen "aminosyre" refererer til naturlig forekommende og syntetiske aminosyrer, så vel som aminosyreanaloger og aminosyre-mimetika som fungerer på en måte lik de naturlig forekommende aminosyrene. Naturlig forekommende aminosyrer er

slike som er kodet for av den genetiske koden, så vel som slike aminosyrer som senere modifiseres, f.eks. hydroksyprolin, γ -karboksylglutamat og O-fosfoserin.

Aminosyreanaloger refererer til forbindelser som har samme grunnleggende kjemiske struktur som en naturlig forekommende aminosyre, dvs., et α -karbon som er bundet til et hydrogen, en karboksylgruppe, en aminogruppe og en R-gruppe, f.eks. homoserin, norleucin, metioninsulfoksid, metionin metylsulfonium. Slike analoger har modifiserte R-grupper (f.eks. norleucin) eller modifiserte peptid-ryggrader, men bibeholder samme grunnleggende kjemiske struktur som en naturlig forekommende aminosyre. Aminosyremimetika refererer til kjemiske forbindelser som har en struktur som er forskjellig fra den generelle kjemiske strukturen til en aminosyre, men som fungerer på en måte lik en naturlig forekommende aminosyre.

Som anvendt heri refererer betegnelsen "modifisert sukker" til et naturlig- eller ikke-naturlig forekommende karbohydrat som er enzymatisk tilføyd til en aminosyre- eller en glykosylrest av et peptid i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen. Det modifiserte sukkeret er valgt fra enzymsubstrater omfattende, men ikke begrenset til sukkernukleotider (mono-, di- og trifosfater), aktivert sukker (f.eks. glykosylhalider, glykosylmesylater) og sukkere som hverken er aktivert eller nukleotider. Det "modifiserte sukker" er kovalent funksjonalisert med en "modifiserende gruppe." Anvendelige modifiserende grupper omfatter, men er ikke begrenset til, PEG-grupper, terapeutiske grupper, diagnostiske grupper, biomolekyler og lignende. Den modifiserende gruppen er foretrukket ikke et naturlig forekommende eller et ikke-modifisert karbohydrat. Stedet for funksjonalisering med den modifiserende gruppen blir valgt slik at det ikke forhindrer det "modifiserte sukkeret" fra å bli tilføyd enzymatisk til et peptid.

Betegnelsen "vannløselig" refererer til grupper som har en viss detekterbar grad av oppløselighet i vann. Metoder for å detektere og/eller kvantifisere vannløselighet er velkjent på området. Eksempel på vannløselige polymerer omfatter peptider, sakkarider, poly(eter), poly(aminer), poly(karboksylsyrer) og lignende. Peptider kan ha blandede sekvenser eller være sammensatt av en enkelt aminosyre, f.eks. poly(lysin). Et eksempel på polysakkarid er poly(sialinsyre). Et eksempel på poly(eter) er poly(etylenglykol). Poly(etylenimin) er et eksempel på polyamin, og poly(akryl)syre er en representativ poly(karboksylsyre).

Polymerryggraden av den vannløselige polymeren kan være poly(etylenglykol) (dvs. PEG). Det skal imidlertid forstås at andre beslektede polymerer også er egnet for anvendelse ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse og at anvendelse av betegnelsen PEG eller poly(etylenglykol) er ment å være omfattende ("inclusive") og ikke eksklusiv i dette henseende. Betegnelsen PEG omfatter poly(etylenglykol) i hvilken som helst av dens former, inkludert alkoksy PEG, difunksjonell PEG, flergrenet PEG, forked PEG, forgrenet PEG, pendent PEG (dvs. PEG eller relaterte polymerer som har én eller flere

funksjonelle grupper ragende utover polymerryggraden), eller PEG med nedbrytbare bindinger deri.

Polymer-ryggraden kan være lineær eller forgrenet. Forgrenede polymer-ryggrader er generelt kjent på området. En forgrenet polymer har typisk en sentral gren-kjerne-gruppe og et mangfold av lineære polymerkjeder bundet til den sentrale gren-kjernen. PEG blir vanligvis anvendt i forgrenede former som kan fremstilles ved tilsetning av etylenoksid til forskjellige polyoler, slik som glyserol, pentaerytritol og sorbitol. Den sentrale gren-gruppen kan også være avledet fra flere aminosyrer, slik som lysin. Det forgrenede poly(etylenglykol) kan representeres i generell form som $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ hvor R er kjerne-gruppen, slik som glyserol eller pentaerytritol, og m er antall grener. Flergrende PEG-molekyler, slik som dem beskrevet i US Pat. Nr. 5,932,462, som er inntatt ved referanse heri i sin helhet, kan også anvendes som polymer-ryggraden.

Mange andre polymerer er også egnet for oppfinnelsen. Polymer-ryggrader som er ikke-peptid og vannløselige, med fra 2 til omtrent 300 termini, er spesielt anvendelige i oppfinnelsen. Eksempler på egnede polymerer omfatter, men er ikke begrenset til, andre poly(alkylenglykoler), slik som poly(propylenglykol) ("PPG"), kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol og lignende, poly(oksyetylert polyol), poly(olefinisk alkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(hydroksypropylmetakrylamid), poly(α -hydroksysyre), poly(vinylalkohol), polyfosfazen, polyoksazolin, poly(N-akryloylmorfolin), slik som beskrevet i US Pat. Nr. 5,629,384, som er inntatt ved referanse heri i sin helhet, og kopolymerer, terpolymerer, og blandinger derav. Selv om molekylvekten av hver kjede av polymer-ryggraden kan variere, er den typisk i området fra omtrent 100 Da til omtrent 100,000 Da, ofte fra omtrent 6,000 Da til omtrent 80,000 Da.

"Arealet under kurven" eller "AUC", som anvendt heri i forbindelse med administrering av et peptidmedikament til en pasient, er definert som totalt areal under kurven som beskriver konsentrasjonen av medikament i systemisk sirkulasjon hos pasienten som en funksjon av tiden fra null til uendelig.

Betegnelsen "halveringstid" eller " $t_{1/2}$ ", som anvendt heri i sammenheng med administrering av et peptid-medikament til en pasient, er definert som tiden nødvendig for å redusere konsentrasjon av et medikament i plasma hos en pasient til det halve. Det kan være mer enn én halveringstid forbundet med peptid-medikamentet avhengig av multiple clearance-mekanismer, redistribusjon, og andre mekanismer velkjent på området. Vanligvis blir alfa og beta halveringstider definert slik at alfa-fasen er forbundet med redistribusjon, og beta-fasen er forbundet med clearance. Imidlertid kan det, med proteinmedikamenter som, for det meste, er begrenset til blodbanen, være minst to clearance halveringstider. For noen glykosylerte peptider, kan hurtig beta-fase clearance medieres gjennom reseptorer på makrofager, eller endotelceller som gjenkjenner terminal galaktose, N-acetylgalaktosamin, N-acetylglukosamin, mannose, eller fukose.

Langsommere beta-fase clearance kan finne sted gjennom glomerulær filtrering i nyrene for molekyler med en effektiv radius < 2 nm (omtrent 68 kD) og/eller spesifikt eller ikke-spesifikt opptak og metabolisme i vev. Glyko-pegylering kan dekke terminale sukkere (f.eks. galaktose eller N-acetylgalaktosamin) og derved blokkere hurtig alfa-fase clearance gjennom reseptorer som gjenkjenner disse sukkere. Det kan også gi en større effektiv radius og derved redusere volumet av distribusjon og vevsopptak, hvilket derved forlenger sen beta-fase. Den nøyaktige påvirkning av glykopegylering på alfa-fase og beta-fase halveringstider varierer følgelig avhengig av størrelse, glykosyleringsstatus, og andre parametere, som er velkjent på området. Ytterligere forklaring av "halveringstid" finnes i Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin og RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Amsterdam, s. 101-120).

Betegnelsen "glyko-konjugering," som anvendt heri, refererer til enzymatisk mediert konjugering av en modifisert sukker-spesie til en aminosyre eller glykosylrest av et polypeptid, f.eks. et G-CSF-peptid ifølge foreliggende oppfinnelse. En undergruppe av "glyko-konjugering" er "glyko-pegylering," hvor den modifierende gruppen av det modifiserte sukker er poly(etylenglykol), og alkylderivat (f.eks. m-PEG) eller reaktivt derivat (f.eks. H_2N -PEG, $HOOC$ -PEG) derav.

Betegnelsene "storskala" og "industriell skala" anvendes om hverandre og refererer til en reaksjonssyklus som produserer minst omtrent 250 mg, foretrukket minst omtrent 500 mg, og mer foretrukket minst omtrent 1 gram glykokonjugat ved fullføring av en enkelt reaksjonssyklus.

Betegnelsen, "glykosyl bindingsgruppe," som anvendt heri refererer til en glykosylrest til hvilken en modifierende gruppe (f.eks. PEG-gruppe, terapeutisk gruppe, biomolekyl) er kovalent bundet; glykosyl bindingsgruppen forbinder den modifierende gruppen til resten av konjugatet. I fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen blir "glykosyl bindingsgruppen" kovalent bundet til et glykosylert eller uglykosylert peptid, hvilket derved binder midlet til en aminosyre og/eller glykosylrest på peptidet. En "glykosyl bindingsgruppe" er generelt avledet fra et "modifisert sukker" ved enzymatisk binding av det "modifiserte sukkeret" til en aminosyre- og/eller glykosylrest av peptidet. Glykosyl bindingsgruppen kan være en sakkarid-avledet struktur som er degradert under dannelsen av modifierende gruppe-modifisert sukker-kassetten (f.eks. oksidasjon $\rightarrow$ "dannelse av Schiff-base $\rightarrow$ reduksjon), eller glykosyl bindingsgruppen kan være intakt. En "intakt glykosyl bindingsgruppe" refererer til en bindingsgruppe som er avledet fra en glykosylgruppe hvor sakkaridmonomeren som binder den modifierende gruppen til resten av konjugatet ikke er degradert, f.eks. oksidert, f.eks. ved natriummetaperjodat. "Intakte glykosyl bindingsgrupper" ifølge oppfinnelsen kan være avledet fra et naturlig forekommende oligosakkarid ved tilføyelse av glykosylenhet(er) eller fjerning av én eller

flere glykosylenheter fra en utgangs-sakkaridstruktur.

Betegnelsen "målrettet gruppe," som anvendt heri, refererer til spesier som selektivt vil lokaliseres i et bestemt vev eller område av kroppen. Lokaliseringen blir mediert ved spesifikk gjenkjennelse av molekulære determinanter, molekylstørrelse av det målrettede midlet eller konjugatet, ioniske interaksjoner, hydrofobe interaksjoner og lignende. Andre mekanismer for målretting av et middel til et bestemt vev eller område er kjent for fagfolk på området. Eksempler på målrettede grupper omfatter antistoffer, antistoff-fragmenter, transferrin, HS-glykoprotein, koagulasjonsfaktorer, serumproteiner, β -glykoprotein, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO og lignende.

Som anvendt heri betyr "terapeutisk gruppe" hvilket som helst middel anvendelig for behandling omfattende, men ikke begrenset til, antibiotika, antiinflammatoriske midler, antitumormedikamenter, cytotoksiner og radioaktive midler. "Terapeutisk gruppe" omfatter prodruger av bioaktive midler, konstruksjoner hvor mer enn én terapeutisk gruppe er bundet til en bærer, f.eks. multivalente midler. Terapeutisk gruppe omfatter også proteiner og konstruksjoner som omfatter proteiner. Eksempler på proteiner omfatter, men er ikke begrenset til, granulocyt-kolonistimulerende faktor (GCSF), granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor (GMCSF), interferon (f.eks. Interferon- α , - β , - γ), Interleukin (f.eks. Interleukin II), serumproteiner (f.eks. Faktor VII, VIIa, VIII, IX og X), humant korion-gonadotropin (HCG), follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) og antistoff fusjonsproteiner (f.eks. tumornekrosefaktor-reseptor ((TNFR)/Fc domene-fusjonsprotein)).

Som anvendt heri omfatter "farmasøytisk akseptabel bærer" hvilket som helst materiale som, når den kombineres med konjugatet, bibeholder konjugatets aktivitet og er ikke-reaktivt med pasientens immunsystemer. Eksempler omfatter, men er ikke begrenset til, hvilke som helst av standard farmasøytiske bærere slik som en fosfatbufret saltoppløsning, vann, emulsjoner slik som olje/vann-emulsjon, og forskjellige typer av fuktemidler. Andre bærere kan også omfatte sterile oppløsninger, tabletter inkludert overtrukne tabletter og kapsler. Slike bærere inneholder typisk hjelpestoffer slik som stivelse, melk, sukker, visse typer leire, gelatin, stearinsyre eller salter derav, magnesium eller kalsiumstearat, talkum, vegetabilsk fett eller oljer, gummi, glykoler, eller andre kjente hjelpestoffer. Slike bærere kan også omfatte smaks- og fargetilsetninger eller andre bestanddeler. Preparater omfattende slike bærere blir formulert ved velkjente konvensjonelle metoder.

Som anvendt heri betyr "administrering," oral administrering, administrering som et suppositorium, topisk kontakt, intravenøs, intraperitoneal, intramuskulær, intralesjonal, intranasal eller subkutan administrering, eller implantasjon av en anordning med langsom frigjøring f.eks. en mini-osmotisk pumpe, til pasienten. Administrering finner sted ved hvilken som helst administrasjonsvei inkludert parenteral, og

transmukosal (f.eks. oral, nasal, vaginal, rektal, eller transdermal). Parenteral administrering omfatter, f.eks. intravenøs, intramuskulær, intra-arteriell, intradermal, subkutan, intraperitoneal, intraventrikulær, og intrakraniell. Når injeksjonen finner sted for å behandle en tumor, f.eks. inducere apoptose, kan administrering dessuten finne sted direkte til tumoren og/eller inn i vev som omgir tumoren. Andre metoder for levering omfatter, men er ikke begrenset til, anvendelse av liposomale formuleringer, intravenøs infusjon, transdermale plastery, osv.

Betegnelsen "forbedring" eller "forbedre" refererer til hvilket som helst tegn på suksess med behandling av en patologi eller tilstand, inkludert hvilket som helst objektivt eller subjektivt parameter slik som demping, remisjon eller reduksjon av symptomer eller en forbedring av en pasients fysiske eller mentale velvære. Forbedring av symptomer kan være basert på objektive eller subjektive parametere; inkludert resultatene av en fysisk undersøkelse og/eller en psykiatrisk evaluering.

Betegnelsen "behandling" refererer til "å behandle" eller "behandling av" en sykdom eller lidelse inkludert å forhindre sykdommen eller lidelsen fra å oppstå i et dyr som kan være predisponert for sykdommen men enda ikke fornemmer eller oppviser symptomer på sykdommen (profylaktisk behandling), hemme sykdommen (forsinke eller stanse utvikling derav), gi lindring fra symptomene eller bivirkningene av sykdommen (inkludert palliativ behandling), og lindre sykdommen (bevirke regresjon av sykdommen).

Betegnelsen "effektiv mengde" eller "en mengde effektiv for å" eller en "terapeutisk effektiv mengde" eller hvilken som helst grammatisk ekvivalent betegnelse betyr mengden som, ved administrering til et dyr for behandling av en sykdom, er tilstrekkelig til å bevirke behandling for denne sykdommen.

Betegnelsen "isolert" refererer til et materiale som er hovedsakelig eller vesentlig fritt for komponenter som anvendes for fremstilling av materialet. For peptidkonjugater ifølge oppfinnelsen refererer betegnelsen "isolert" til materiale som er hovedsakelig eller vesentlig fritt for komponenter som normalt ledsager materialet i blandingen anvendt for fremstilling av peptidkonjugatet. "Isolert" og "rent" anvendes om hverandre. Isolerte peptidkonjugater ifølge oppfinnelsen har typisk et nivå av renhet foretrukket uttrykt som et område. Den nedre grensen for området for renhet for peptidkonjugatene er omtrent 60 %, omtrent 70 % eller omtrent 80 % og den øvre grensen for området for renhet er omtrent 70 %, omtrent 80 %, omtrent 90 % eller mer enn omtrent 90%.

Når peptidkonjugatene er mer enn omtrent 90 % rene, blir renheten også foretrukket uttrykt som et område. Den nedre grensen for området for renhet er omtrent 90 %, omtrent 92 %, omtrent 94 %, omtrent 96 % eller omtrent 98 %. Den øvre

grensen for området for renhet er omtrent 92 %, omtrent 94 %, omtrent 96 %, omtrent 98 % eller omtrent 100% renhet.

Renhet blir bestemt ved hvilken som helst analysemetode kjent på området (f.eks. bandintensitet på en sølvfarget gel, polyakrylamidgelelektroforese, HPLC eller en lignende metode).

"Hovedsakelig hvert medlem av populasjonen," som anvendt heri, beskriver en egenskap av en populasjon av peptidkonjugater ifølge oppfinnelsen hvor en valgt prosentandel av de modifiserte sukkere tilføyd til et peptid er tilføyd til multiple, identiske akseptorseter på peptidet. "Hovedsakelig hvert medlem av populasjonen" angår "homogeniteten" av setene på peptidet konjugert til et modifisert sukker og refererer til konjugater ifølge oppfinnelsen, som er minst omtrent 80 %, foretrukket minst omtrent 90 % og mer foretrukket minst omtrent 95 % homogene. "Homogenitet" refererer til den strukturelle ensartethet gjennom en populasjon av akseptorgrupper til hvilken de modifiserte sukkere er konjugert. I et peptidkonjugat ifølge oppfinnelsen i hvilket hver modifisert sukkergruppe er konjugert til et akseptorsete som har samme struktur som akseptorsetet til hvilket hvert annet modifisert sukker er konjugert, sies følgelig peptidkonjugatet å være omtrent 100 % homogent. Homogenitet blir typisk uttrykt som et område. Den nedre grensen for området for homogenitet for peptidkonjugatene er omtrent 60%, omtrent 70 % eller omtrent 80 % og den øvre grensen for området for renhet er omtrent 70 %, omtrent 80%, omtrent 90 % eller mer enn omtrent 90 %.

Når peptidkonjugatene er mer enn eller lik omtrent 90 % homogene, blir deres homogenitet også foretrukket uttrykt som et område. Den nedre grensen for området for homogenitet er omtrent 90 %, omtrent 92 %, omtrent 94 %, omtrent 96 % eller omtrent 98 %. Den øvre grensen for området for renhet er omtrent 92 %, omtrent 94 %, omtrent 96 %, omtrent 98 % eller omtrent 100 % homogenitet. Renheten av peptidkonjugatene blir typisk bestemt ved én eller flere metoder kjent for fagfolk på området, f.eks. væskechromatografi-massespektrometri (LC-MS), "matrix assisted laser desorption mass time of flight" spektrometri (MALDITOF), kapillærelektroforese, og lignende.

"Hovedsakelig ensartet glykoform" eller et "hovedsakelig ensartet glykosyleringsmønster," refererer, ved henvisning til en glykopeptid-spesie, til prosentandelen av akseptorgrupper som er glykosylert ved glykosyltransferasen av interesse (f.eks. fukosyltransferase). For eksempel eksisterer det med hensyn til en α 1,2 fukosyltransferase, et hovedsakelig ensartet fukosyleringsmønster dersom hovedsakelig alle (som definert nedenfor) Gal β 1,4-GlcNAc-R og sialylerte analoger derav er fukosylert i et peptidkonjugat ifølge oppfinnelsen. I de fukosylerte strukturene vist heri er Fuc-GlcNAc-bindingen generelt α 1,6 eller α 1,3, hvor α 1,6 er generelt foretrukket. Det

vil forstås av fagfolk på området at utgangsmaterialet kan inneholde glykosylerte akseptorgrupper (f.eks. fukosylert Gal β 1,4-GlcNAc-R-grupper). Følgelig vil den beregnede prosent glykosylering omfatte akseptorgrupper som er glykosylert ved fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, så vel som slike akseptorgrupper som allerede er glykosylert i utgangsmaterialet.

Betegnelsen "hovedsakelig" i ovennevnte definisjoner av "hovedsakelig ensartet" betyr generelt at minst omtrent 40 %, minst omtrent 70 %, minst omtrent 80 %, eller mer foretrukket minst omtrent 90 %, og enda mer foretrukket minst omtrent 95 % av akseptorgruppene for en bestemt glykosyltransferase er glykosylert.

Når substituentgrupper er angitt ved deres konvensjonelle kjemiske formel, skrevet fra venstre mot høyre, omfatter de i like stor grad de kjemiske identiske substituentene som ville fremgå ved å skrive strukturen fra høyre mot venstre, f.eks. -CH₂O- er også ment å anføre -OCH₂-.

Betegnelsen "alkyl" betyr, i seg selv eller som del av en annen substituent, dersom ikke angitt på annen måte, en lineær eller forgrenet kjede eller syklisk hydrokarbonradikal eller kombinasjon derav, som kan være fullstendig mettet, mono- eller flerumettet og kan omfatte di- og flervalente radikaler, som har det angitte antall karbonatomer (dvs. C₁-C₁₀ betyr ett til ti karboner). Eksempler på mettede hydrokarbonradikaler omfatter, men er ikke begrenset til, grupper slik som metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, sec-butyl, sykloheksyl, (sykloheksyl)metyl, syklopropylmetyl, homologer og isomerer av, for eksempel, n-pentyl, n-heksyl, n-heptyl, n-oktyl, og lignende. En umettet alkylgruppe er en som har én eller flere dobbeltbindinger eller trippelbindinger. Eksempler på umettede alkylgrupper omfatter, men er ikke begrenset til, vinyl, 2-propenyl, krotyl, 2-isopentenyl, 2-(butadienyl), 2,4-pentadienyl, 3-(1,4-pentadienyl), etynyl, 1- og 3-propynyl, 3-butylnyl, og høyere homologer og isomerer. Betegnelsen "alkyl" er, dersom ikke angitt på annen måte, også ment å omfatte slike derivater av alkyl definert i nærmere detaljer nedenfor, slik som "heteroalkyl." Alkylgrupper som er begrenset til hydrokarbongrupper betegnes "homoalkyl".

Betegnelsen "alkylen" betyr, i seg selv eller som del av en annen substituent, et divalent radikal avledet fra et alkan som eksemplifisert, men ikke begrenset, ved -CH₂CH₂CH₂CH₂- og omfatter videre gruppene beskrevet nedenfor som "heteroalkylen." En alkyl (eller alkylen)-gruppe vil typisk ha fra 1 til 24 karbonatomer, hvor slike grupper som har 10 eller færre karbonatomer er foretrukket i foreliggende oppfinnelse. Et "lavere alkyl" eller "lavere alkylen" er en alkyl eller alkylengruppe med kortere kjede, og har generelt åtte eller færre karbonatomer.

Betegnelsene "alkoksy," "alkylamino" og "alkyltio" (eller tioalkoksy) anvendes i deres konvensjonelle betydning og refererer til slike alkylgrupper som er bundet til

resten av molekylet gjennom henholdsvis et oksygenatom, en aminogruppe, eller et svovelatom.

Betegnelsen "heteroalkyl" betyr i seg selv eller som del av en annen betegnelse, dersom ikke angitt på annen måte, en stabil lineær eller forgrenet kjede eller syklisk hydrokarbonradikal eller kombinasjoner derav, bestående av det angitte antall karbonatomer og minst ett heteroatom valgt fra gruppen bestående av O, N, Si og S, og hvori nitrogen og svovelatomene eventuelt kan være oksidert og heteroatomet nitrogen eventuelt kan være kvaternisert. Heteroatom(ene) O, N og S og Si kan være plassert ved hvilken som helst indre stilling i heteroalkylgruppen eller ved stillingen ved hvilken alkylgruppen er bundet til resten av molekylet. Eksempler omfatter, men er ikke begrenset til, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ og $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Opptil to heteroatomer kan være etterfølgende slik som for eksempel $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ og $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. På lignende måte betyr betegnelsen "heteroalkylen" i seg selv eller som del av en annen substituent et divalent radikal avledet fra heteroalkyl, som eksemplifisert, men ikke begrenset, ved $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ og $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. For heteroalkylengrupper kan heteroatomer også innta den ene av eller begge de terminale endene av kjeden (f.eks. alkylendioxy, alkylendiamino, alkylendiamino, og lignende). Enda videre er, for alkylen og heteroalkylen bindingsgrupper, ingen orientering av bindingsgruppen innbefattet av retningen hvor formelen for bindingsgruppen er skrevet. For eksempel representerer formelen $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ både $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ og $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$.

Betegnelsene "sykloalkyl" og "heterosykloalkyl" representerer i seg selv eller i kombinasjon med andre betegnelser, dersom ikke angitt på annen måte, sykliske versjoner av henholdsvis "alkyl" og "heteroalkyl". I tillegg kan, for heterosykloalkyl, et heteroatom innta stillingen ved hvilken den heterosykliske gruppen er bundet til resten av molekylet. Eksempler på sykloalkyl omfatter, men er ikke begrenset til, syklopentyl, sykloheksyl, 1-sykloheksenyl, 3-sykloheksenyl, sykloheptyl, og lignende. Eksempler på heterosykloalkyl omfatter, men er ikke begrenset til, 1-(1,2,5,6-tetrahydropyridyl), 1-piperidinyll, 2-piperidinyll, 3-piperidinyll, 4-morfolinyll, 3-morfolinyll, tetrahydrofuran-2-yl, tetrahydrofuran-3-yl, tetrahydropyridin-2-yl, tetrahydropyridin-3-yl, 1-piperazinyll, 2-piperazinyll, og lignende.

Betegnelsene "halo" eller "halogen" betyr i seg selv eller som del av en annen substituent, dersom ikke annerledes angitt, et fluor, klor, brom eller iodatom. I tillegg er betegnelser slik som "haloalkyl," ment å omfatte monohaloalkyl og polyhaloalkyl. For eksempel er betegnelsen "halo(C_1-C_4)alkyl" ment å omfatte, men er ikke begrenset til, trifluormetyl, 2,2,2-trifluoretyl, 4-klorbutyl, 3-brompropyl, og lignende.

Betegnelsen "aryl" betyr, dersom ikke angitt på annen måte, en flerumettet, aromatisk substituent som kan være en enkelt ring eller flere ringer (foretrukket fra 1 til 3 ringer), som er fusjonert sammen eller forbundet kovalent. Betegnelsen "heteroaryl" refererer til arylgrupper (eller ringer) som inneholder fra ett til fire heteroatomer valgt fra N, O og S, hvori nitrogen- og svovelatomene eventuelt er oksidert og nitrogenatomt(ene) eventuelt er kvaternisert. En heteroarylgruppe kan være bundet til resten av molekylet gjennom et heteroatom. Ikke-begrensende eksempler på aryl og heteroarylgrupper omfatter fenyl, 1-naftyl, 2-naftyl, 4-bifenyl, 1-pyrrolyl, 2-pyrrolyl, 3-pyrrolyl, 3-pyrazolyl, 2-imidazolyl, 4-imidazolyl, pyrazinyl, 2-oksazolyl, 4-oksazolyl, 2-fenyl-4-oksazolyl, 5-oksazolyl, 3-isoksazolyl, 4-isoksazolyl, 5-isoksazolyl, 2-tiazolyl, 4-tiazolyl, 5-tiazolyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-tienyl, 3-tienyl, 2-pyridyl, 3-pyridyl, 4-pyridyl, 2-pyrimidyl, 4-pyrimidyl, 5-benzotiazolyl, purinyl, 2-benzimidazolyl, 5-indolyl, 1-isokinolyl, 5-isokinolyl, 2-kinoksalinyl, 5-kinoksalinyl, 3-kinolyl, tetrazolyl, benzo[b]furanyl, benzo[b]tienyl, 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioksin-6-yl, benzo[1,3]dioksol-5-yl og 6-kinolyl. Substituenten for hver av de ovenfor angitte aryl og heteroaryl ringsystemene er valgt fra gruppen av akseptable substituenten beskrevet nedenfor.

For korthets skyld omfatter betegnelsen "aryl" ved anvendelse i kombinasjon med andre betegnelser (f.eks. aryloksy, aryltioksy, arylalkyl) både aryl og heteroarylringer som definert ovenfor. Følgelig er betegnelsen "arylalkyl" ment å omfatte slike radikaler hvor en arylgruppe er bundet til en alkylgruppe (f.eks. benzyl, fenetyl, pyridylmetyl og lignende) inkludert slike alkylgrupper hvor et karbonatom (f.eks. en metylengruppe) har blitt erstattet av, for eksempel, et oksygenatom (f.eks. fenoksymetyl, 2-pyridyloksymetyl, 3-(1-naftyloksy)propyl, og lignende).

Hver av de ovennevnte betegnelsene (f.eks. "alkyl," "heteroalkyl," "aryl" og "heteroaryl") er ment å omfatte både substituerte og usubstituerte former av det angitte radikalet. Foretrukne substituenten for hver type av radikal er gitt nedenfor.

Substituenten for alkyl- og heteroalkylradikaler (inkludert slike grupper ofte referert til som alkylen, alkenyl, heteroalkylen, heteroalkenyl, alkynyl, sykloalkyl, heterosykloalkyl, sykloalkenyl og heterosykloalkenyl) blir generisk referert til som "alkylgruppe-substituenten," og de kan være én eller flere av mange forskjellige grupper valgt fra, men ikke begrenset til: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, -halogen, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR''R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ og $-NO_2$ i et antall i området fra null til $(2m'+1)$, hvor m' er totalt antall karbonatomer i et slikt radikal. R' , R'' , R''' og R'''' refererer hver foretrukket uavhengig til hydrogen, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl, f.eks. aryl substituert med 1-3 halogener, substituerte eller usubstituerte alkyl-, alkoksy- eller tioalkoksygrupper eller arylalkylgrupper. Når en

forbindelse ifølge oppfinnelsen omfatter mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som om hver er R', R'', R''' og R''''-grupper når mer enn én av disse gruppene er til stede. Når R' og R'' er bundet til samme nitrogenatom, kan de kombineres med nitrogenatomet til å danne en 5-, 6-, eller 7-leddet ring. For eksempel er -NR'R'' ment å omfatte, men ikke begrenset til, 1-pyrrolidinyl og 4-morfolinyl. Fra diskusjonen om substituenten ovenfor vil fagfolk på området forstå at betegnelsen "alkyl" er ment å omfatte grupper omfattende karbonatomer bundet til grupper andre enn hydrogener, slik som haloalkyl (f.eks. -CF₃ og -CH₂CF₃) og acyl (f.eks. -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, og lignende).

I likhet med substituentene beskrevet for alkylradikalet blir substituenten for aryl og heteroarylgruppene generisk referert til som "arylgruppe-substituenten." Substituentene er valgt fra for eksempel: halogen, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halogen, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN og -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluor(C₁-C₄)alkoksy, og fluor(C₁-C₄)alkyl, i et antall i området fra null til det totale antallet åpne valenser i det aromatiske ringsystemet; og hvor R', R'', R''' og R'''' er foretrukket uavhengig valgt fra hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl og substituert eller usubstituert heteroaryl. Når en forbindelse ifølge oppfinnelsen omfatter mer enn én R-gruppe, for eksempel, er hver av R-gruppene uavhengig valgt som om hver er R', R'', R''' og R'''' grupper når mer enn én av disse gruppene er til stede. I skjemaene som følger representerer symbolet X "R" som beskrevet ovenfor.

To av substituentene på nærliggende atomer av aryl- eller heteroarylringen kan eventuelt erstattes med en substituent ifølge formelen -T-C(O)-(CRR')_u-U-, hvori T og U uavhengig er -NR-, -O-, -CRR'- eller en enkeltbinding, og u er et helt tall fra 0 til 3. Alternativt kan eventuelt to av substituentene på nærliggende atomer av aryl eller heteroarylringen erstattes av en substituent ifølge formelen -A-(CH₂)_r-B-, hvori A og B er uavhengig -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- eller en enkeltbinding og r er et helt tall fra 1 til 4. En av enkeltbindingene i den nye ringen dannet på denne måten kan eventuelt erstattes med en dobbeltbinding. Alternativt kan eventuelt to av substituentene på nærliggende atomer av aryl eller heteroarylringen erstattes av en substituent ifølge formelen -(CRR')_z-X-(CR''R''')_d-, hvor z og d uavhengig er hele tall fra 0 til 3, og X er -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, eller -S(O)₂NR'-. Substituentene R, R', R'' og R''' er foretrukket uavhengig valgt fra hydrogen eller substituert eller usubstituert (C₁-C₆)alkyl.

Som anvendt heri er betegnelsen "heteroatom" ment å omfatte oksygen (O), nitrogen (N), svovel (S) og silisium (Si).

"Stamcelle" refererer til en "generisk" eller uddifferensiert celle som kan lage kopier av seg selv i det uendelige, og kan bli spesialisert for forskjellige vev i kroppen. Stamceller kan gi opphav til normale blodkomponenter inkludert røde blodlegemer, hvite blodlegemer og blodplater. Stamceller er normalt lokalisert i benmargen og i blodet og kan høstes for transplantasjon.

Betegnelsen "hematopoetisk celle" refererer til en celle assosiert med dannelsen av blodceller. Denne betegnelsen kan anvendes om hverandre med betegnelsen "stamcelle" som definert ovenfor.

Som anvendt heri er betegnelsen "mobilisering av stamcelleproduksjon" ment å omfatte alle prosesser som øker antallet av stamceller *in vivo* eller *in vitro*. Det økte antallet av stamceller kan være resultat av en økning i antallet av progenitorceller. Også omfattet av betegnelsen er prosessen med transport av stamceller til og fra benmargen.

På lignende måte er betegnelsen "mobilisering av produksjon av hematopoetiske celler" ment å omfatte alle prosesser som øker antallet av hematopoetiske celler *in vivo* eller *in vitro*. Det økte antallet av hematopoetiske celler kan skyldes et økt antall progenitorceller, en økning i hastighet av modning av pluripotente stamceller til hematopoetiske celler, og en eller annen kombinasjon derav. Også omfattet innenfor betegnelsen er prosessen med transport av hematopoetiske celler til og fra benmargen.

Betegnelsen "granulocytter" refererer til hvite blodceller karakterisert ved tilstedeværelse av av granuler i deres cytoplasma.

Introduksjon

Foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåter for administrering av glykopeglylert G-CSF for forebygging, lindring og behandling av sykdommer og lidelser relatert til hematopoetisk defisitt som ofte er et resultat av kjemoterapi, strålebehandling og trombocytopeni. G-CSF virker primært på benmargen ved å øke produksjonen av inflammatoriske leukocytter og ytterligere funksjoner som et endokrint hormon for å initiere etterfylling av nøytrofiler brukt under inflammatoriske funksjoner. G-CSF har også kliniske anvendelser ved benmargserstatning etter kjemoterapi.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et konjugat omfattende granulocytt-kolonistimulerende faktor (G-CSF). Oppfinnelsen omfatter også konjugater omfattende glykosylerte og uglykosylerte peptider med granulocytt-kolonistimulerende aktivitet. Konjugatene kan modifiseres ytterligere ved videre konjugering med forskjellige spesier slik som terapeutiske grupper, diagnostiske grupper, målrettede grupper og lignende. For G-CSF-konjugater beskrevet heri kan en polymerisk modifierende gruppe være kovalent bundet til G-CSF-peptidet ved en glykosyl eller aminosyrerest av G-CSF-peptidet,

foretrukket gjennom en glykosyl bindingsgruppe. Den polymeriske modifierende gruppen er en vannløselig polymer som er poly(etylenglykol).

I eksempler på utførelsesformer kan G-CSF-peptidet som definert i kravene administreres til pasienter med henblikk på å forebygge infeksjon hos kreftpasienter som gjennomgår strålebehandling, kjemoterapi, og benmargstransplantasjon, for å mobilisere progenitorceller for oppsamling i perifert blod progenitorcelle transplantasjoner, for behandling av alvorlig kronisk eller relativ leukopeni, uavhengig av årsak, og for å understøtte behandling av pasienter med akutt myeloid leukemi.

I én utførelsesform kan G-CSF-peptidkonjugatet som definert i kravene administreres til en pasient for å øke hematopoese. Hematopoese er prosessen hvor forløperceller utvikles til modne blodceller, inkludert røde blodlegemer, hvite blodlegemer og blodplater. Normal hematopoese koordineres av mange forskjellige regulatorer inkludert glykoproteiner slik som kolonistimulerende faktorer. Slike regulatorer modulerer overlevelse, proliferasjon og differensiering av progenitor- og forløperceller og aktiveringstilstanden av modne celler. Når hematopoese kompromitteres, er resultatet en reduksjon i produksjon av blodlegemer og blodplater, hvilket fører til kompromittert immunitet og manglende evne til leging av sår og fra infeksjoner.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter og preparater for stimulering av hematopoese hos en pasient. Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen omfatter trinnet med å administrere til pasienten en effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, som definert i kravene.

I ett aspekt omfatter stimulering av hematopoese å øke antallet av hematopoetiske progenitorceller hos en pasient med det resultatet at antall modne hematopoetiske celler (blodceller) også økes. Hematopoetiske progenitorceller fraktes til og holdes tilbake i benmargen, hvor de kan modnes til å bli røde og hvite blodlegemer. Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen for stimulering av antallet av hematopoetiske progenitorceller omfatter trinnet med å administrere til en pasient en effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. I én utførelsesform er de hematopoetiske progenitorcellene økt ved anvendelse av peptidet CD34+ celler.

Myelosuppresjon

Myelosuppresjon er en reduksjon i produksjonen av blodceller. Normalt blod inneholder et stort antall celler, inkludert røde blodlegemer for å frakte oksygen og hvite

blodlegemer for å bekjempe infeksjoner. Normalt blod inneholder også blodplater, små cellefragmenter som initierer blodkoagulasjon. Disse cellene og fragmenter blir produsert i beinmargen, en substans som finnes i sentrum av noen bein. Frisk benmarg produserer store mengder røde blodlegemer, hvite blodlegemer, og blodplater hver dag. Ved myelosuppresjon produserer benmargen for få av disse cellene. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter og preparater for behandling, lindring og forebygging av myelosuppresjon.

Ett karakteristisk trekk ved myelosuppresjon er kompromittert produksjon av hvite blodlegemer hos en pasient. Slik kompromittert produksjon av hvite blodlegemer kan skyldes visse typer behandling, spesielt kreftbehandlinger slik som kjemoterapi og strålebehandling. Kompromittert produksjon av hvite blodlegemer kan også skyldes lidelser slik som idiopatisk trombocytopenisk purpura.

Lidelser som skyldes myelosuppresjon omfatter nøytropeni (inkludert febril nøytropeni) og trombocytopeni. Nøytropeni er en tilstand karakterisert ved en unormal reduksjon i antall nøytrofiler (den mest vanlige typen av hvite blodlegemer) i blodet. Reduksjonen kan være relativ eller absolutt. I ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for behandling av nøytropeni hos et pattedyr. Disse fremgangsmåtene omfatter trinn for administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av G-CSF-konjugater ifølge oppfinnelsen. G-CSF har blitt vist å påvirke febril nøytropeni og mortalitet hos voksne kreftpasienter. (Kuderer et al, J. Clin. Onc. (2007), 25(21):3158-67).

Trombocytopeni er en sykdom hvor antallet blodplater i blodet er unormalt lavt og er ofte assosiert med unormal blødning. Fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen omfatter behandling av trombocytopeni hos et pattedyr. Disse fremgangsmåtene omfatter trinn for administrering av en farmasøytisk effektiv mengde av G-CSF-konjugater ifølge oppfinnelsen. Som anvendt heri omfatter betegnelsen trombocytopeni lidelser med kjent opprinnelse så vel som idiopatisk trombocytopeni. Trombocytopeni og idiopatisk trombocytopeni blir også referert til heri som "trombocytopenisk purpura" og "idiopatisk trombocytopenisk purpura".

Stamcellemobilisering

En måte å bekjempe myelosuppresjon på er å mobilisere stamcelleproduksjon. Mobilisering av stamcelleproduksjon omfatter å øke antallet av stamceller, omfattende antallet av hematopoetiske progenitorceller og antallet av granulocytter, inkludert nøytrofiler og eosinofiler. Mobilisering av stamcelleproduksjon omfatter også å øke transport av stamceller fra benmargen inn i perifert blod. Slik mobilisering letter høsting

av stamceller fra en donor, ettersom perifert blod er lettere tilgjengelig enn benmarg. I ett aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for mobilisering av stamcelleproduksjon hos en pasient.

I et annet aspekt blir myelosuppresjon forebygget, lindret og behandlet ved anvendelse av fremgangsmåter og preparater ifølge foreliggende oppfinnelse ved mobilisering av hematopoetiske progenitorceller hos en pasient. Mobilisering av hematopoetiske progenitorceller omfatter å øke antallet av hematopoetiske progenitorceller så vel som å øke transport av cellene til og fra benmargen.

Hematopoetiske progenitorceller, slik som CD34+ celler, utvikles og differensierer til komponenter i blodet, det vil si røde og hvite blodlegemer. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter for mobilisering av hematopoetiske progenitorceller hos en pasient som omfatter trinnet med å administrere til pasienten: (i) et første preparat omfattende en forbindelse ifølge formel (1) som er 1,1'-[1,4-fenylene-bis-(metylen)-bis-1,4,8,11-tetraazasyklotetradekan (AMD3100), og n(2) et andre preparat omfattende et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. I én utførelsesform blir det første preparatet og det andre preparatet administrert til pasienten sekvensielt og i hvilken som helst rekkefølge. I en annen utførelsesform blir det første preparatet og det andre preparatet administrert samtidig. I én utførelsesform blir begge preparatene administrert til pasienten subkutant.

AMD3100 er et bicyclamderivat som har blitt vist å mobilisere et betydelig antall CD34+ celler inn i sirkulasjonen hos både normale subjekter og hos pasienter med kreft. (Liles et al, Blood, (2003), 102:2728-30; Devine et al, J. Clin. Oncol, (2004), 22:1095-1102). Studier har vist at ved å kombinere AMD3100 med en ikke-glykosylert form av G-CSF mobiliseres et høyere antall av CD34+ celler inn i sirkulasjonen enn med G-CSF alene. (Flomenberg et al., Blood, (2005), 106(5): 1867-1874).

I én utførelsesform blir stamcelleproduksjon mobilisert hos en pasient som vil tjene som en beinmargsdonor eller donor av hematopoetiske celler. Donoren gis et peptidkonjugat, som beskrevet ovenfor. Stamceller fra donoren øker i antall og mobiliseres til å bevege seg fra benmargen inn i perifert blod. Slike celler blir deretter enkelt isolert fra donoren ved anvendelse av metoder kjent på området. Donoren i slike utførelsesformer kan være den samme som mottakeren av benmargen eller de hematopoetiske cellene (autolog donor), eller donoren kan være en pasient som ikke er mottakeren (allogen donor).

I et annet aspekt tilveiebringes peptidkonjugater ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med minst ett kjemoterapeutisk middel.

Benmargstransplantasjoner

I noen aspekter tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter og preparater for mobilisering av stamcelleproduksjon hos en mottaker ved benmargstransplantasjon. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til mottakeren en mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. Peptidet kan administreres til mottakeren før transplantasjon av benmargen, etter transplantasjonen eller samtidig med transplantasjonen.

For vellykket transplantasjon er langvarig innpoding avgjørende. Betegnelsen "innpoding" refererer til prosessen hvor infunderte eller transplanterte donorstamceller finner hjem til margen hos mottakeren og produserer blodceller av alle typer. Innpoding er først åpenbart når nye hvite blodlegemer, røde blodlegemer og blodplater begynner å vise seg i mottakerens blod etter stamcelletransplantasjon. Langvarig innpoding refererer til prosessen hvor infunderte eller transplanterte donorceller blir værende i margen hos mottakeren og produserer blodceller over en lengre tidsperiode uten avstøtning ved mottakernes immunsystem. Inkludering av intermediære og sene progenitorceller i et transplantat kan fremme produksjonen av donoravlede modne celler og understøtte innpodingsprosessen.

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter og preparater for å fremme langvarig innpoding av benmarg gitt til en mottaker. I et eksempel på en utførelsesform blir et peptid ifølge oppfinnelsen administrert til en donor før benmargstransplantasjonen. Peptidet øker hematopoese hos donoren, spesielt øker den antallet av progenitorceller, som øker suksessen og lang levetid for innpoding når benmargen og/eller de hematopoetiske cellene blir transplantert inn i en mottaker. Den transplanterte benmargen kan være mottakerens egen benmarg (autolog), eller benmargen kan være transplantert fra en donor av samme art (allogen).

I en annen utførelsesform blir et peptid ifølge oppfinnelsen administrert til mottakeren av benmargen for å fremme langvarig innpoding av den donerte benmargen, hva enten denne benmargen kommer fra mottakeren selv eller fra et annet individ. Tilføring av peptidet til mottakeren kan tjene til å øke hematopoese hos mottakeren, hvilket følgelig fremmer innpoding ved å stimulere den donerte benmargen til å øke produksjon av hematopoetiske progenitorceller.

Transplantasjon av hematopoetiske celler

Transplantasjon av hematopoetiske celler er en vanlig behandling for mange

forskjellige arvelige eller ondartede sykdommer. Mens noen transplantasjonsmetoder anvender hele benmargspopulasjonen, anvendes det ved andre metoder mer definerte populasjoner anriket for stamceller. I tillegg til benmarg, kan slike celler avledes fra andre kilder, slik som perifert blod og neonatal navlestrengsblod. En fordel med bruk av stamceller fra perifert blod er at disse cellene er lettere tilgjengelig i perifert blod enn i benmarg. Imidlertid er en begrensende faktor for transplantasjon av stamceller fra perifert blod det lave antallet av sirkulerende pluripotente stam-/progenitorceller. Følgelig er det behov for ekspansjon av stamceller *ex vivo* for anvendelse ved transplantasjon.

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for ekspansjon av hematopoetiske celler i kultur. Slike fremgangsmåter omfatter, i et eksempel på en utførelsesform, administrering av en effektiv mengde av et peptid ifølge oppfinnelsen til en kultur av hematopoetiske celler. Et slikt peptid er et konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene. I én utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse fremgangsmåter for å tilveiebringe ekspanderte populasjoner av stamceller, så vel som progenitorceller, som kan anvendes for transplantasjoner. Disse fremgangsmåtene omfatter trinnet med å administrere til en kultur av stamceller en effektiv mengde av peptider ifølge oppfinnelsen.

G-CSF konjugater

I henhold til hvilken som helst av fremgangsmåtene vist ovenfor, er peptidet et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori G-CSF-peptidet omfatter en struktur som definert i kravene.

G-CSF har blitt klonet og sekvensert. I et eksempel på en utførelsesform har G-CSF en aminosyresekvens i henhold til SEKV ID NR: 1. Fagfolk på området vil enkelt forstå at foreliggende oppfinnelse ikke er begrenset til sekvensene beskrevet heri.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre G-CSF-varianter, som er velkjent på området. Som et eksempel, men som ikke på noen måte er ment å være begrensende for foreliggende oppfinnelse, har en G-CSF-variant blitt beskrevet i US Patent Nr. 6,166,183, hvor en G-CSF omfattende det naturlige komplementet fra lysinrester og videre bundet til ett eller to polyetylenglykolmolekyler er beskrevet. I tillegg beskriver US Patenter Nr. 6,004,548, 5,580,755, 5,582,823 og 5,676,941 en G-CSF-variant hvor én eller flere av cysteinrestene ved posisjon 17, 36, 42, 64 og 74 er erstattet av alanin eller alternativt serin. US Patent Nr. 5,416,195 beskriver et G-CSF-molekyl hvor cystein ved posisjon 17, asparaginsyre ved posisjon 27, og serin ved posisjonene 65 og 66 er

substituert med henholdsvis serin, serin, prolin og prolin,. Andre varianter er velkjent på området og er beskrevet i, for eksempel, US Patent Nr. 5,399,345. Enda ytterligere varianter har en aminosyre valgt fra SEKV ID NR:3-11.

Ekspresjonen og aktiviteten av et modifisert G-CSF-molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse kan analyseres ved bruk av metoder velkjent på området, og som beskrevet i, for eksempel, U.S. Patent Nr. 4,810,643. Som et eksempel kan aktivitet måles ved bruk av analyser av opptak av radioaktivt merket tymidin. I korthet blir human benmarg fra friske donorer underlagt et densitetskutt med Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ) og celler med lav tetthet blir suspendert i Iscove's medium (GIBCO, La Jolla, CA) inneholdende 10 % føtalt bovint serum, glutamin og antibiotika. Omtrent 2×10^4 humane benmargsceller inkuberes med enten kontrollmedium eller G-CSF eller foreliggende oppfinnelse i 96-brønns flatbunnet kolbe ved omtrent 37° C i 5 % CO₂ i luft i omtrent 2 dager. Kulturer blir deretter pulset i omtrent 4 timer med 0,5 µCi/brønn av ³H-tymidin (New England Nuclear, Boston, Mass.) og opptak blir målt som beskrevet i, for eksempel, Ventua, et al.(1983, Blood 61:781). En økning i inkorporering av ³H-tymidin i humane benmargsceller sammenlignet med benmargsceller behandlet med en kontrollforbindelse er en indikasjon på en aktiv og levedyktig G-CSF-forbindelse.

Konjugater ifølge oppfinnelsen blir dannet ved enzymatisk binding av et modifisert sukker til det glykosylerte eller uglykosylerte G-CSF-peptidet. Det modifiserte sukkeret blir, når det er anbrakt mellom G-CSF-peptidet og den modifierende gruppen på sukkeret, det som kan refereres til heri f.eks. som en "intakt glykosyl bindingsgruppe." Ved å anvende den utsøkte selektiviteten til enzymer slik som glykosyltransferaser, tilveiebringer foreliggende fremgangsmåte peptider som bærer en ønsket gruppe ved én eller flere spesifikke lokaliseringer. Følgelig blir, ifølge foreliggende oppfinnelse, et modifisert sukker bundet direkte til et utvalgt lokus på G-CSF-peptidkjeden eller, alternativt blir det modifiserte sukkeret tilføyd til en karbohydratgruppe av et glykopeptid. Peptider hvor modifiserte sukkere er bundet både til et glykopeptid-karbohydrat og direkte til en aminosyrerest av G-CSF-peptidryggraden er også innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse.

I motsetning til kjente kjemiske og enzymatiske peptid utformingsstrategier, er det mulig å anvende fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen til å sette sammen peptider og glykopeptider som har et hovedsakelig homogent derivatiseringsmønster; enzymene anvendt ifølge oppfinnelsen er generelt selektive for en bestemt aminosyrerest eller kombinasjon av aminosyrerester av G-CSF-peptidet. Slike fremgangsmåter kan også anvendes for storskala produksjon av modifiserte peptider og glykopeptider. Følgelig tilveiebringer fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen en praktisk metode for storskala fremstilling av glykopeptider med forhåndsvalgte homogene derivatiseringsmønstre. Fremgangsmåtene er spesielt velegnet for modifisering av terapeutiske peptider,

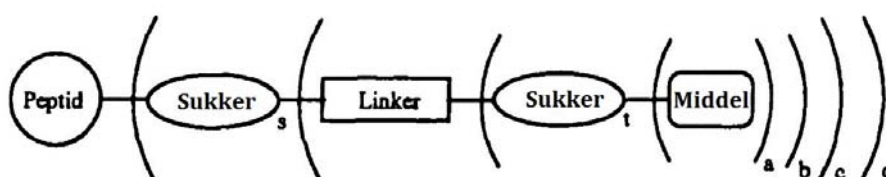
inkludert men ikke begrenset til, glykopeptider som er ufullstendig glykosylert under produksjonen i celler i cellekultur (f.eks. mammalske celler, insektceller, planteceller, fungale celler, gjærceller, eller prokaryote celler) eller transgene planter eller dyr.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også konjugater av glykosylerte og uglykosylerte G-CSF-peptider med økt terapeutisk halveringstid beroende på, for eksempel, redusert clearance rate, eller redusert hastighet for opptak ved immunsystemet eller det retikuloendoteliale system (RES). Videre tilveiebringer fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen en metode for å maskere antigendeterminanter på peptider, hvilket følgelig reduserer eller eliminerer vertens immunrespons mot peptidet. Selektiv binding av målrettede midler kan også anvendes for å målrette et peptid til et bestemt vev eller celleoverflatereseptor som er spesifikk for det bestemte målrettede midlet.

I én utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et konjugat mellom en valgt modifierende gruppe og et G-CSF-peptid. Forbindelsen mellom peptidet og den modifierende gruppen omfatter en glykosyl bindingsgruppe anbrakt mellom peptidet og den valgte gruppen. Som diskutert heri er den valgte modifierende gruppen hovedsakelig hvilken som helst spesie som kan bindes til en sakkaridenhet, hvilket resulterer i et "modifisert sukker" som gjenkjennes av et passende transferaseenzym, som føyer det modifiserte sukkeret til peptidet, eller en glykosylrest bundet dertil. Sakkaridkomponenten av det modifiserte sukkeret, når innskutt mellom peptidet og en valgt gruppe, blir en "glykosyl bindingsgruppe," f.eks. en "intakt glykosyl bindingsgruppe". Glykosyl bindingsgruppen er dannet fra hvilket som helst mono- eller oligosakkarid som, etter modifikasjon med den modifierende gruppen, er et substrat for et enzym som tilføyer det modifiserte sukkeret til en aminosyre- eller glykosylrest av et peptid.

Glykosyl bindingsgruppen kan være, eller kan omfatte, en sakkaridgruppe som er degraderbart modifisert før eller under tilføyelsen av den modifierende gruppen. For eksempel kan glykosyl bindingsgruppe være avledet fra en sakkaridrest som er fremstilt ved oksidativ degradering av et intakt sakkarid til det tilsvarende aldehydet, f.eks. via virkningen av metaperjodat, og deretter omdannet til en Schiffs base med et passende amin, som deretter blir redusert til det tilsvarende amin.

Konjugatene ifølge det beskrevne vil typisk tilsvare følgende generelle struktur:



hvor symbolene a, b, c, d og s er et positivt, helt tall forskjellig fra null; og t er enten 0 eller et positivt helt tall. "Middel" er en PEG-gruppe. Linkeren kan være hvilken som helst av lang rekke av bindingsgrupper, nedenfor. Alternativt kan linkeren være en enkeltbinding eller en "zero order linker."

Modifiserende grupper kan omfatte, som ytterligere diskutert heri, hvilken som helst spesie som kan bindes til en sakkaridenhet. Slike grupper omfatter polymerer, inkludert vannløselige og vann-uløselige polymerer, og kan også omfatte terapeutiske grupper, diagnostiske grupper, målrettede grupper, toksingrupper og lignende. Den valgte modifiserende gruppen er en vannløselig polymer, f.eks. m-PEG. Den vannløselige polymeren er kovalent bundet til G-CSF-peptidet gjennom en glykosyl bindingsgruppe, som er kovalent bundet til en aminosyrerest eller en glykosylrest av G-CSF-peptidet. Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også konjugater hvor en aminosyrerest og en glykosylrest er modifisert med en glykosyl bindingsgruppe.

Peptidene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter minst ett N- eller O-bundet glykosyleringssete. I tillegg til å tilveiebringe konjugater som er dannet gjennom en enzymatisk tilføyde glykosyl bindingsgruppe, tilveiebringer foreliggende beskrivelse konjugater som er svært homogene i sine substitusjonsmønstre. Ved bruk av fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse, er det mulig å danne peptidkonjugater hvor hovedsakelig alle de modifiserte sukkergruppene gjennom hele populasjonen av konjugater ifølge beskrivelsen er bundet til multiple kopier av en strukturelt identisk aminosyre- eller glykosylrest. Følgelig tilveiebringer foreliggende beskrivelse, i ett aspekt, et peptidkonjugat med en populasjon av vannløselige polymergrupper, som er kovalent bundet til G-CSF-peptidet gjennom en intakt glykosyl bindingsgruppe. I et eksempel på en utførelsesform av et konjugat ifølge foreliggende beskrivelse, er hovedsakelig hvert medlem av populasjonen av vannløselige polymergrupper bundet gjennom glykosyl bindingsgruppen til en glykosylrest av G-CSF-peptidet, og hver glykosylrest av G-CSF-peptidet til hvilken glykosyl bindingsgruppen er bundet har samme struktur.

Også beskrevet er et peptidkonjugat med en populasjon av vannløselige polymergrupper kovalent bundet dertil gjennom en glykosyl bindingsgruppe. I én utførelsesform, er hovedsakelig hvert medlem av populasjonen av vannløselige polymergrupper bundet til en aminosyrerest av G-CSF-peptidet gjennom en glykosyl bindingsgruppe, og hver aminosyrerest som har en glykosyl bindingsgruppe bundet dertil har samme struktur.

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også konjugater analoge med dem beskrevet ovenfor hvor G-CSF-peptidet er konjugert til en terapeutisk gruppe, diagnostisk gruppe, målrettet gruppe, toksingruppe eller lignende gjennom en intakt glykosyl bindingsgruppe. Hver av de ovenfor nevnte gruppene kan være et småmolekyl,

naturlig polymer (f.eks. polypeptid) eller syntetisk polymer.

Modifiserte sukkere

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer modifiserte sukkere, modifiserte sukkernukleotider og konjugater av de modifiserte sukkere. I modifiserte sukkerforbindelser ifølge foreliggende beskrivelse, er sukkergruppen foretrukket et sakkarid, et deoksysakkarid, et aminosakkarid, eller et N-acyl sakkarid. Betegnelsen "sakkarid" og ekvivalenter derav, "sakkaryl," "sukker" og "glykosyl" refererer til monomerer, dimerer, oligomerer og polymerer. Sukkergruppen er også funksjonalisert med en modifierende gruppe. Den modifierende gruppen er konjugert til sukkergruppen, typisk gjennom konjugering med et amin, sulfhydryl eller hydroksyl, f.eks. primært hydroksyl, gruppe på sukkeret. I et eksempel på en utførelsesform er den modifierende gruppen bundet gjennom en amingruppe på sukkeret, f.eks. gjennom et amid, et uretan eller en urea som er dannet gjennom omsetningen av aminet med et reaktivt derivat av den modifierende gruppen.

Hvilket som helst sukker kan anvendes som sukkerkjernen av konjugatene ifølge foreliggende beskrivelse. Eksempler på sukkerkjerner som er anvendelige ved dannelse av preparatene ifølge oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, glukose, galaktose, mannose, fukose, og sialinsyre. Andre anvendelige sukkere omfatter aminosukkerer slik som glukosamin, galaktosamin, mannosamin, 5-aminanalogen av sialinsyre og lignende. Sukkerkjernen kan være en struktur som finnes naturlig eller den kan være modifisert for å tilveiebringe et sete for konjugering av den modifierende gruppen. For eksempel tilveiebringer foreliggende beskrivelse i én utførelsesform et peptidkonjugat omfattende et sialinsyrederivat i hvilket 9-hydroksygruppen er erstattet av et amin. Aminet blir enkelt derivatisert med en aktivert analog av en valgt modifierende gruppe.

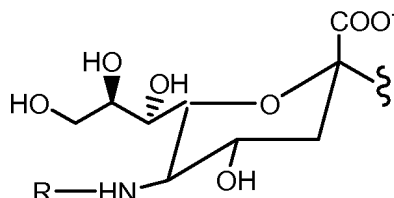
Glykosyl bindingsgruppe

I overensstemmelse med peptidkonjugatene ifølge hvilke som helst av fremgangsmåtene vist ovenfor, omfatter noen utførelsesformer av peptidkonjugatene en glykosyl bindingsgruppe som er en sialinsyrerest.

Forbindelsen mellom G-CSF-peptidet og en valgt gruppe, slik som en vannløselig polymer, inkluderer en intakt glykosyl bindingsgruppe anbrakt mellom peptidet og den valgte gruppen. Som diskutert heri, er den valgte gruppen hovedsakelig hvilken som helst spesie som kan bindes til en sakkaridenhet, hvilket resulterer i et "modifisert sukker" som gjenkjennes av et egnet transferaseenzym, hvilket føyer det modifiserte sukkeret til G-CSF-peptidet. Sakkaridkomponenten av det modifiserte sukkeret, når

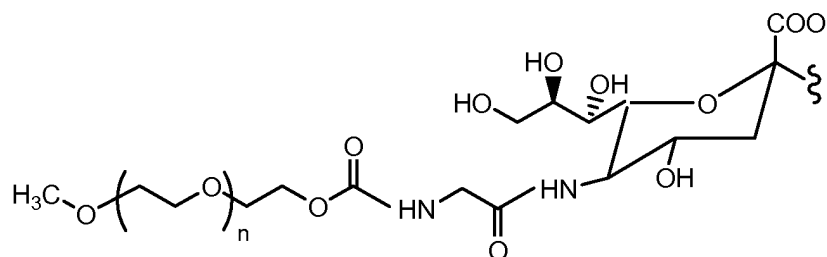
anbrakt mellom G-CSF-peptidet og en valgt gruppe, blir en "intakt glykosyl bindingsgruppe." Glykosyl bindingsgruppen blir dannet fra hvilket som helst mono- eller oligosakkarid som, etter modifisering med en valgt gruppe, er et substrat for en egnet transferase.

I én utførelsesform er glykosyl bindingsgruppen en sialinsyrerest som har en struktur i henhold til formelen:



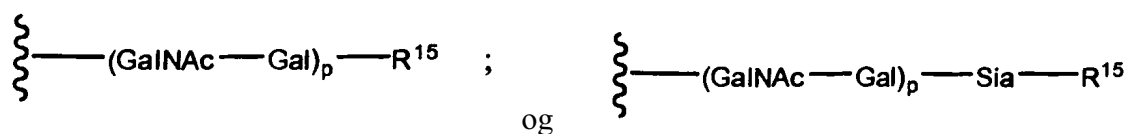
hvor R er den vannløselige polymeren og den vannløselige polymeren er bundet til sialinsyreresten gjennom nevnte linker.

Glykosyl bindingsgruppen er en sialinsyrerest som har en struktur i henhold til formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500.

Glykosyl bindingsgruppen omfatter en substruktur som er valgt fra:

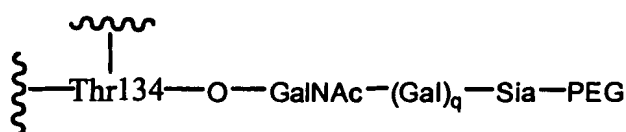


hvor

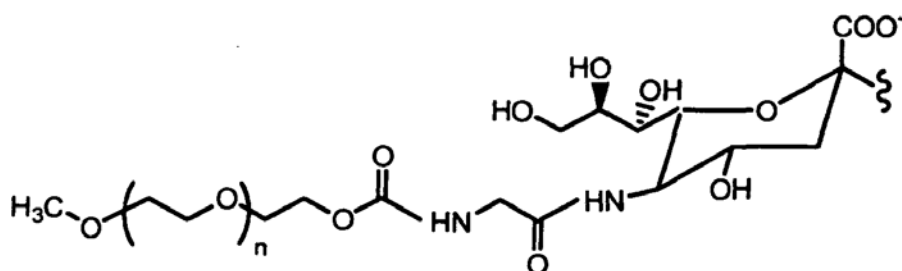
R^{15} er en modifisert sialylrest; og

p er et helt tall fra 1 til 10.

G-CSF-peptidet omfatter en struktur i henhold til formelen

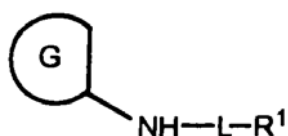


hvor q er 0 eller 1; og Sia-PEG har en struktur i henhold til formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500. I en enda ytterligere utførelsesform, har G-CSF-peptidet aminosyresekvensen SEKV ID NR:1.

I et eksempel på en utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse et peptidkonjugat omfattende et modifisert sukkeramin som har formelen:



hvor G er en glykosylgruppe, L er en binding eller en linker og R^1 er den modifiserende gruppen. Eksempel på bindinger er slike som dannes mellom en NH_2 på glykosylgruppen og en gruppe med komplementær reaktivitet på den modifiserende gruppen. Eksempler på bindinger omfatter følgelig, men er ikke begrenset til, NHR^1 , OR^1 , SR^1 og lignende. For eksempel når R^1 omfatter en karboksylsyregruppe, kan denne gruppen aktiveres og kobles med en NH_2 -gruppe på glykosylresten hvilket gir en binding med strukturen $NHC(O)R^1$. På lignende måte kan OH og SH -gruppene omdannes til henholdsvis de tilsvarende eter- eller tioeterderivatene.

Eksempler på linkere omfatter alkyl- og heteroalkylgrupper. Linkerene omfatter bindingsgrupper, for eksempel acyl-baserte bindingsgrupper, f.eks. $-C(O)NH-$, $-OC(O)NH-$, og lignende. Bindingsgruppene er bindinger dannet mellom komponenter av spesier ifølge oppfinnelsen, f.eks. mellom glykosylgruppen og linkerene (L), eller mellom linkerene og den modifiserende gruppen (R^1). Andre bindingsgrupper er etere, tioetere og aminer. For eksempel er linkerene en aminosyrerest, slik som en glysinrest. Karboksylsyregruppen fra glysinet omdannes til det tilsvarende amidet ved omsetning med et amin fra glykosylresten, og aminet fra glysin omdannes til det tilsvarende amidet eller uretan ved omsetning med en aktivert karboksylsyre eller karbonat fra den modifiserende gruppen.

Et annet eksempel på linker er en PEG-gruppe eller en PEG-gruppe som er funksjonalisert med en aminosyrerest. PEG er til glykosylgruppe gjennom aminosyreresten ved én terminal ende av PEG og bundet til R^1 gjennom den andre terminale enden av PEG. Alternativt er aminosyreresten bundet til R^1 og den terminale

enden av PEG ikke bundet til aminosyren er bundet til glykosylgruppen.

Et eksempel på spesier for NH-L-R^1 har formelen:

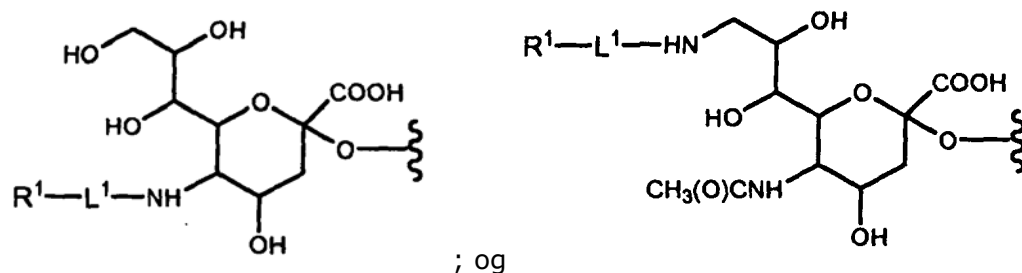
$-\text{NH}\{\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NH}\}_s\{\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$, hvor indeksene s og t uavhengig er 0 eller 1. Indeksene a , b og d er uavhengig hele tall fra 0 til 20, og c er et helt tall fra 1 til 2500. Andre lignende linkere er basert på spesier hvor $-\text{NH}$ -gruppen er erstattet av, for eksempel, $-\text{S}$, $-\text{O}$ og $-\text{CH}_2$.

Nærmere bestemt tilveiebringer foreliggende beskrivelse et peptidkonjugat omfattende forbindelser hvor NH-L-R^1 er:

$\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$,
 $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$,
 $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_b(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_c\text{O}(\text{CH}_2)_d\text{NHR}^1$, $\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_a\text{NHR}^1$ og NHR^1 . I disse formlene er indeksene a , b og d uavhengig valgt fra hele tall fra 0 til 20, foretrukket fra 1 til 5. Indeks c er et helt tall fra 1 til 2500.

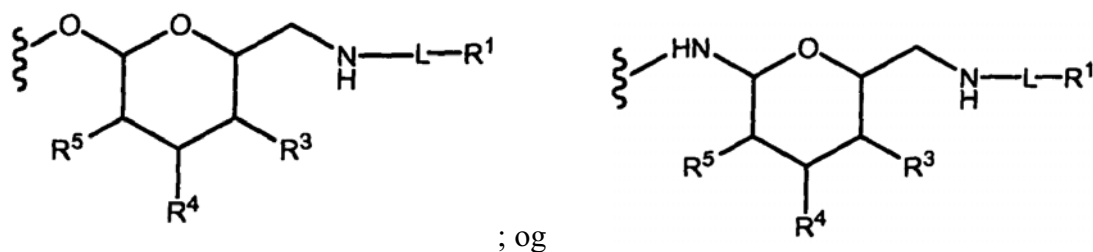
I et annet eksempel på utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse forbindelser som vist ovenfor som aktiveres som de tilsvarende nukleotid-sukkere. Eksempler på sukker-nukleotider som anvendes i foreliggende oppfinnelse i deres modifiserte form omfatter nukleotid mono-, di- eller trifosfater eller analoger derav. I én utførelsesform er det modifiserte sukkernukleotidet valgt fra et UDP-glykosid, CMP-glykosid eller et GDP-glykosid. Enda mer foretrukket er sukkernukleotid-delen av det modifiserte sukkernukleotidet valgt fra UDP-galaktose, UDP-galaktosamin, UDP-glukose, UDP-glukosamin, GDP-mannose, GDP-fukose, CMP-sialinsyre eller CMP-NeuAc. I et eksempel på utførelsesform, er nukleotidfosfatet bundet til C-1.

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer et konjugat dannet mellom et modifisert sukker ifølge foreliggende beskrivelse og et substrat, f.eks. et peptid, lipid, aglykon, osv., nærmere bestemt mellom et modifisert sukker og en glykosylrest fra et glykopeptid eller et glykolipid. I denne utførelsesformen blir sukkergruppen fra det modifiserte sukkeret en glykosyl bindingsgruppe anbrakt mellom substratet og den modifiserende gruppen. Et eksempel på glykosyl bindingsgruppe er en intakt glykosyl bindingsgruppe, hvor glykosylgruppen eller grupper som danner bindingsgruppen ikke degraderes ved kjemiske (f.eks. natrium-metaperjodat) eller enzymatiske prosesser (f.eks. oksidase). Utvalgte konjugater ifølge foreliggende beskrivelse omfatter en modifiserende gruppe som er bundet til amingruppen fra et amino-sakkarid, f.eks. mannosamin, glukosamin, galaktosamin, sialinsyre osv. Eksempler på modifiserende gruppe-intakt glykosyl bindingsgruppe-kassetten ifølge dette motivet er basert på en sialinsyrestruktur, slik som den som har formelen:



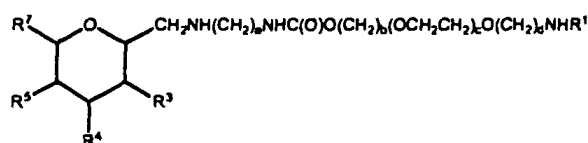
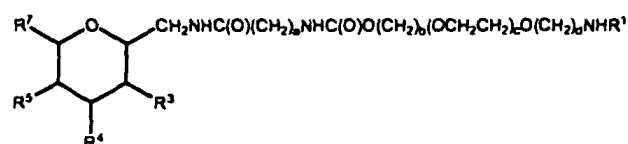
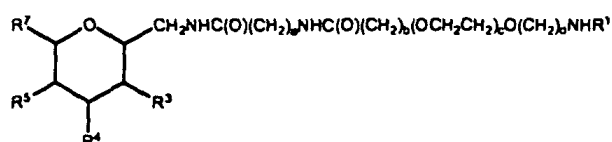
R^1 , L^1 og L^1 er som beskrevet ovenfor.

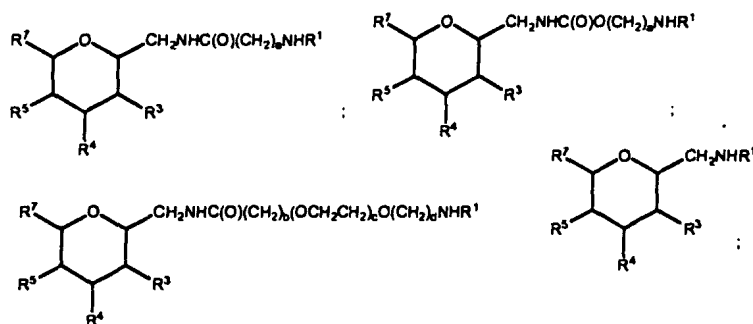
I enda et ytterligere eksempel på en utførelsesform dannes konjugatet mellom et substrat og 1-stillingen i en sakkarylgruppe som i hvilken den modifierende gruppen er bundet gjennom en linker ved 6-karbon-stillingen av sakkarylgruppen. Følgelig har illustrerende konjugater ifølge denne utførelsesformen formelen:



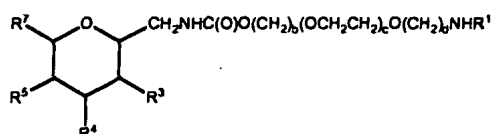
hvor radikalene er som omtalt ovenfor. Fagfolk vil forstå at de modifiserte sakkaryl gruppene vist ovenfor også kan konjugeres til et substrat ved 2, 3, 4 eller 5 karbonatomer.

Illustrative forbindelser i henhold til denne utførelsesformen omfatter forbindelser med formelen:



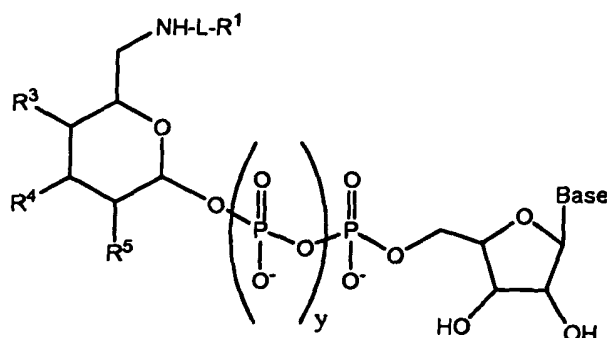


og



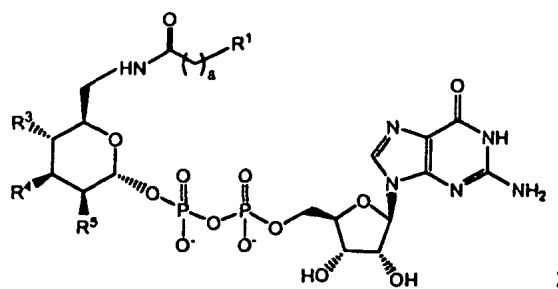
hvor R-gruppene og indelsene er som beskrevet ovenfor.

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også sukkernukleotider modifisert med L-R¹ ved 6-karbon-stillingen. Eksempler på spesier omfatter:

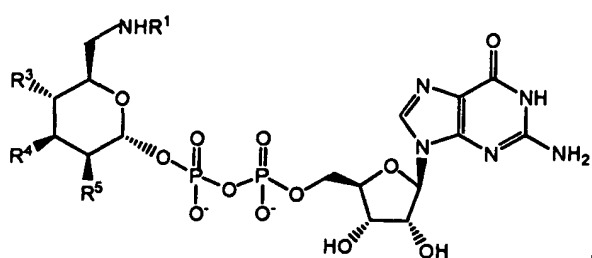


hvor R-gruppene, og L, representerer grupper som diskutert ovenfor. Indeksen "y" er 0, 1 eller 2.

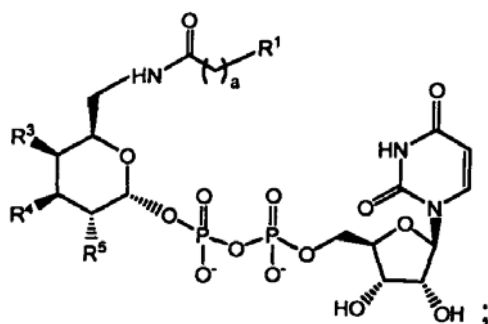
Et ytterligere eksempel på nukleotid-sukker ifølge foreliggende beskrivelse, basert på en spesier som har stereokjemien til GDP-mannose. Et eksempel på spesier har strukturen:



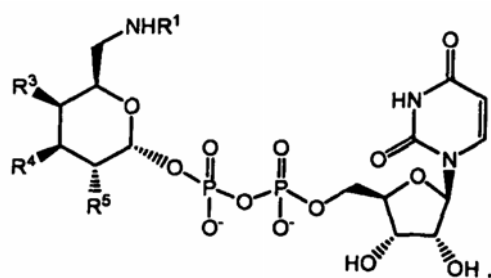
og



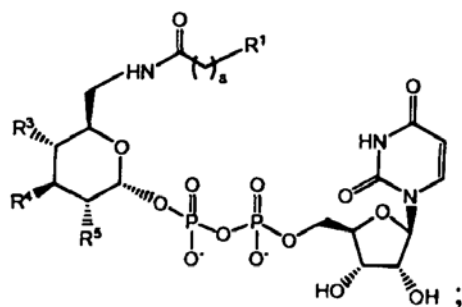
I et enda ytterligere eksempel på utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse et konjugat basert på stereokjemien til UDP-galaktose. Et eksempel på forbindelse har strukturen:



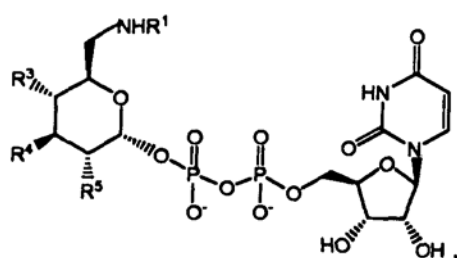
og



I et annet eksempel på utførelsesform er nukleotidsukkeret basert på stereokjemien til glukose. Eksempel på spesier har formelen:



og



Den modifierende gruppen, R^1 , er hvilken som helst av en rekke spesier inkludert, men ikke begrenset til, vannløselige polymerer, vannuløselige polymerer, terapeutiske midler, diagnostiske midler og lignende. Karakteren av eksempler på modifierende grupper er diskutert i nærmere detaljer heri nedenfor.

Vannløselige polymerer

I noen utførelsesformer er de polymeriske modifierende gruppene av G-CSF-konjugater ifølge foreliggende beskrivelse vannløselige polymerer. Disse vannløselige polymerene kan være lineære eller forgrenede polymerer. I én utførelsesform har den vannløselige polymeren en molekylvektfordistribusjon som er hovedsakelig monodispers ("homodisperse").

I noen utførelsesformer omfatter konjugatene ifølge foreliggende beskrivelse vannløselige polymerer som er poly(etylenglykol), f.eks. metoksy-poly(etylenglykol). Poly(etylenglykol) anvendt i foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen bestemt form eller molekylvekt-område. For uforgrenede poly(etylenglykol)-molekyler er molekylvekten foretrukket mellom 500 og 100,000. En molekylvekt på 2,000-60,000 er foretrukket anvendt og mer foretrukket fra omtrent 5,000 til omtrent 30,000.

I en annen utførelsesform er poly(etylenglykol) et forgrenet PEG med mer enn én PEG-gruppe vedheftet. Eksempler på forgrenede PEG er beskrevet i US Pat. Nr. 5,932,462; US Pat. Nr. 5,342,940; US Pat. Nr. 5,643,575; US Pat. Nr. 5,919,455; US Pat. Nr. 6,113,906; US Pat. Nr. 5,183,660; WO 02/09766; Koderia Y., Bioconjugate Chemistry 5: 283-288 (1994); og Yamasaki et al, Agric. Biol. Chem., 52: 2125-2127,

1998. Andre anvendelige forgrenede PEG-strukturer er beskrevet heri.

I et eksempel på utførelsesform er molekylvekten av hvert poly(etylenglykol) av det forgrenede PEG lik eller høyere enn omtrent 2,000, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, 40,000 eller 60,000 Dalton.

Metoder for aktivisering av polymerer kan også finnes i WO 94/17039, US Pat. Nr. 5,324,844, WO 94/18247, WO 94/04193, US Pat. Nr. 5,219,564, US Pat. Nr. 5,122,614, WO 90/13540, US Pat. Nr. 5,281,698, og i tillegg WO 93/15189, og for konjugering av aktiverte polymerer og peptider, f.eks. koagulasjonsfaktor VIII (WO 94/15625), hemoglobin (WO 94/09027), oksygenbærende molekyl (US Pat. Nr. 4,412,989), ribonuklease og superoksid dismutase (Veronese et al., App. Biochem. Biotech. 11: 141-45 (1985)).

I én utførelsesform ifølge beskrivelsen, er vannløselige polymerer anvendt slike som hvor en vesentlig andel av polymermolekylene i en prøve av polymeren har omtrent samme molekylvekt; slike polymerer er "homodisperse."

Foreliggende oppfinnelse blir ytterligere forklart ved referanse til et poly(etylenglykol)-konjugat. Flere oversikter og monografier angående funksjonalisering og konjugering av PEG er tilgjengelig. Se for eksempel Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995); og Bhadra, et al, *Pharmazie*, 57:5-29 (2002). Metoder for fremstilling av reaktive PEG-molekyler og dannelsen av konjugater ved bruk av de reaktive molekylene er kjent på området. For eksempel beskriver US Patent Nr. 5,672,662 et vannløselig og isolerbart konjugat av en aktiv ester av en polymer syre valgt fra lineær eller forgrenet poly(alkylenoskider), poly(oksyetylerter polyoler), poly(olefiniske alkoholer), og poly(akrylomorfolin).

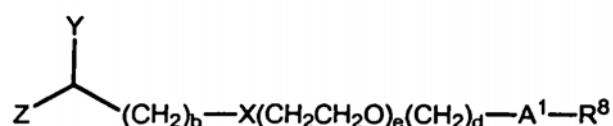
US Patent Nr. 6,376,604 viser en metode for fremstilling av en vannløselig 1-benzotriazolylkarbonat ester av en vannløselig og ikke-peptid polymer ved å omsette et terminalt hydroksyl av polymeren med di(1-benzotriazolyl)karbonat i et organisk løsningsmiddel. Den aktive esteren anvendes for å danne konjugater med et biologisk aktivt middel slik som et protein eller peptid.

WO 99/45964 beskriver et konjugat omfattende et biologisk aktivt middel og en aktivert vannløselig polymer omfattende en polymerryggrad med minst én terminal ende bundet til polymerryggraden gjennom en stabil binding, hvori minst én terminal ende omfatter en forgrenet gruppe med proksimale reaktive grupper bundet til den forgrenende gruppen, hvort det biologisk aktive midlet er bundet til minst én av de proksimale reaktive gruppene. Andre forgrenede poly(etylenglykoler) er beskrevet i WO 96/21469, US Patent Nr. 5,932,462 beskriver et konjugat dannet med et forgrenet PEG-molekyl

som omfatter en forgrenet terminal ende som omfatter reaktive funksjonelle grupper. De frie reaktive gruppene er tilgjengelige til å reagere med en biologisk aktiv spesie, slik som et protein eller peptid, og derved danne konjugater mellom poly(etylenglykol) og de biologisk aktive spesiene. US Patent Nr. 5,446,090 beskriver en bifunksjonell PEG-linker og anvendelse derav ved dannelsen av konjugater som har et Konjugater som omfatter degraderbare PEG-bindinger er beskrevet i WO 99/34833; og WO 99/14259, så vel som i US Patent Nr. 6,348,558. Slike degraderbare bindinger er anvendelige i foreliggende oppfinnelse.

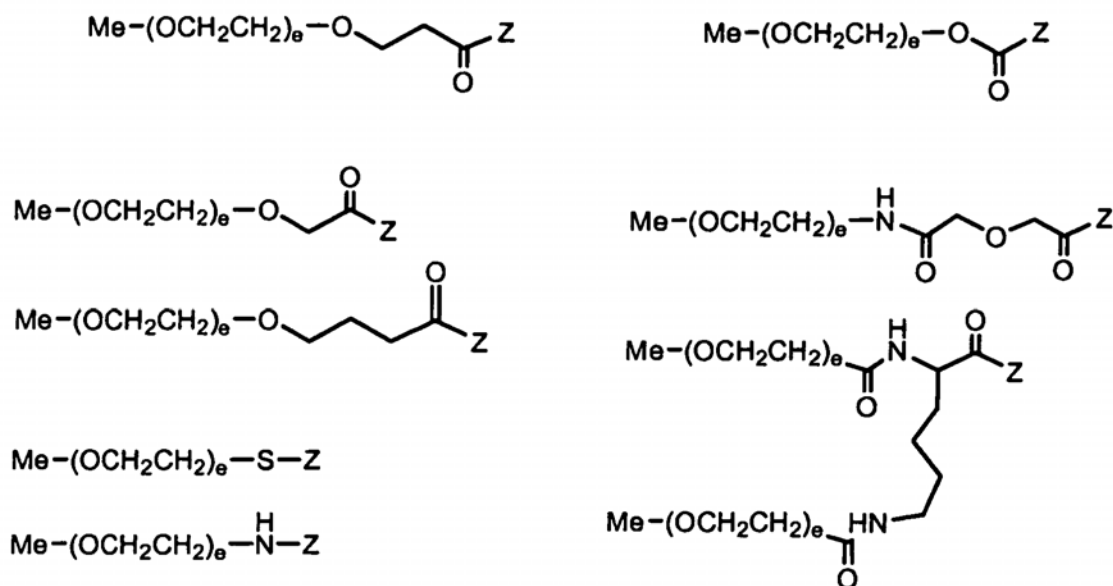
Metoder kjent på området for aktivisering av polymer vist ovenfor er anvendelige i konteksten til foreliggende beskrivelse ved dannelsen av de forgrenede polymerene vist heri og også for konjugering av disse forgrenede polymerene til andre spesier, f.eks. sukkere, sukkernukleotider og lignende.

Eksempler på poly(etylenglykol)-molekyler anvendelige i foreliggende beskrivelse omfatter, men er ikke begrenset til, slike som har formelen:

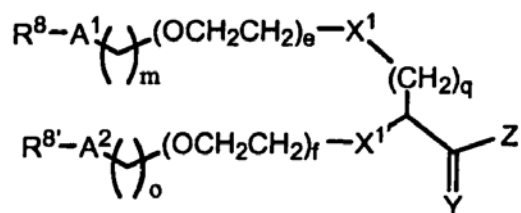


hvor R^8 er H, OH, NH_2 , substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert aryl, substituert eller usubstituert heteroaryl, substituert eller usubstituert heterosykloalkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, f.eks. acetal, OHC-, $\text{H}_2\text{N}-$ $(\text{CH}_2)_q-$, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_q$, eller $-(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{Y})\text{Z}^1$. Indeksene "e" er et helt tall fra 1 til 2500. Indeksene b, d og q er uavhengig hele tall fra 0 til 20. Symbolene Z og Z^1 er uavhengig OH, NH_2 , utgående grupper, f.eks. imidazol, p-nitrofenyl, HOBT, tetrazol, halid, $\text{S}-\text{R}^9$, alkoholandelen av aktiverte estere; $-(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{Y}^1)\text{V}$ eller $-(\text{CH}_2)_p\text{U}(\text{CH}_2)_s\text{C}(\text{Y}^1)_v$. Symbolet Y er H(2), =O, =S, =N- R^{10} . Symbolene X, Y, Y^1 , A^1 og U er uavhengig gruppene O, S, N- R^{11} . Symbolet V er OH, NH_2 , halogen, $\text{S}-\text{R}^{12}$, alkoholkomponenten av aktiverte estere, aminkomponenten av aktiverte amider, sukker-nukleotider og proteiner. Indeksene p, q, s og v er medlemmer uavhengig valgt fra hele tall fra 0 til 20. Symbolene R^9 , R^{10} , R^{11} og R^{12} er uavhengig H, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl, substituert eller usubstituert aryl, substituert eller usubstituert heterosykloalkyl og substituert eller usubstituert heteroaryl.

I andre eksempler på utførelsesformer er poly(etylenglykol)-molekylet valgt fra følgende:



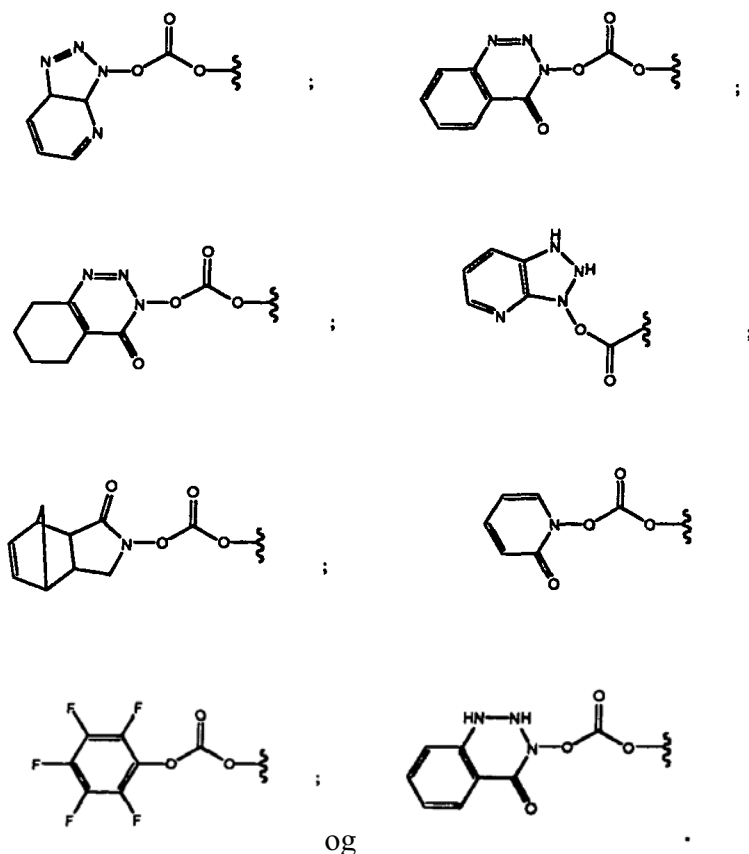
Poly(etylenglykol) anvendelig ved dannelse av konjugatet ifølge foreliggende beskrivelse er enten lineært eller forgrenet. Forgrenede poly(etylenglykol)-molekyler egnet for anvendelse i beskrivelsen omfatter, men er ikke begrenset til, slike som er beskrevet ved følgende formel:



hvor R^8 og $R^{8'}$ er medlemmer uavhengig valgt fra gruppene definert for R^8 , ovenfor. A^1 og A^2 er medlemmer uavhengig valgt fra gruppene definert for A^1 , ovenfor. Indeksene e , f , o , og q er som beskrevet ovenfor. Z og Y er som beskrevet ovenfor. X^1 og $X^{1'}$ er medlemmer uavhengig valgt fra S , $SC(O)NH$, $HNC(O)S$, $SC(O)O$, O , NH , $NHC(O)$, $(O)CNH$ og $NHC(O)O$, $OC(O)NH$.

I eksempel på utførelsesformer ifølge foreliggende beskrivelse, er PEG lik m-PEG (5 kD, 10 kD, eller 20 kD). Et eksempel på forgrenet PEG spesier er et serin- eller cystein-(m-PEG)₂ hvor m-PEG er et 20 kD m-PEG.

Andre aktiverende, eller utgående grupper, passende for aktivering av lineære PEG for anvendelse ved fremstilling av forbindelsene vist heri omfatter, men er ikke begrenset til spesiene:



PEG-molekyler som er aktivert med disse og andre spesier og fremgangsmåter for fremstilling av de aktivert PEG er vist i WO 04/083259.

Fagfolk på området vil forstå at én eller flere av m-PEG-gruppene av den forgrenede polymeren kan erstattes av en PEG-gruppe med en ulik terminal ende, f.eks. OH, COOH, NH₂, C₂-C₁₀-alkyl, osv. Dessuten blir strukturene ovenfor lett modifisert ved innføring av alkyl-linkere (eller fjerning av karbonatomer) mellom α-karbonatomet og den funksjonelle gruppen av sidekjeden. Følgelig er "homo"-derivater og høyere homologer, så vel som lavere homologer innenfor omfanget av kjerner for forgrenede PEGs anvendelige i foreliggende beskrivelse.

Den modifiserende gruppen er en PEG-gruppe. Det modifiserte sukkeret dannes ved enzyatiske metoder, kjemiske metoder eller en kombinasjon derav, for derved å fremstille et modifisert sukker. I et eksempel på utførelsesform blir sukkeret substituert med et aktivt amin ved hvilken som helst stilling som tillater binding av den modifiserende gruppen, men fortsatt tillater sukkeret å fungere som et substrat for et enzym i stand til å koble det modifiserte sukkeret til G-CSF-peptidet. I et eksempel på utførelsesform, når galaktosamin er det modifiserte sukkeret, er amingruppen bundet til karbonatomet ved 6-stillingen.

In vivo halveringstiden for terapeutiske glykopeptider kan også økes med PEG-grupper slik som polyetylenglykol (PEG). For eksempel øker kjemisk modifikasjon av proteiner med PEG (PEGylering) deres molekylstørrelse og reduserer tilgjengeligheten av deres overflate og funksjonelle grupper, som begge er avhengig av størrelsen av PEG bundet til proteinet. Dette fører til en forbedring av halveringstid i plasma og proteolytisk stabilitet, og en reduksjon av immunogenisitet og hepatisk opptak (Chaffee et al. J. Clin. Invest. 89: 1643-1651 (1992); Pyatak et al. Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol. 29: 113-127 (1980)). Pegylering av interleukin-2 har blitt rapportert å øke dens antitumor potens *in vivo* (Katre et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 1487-1491 (1987)) og pegylering av en F(ab')₂ avledet fra det monoklonale antistoffet A7 har forbedret dets tumorlokalisering (Kitamura et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 1387-1394 (1990)). I en annen utførelsesform blir følgelig *in vivo* halveringstiden for et peptid derivatisert med en PEG-gruppe ved en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen økt relevant i forhold til *in vivo* halveringstiden av det ikke-derivatiserte peptidet.

Økningen av *in vivo* halveringstid for peptid uttrykkes best som et område for prosent økning i denne mengden. Den nedre grensen av området for prosent økning er omtrent 40 %, omtrent 60 %, omtrent 80 %, omtrent 100 %, omtrent 150 % eller omtrent 200 %. Den øvre grensen for området er omtrent 60 %, omtrent 80 %, omtrent 100 %, omtrent 150 %, eller mer enn omtrent 250 %.

G-CSF-peptid

Hovedsakelig hvilket som helst granulocyt-kolonistimulerende faktor-peptid eller middel, med hvilken som helst sekvens, er anvendelig som peptidkomponenten av konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse. Granulocyt-kolonistimulerende faktor har blitt klonet og sekvensert. I et eksempel på utførelsesform har G-CSF-peptidet sekvensen presentert i SEKV ID NR:1:

**MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA₁TYK
LCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS₂QLHSGL
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE
LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV
SYRVLRHLAQP (SEQ ID NO: 1).**

I et annet eksempel på utførelsesform har G-CSF-peptidet sekvensen presentert i SEKV ID NR:2:

TPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA^oTYKL
CHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS^oQLHSGLF
LYQG^oLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEEL
GMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS
YRVLRHLAQP (SEQ ID NO: 2).

I andre eksempler på utførelsesform har G-CSF-peptidet sekvensen presentert i
SEKV ID NR:3-11 nedenfor.

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL^oVSECA
TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS^oQL
HSGLFLYQG^oLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQ
QMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQ
SFLEVSYRVLRHLAQP (SEQ ID NO:3)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL
 PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPEELVLL
 GHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGFLYQGLLQA
 LEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQP
 TQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLA
 QP (SEQ ID NO:4)

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSL
 PQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL VSECATYKLCHPEEL
 VLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSGFLYQGL
 LQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPA
 LQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLR
 HLAQP (SEQ ID NO:5)

MVTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATY
 KLCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHS
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQM
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLE
 VSYRVLRHLAQP(SEQ ID NO:6);

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYK
 LCHPEELVLLGHTLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSG
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV
 SYRVLRHLAQP(SEQ ID NO:7);

MVTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATY
 KLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHSG
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQME
 ELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLE
 VSYRVLRHLAQP(SEQ ID NO:8);

MQTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
 TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHS
 GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQM
 EELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFL
 EVSYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:9**);

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
 TYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSG
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV
 SYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:10**)

og

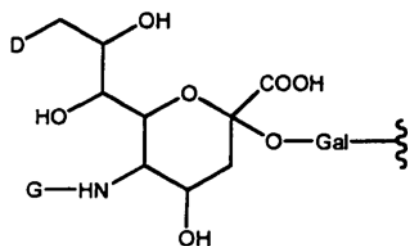
MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
 TYKLCHPEELVLLGSSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSG
 LFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEE
 LGMAPTTTPTQTAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEV
 SYRVLRLHLAQP(**SEQ ID NO:11**)

Foreliggende oppfinnelse er på ingen måte begrenset til sekvensene vist heri.

I et eksempel på utførelsesform omfatter G-CSF-peptidene ifølge oppfinnelsen minst ett O-bundet glykosyleringssete, som er glykosylert med en glykosylrest som omfatter en PEG-gruppe. PEG er kovalent bundet til G-CSF-peptidet via en intakt glykosyl bindingsgruppe. Glykosyl bindingsgruppen er kovalent bundet til enten en aminosyrerest eller en glykosylrest fra G-CSF-peptidet. Alternativt er glykosyl bindingsgruppen bundet til én eller flere glykosyl-enheter av et glykopeptid. Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også konjugater hvor glykosyl bindingsgruppen er bundet til både en aminosyrerest og en glykosylrest.

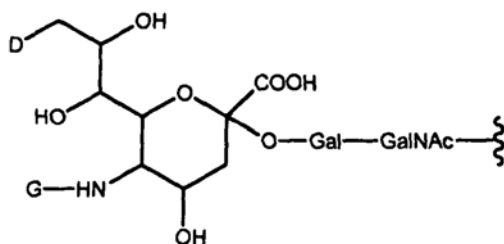
PEG-gruppen er bundet til en intakt glykosyl-linker direkte, eller via en ikke-glykosyl linker, f.eks. substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl.

I et annet eksempel på utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse et peptid omfattende en gruppe med formelen:



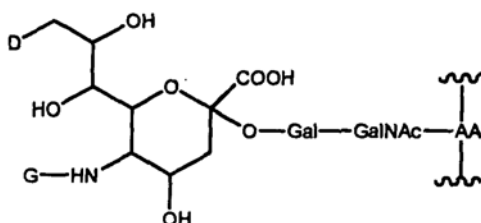
Gal er bundet til en aminosyre.

I andre utførelsesformer har gruppen formelen:



GalNAc kan være bundet til en aminosyre.

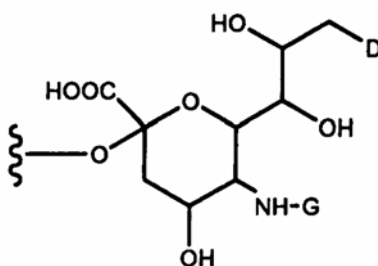
I enda et ytterligere eksempel på utførelsesform omfatter peptidet en gruppe i henhold til formelen



hvor AA er en aminosyrerest av nevnte peptid og, i hver av strukturene ovenfor, er D og G som beskrevet heri.

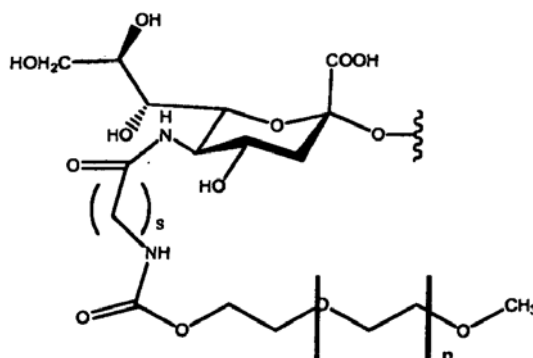
Et eksempel på aminosyrerest av G-CSF-peptidet ved hvilken én eller flere av spesiene ovenfor kan konjugeres omfatter serin og treonin, f.eks. treonin 133 fra SEKV ID NR: 1.

Symbolet Sia-(R) er en gruppe som har formelen:



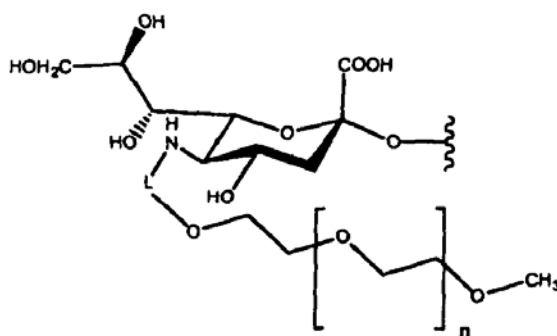
hvor D er valgt fra $-\text{OH}$ og $\text{R}^1\text{-L-NH-}$. Symbolet G er $\text{R}^1\text{-L-}$ eller $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$. R^1 er en gruppe som omfatter en rettkjedet eller forgrenet poly(etylenglykol)-rest. L er en linker som er et medlem valgt fra en binding, substituert eller usubstituert alkyl og substituert eller usubstituert heteroalkyl. Generelt, når D er OH er G lik $\text{R}^1\text{-L-}$, og når G er $-\text{C}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_6)\text{alkyl}$ er D lik $\text{R}^1\text{-L-NH-}$.

I et annet eksempel på utførelsesform har den PEG-modifiserte sialinsyregruppen i konjugatet ifølge oppfinnelsen formelen:



hvor indeksen "s" er et helt tall fra 0 til 20, og n er et helt tall fra 400 til 500. I én utførelsesform er s lik 1; og m-PEG-gruppen har en molekylvekt på omtrent 20 kD.

I enda et ytterligere eksempel på utførelsesform har den PEG-modifiserte sialinsyre i formelen:



hvor L er et substituert eller usubstituert alkyl eller substituert eller usubstituert heteroalkyl linker-gruppe som forbinder sialinsyregruppen og PEG-gruppen.

Konjugatene ifølge foreliggende beskrivelse omfatter intakte glykosyl bindingsgrupper som er mono- eller flervalente (f.eks. antennary-strukturer). Følgelig omfatter konjugatene ifølge foreliggende beskrivelse både spesier hvor en valgt gruppe er bundet til et peptid via en monovalent glykosyl bindingsgruppe og en multivalent bindingsgruppe. Også omfattet innenfor foreliggende beskrivelse er konjugater hvor mer enn én valgt gruppe er bundet til et peptid via en multivalent bindingsgruppe.

Fremgangsmåter for fremstilling av G-CSF-konjugater

I tillegg til konjugatene diskutert ovenfor tilveiebringer foreliggende beskrivelse fremgangsmåter for fremstilling av disse og andre konjugater. Følgelig tilveiebringer foreliggende beskrivelse i ett aspekt en framgangsmåte for dannelsen av et kovalent konjugat mellom en valgt gruppe og et G-CSF-peptid. I tillegg tilveiebringer beskrivelsen fremgangsmåter for målretting av konjugater ifølge oppfinnelsen til et bestemt vev eller område av kroppen.

I eksempel på utførelsesformer blir konjugatet dannet mellom en PEG-gruppe (eller en enzymatisk overførbar glykosylgruppe omfattende en PEG-gruppe), og et glykosylert eller ikke-glykosylert peptid. PEG blir konjugert til G-CSF-peptidet via en intakt glykosyl bindingsgruppe, som er anbrakt mellom, og kovalent bundet til både G-CSF-peptidet og PEG-gruppen, eller til en PEG-ikke-glykosyl linker (f.eks. substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert heteroalkyl)-konstruksjon. Fremgangsmåten omfatter å bringe G-CSF-peptidet i kontakt med en blanding inneholdende et modifisert sukker og en glykosyltransferase for hvilken det modifiserte sukkeret er et substrat. Reaksjonen blir utført under betingelser tilfredsstillende til å danne en kovalent binding mellom det modifiserte sukkeret og G-CSF-peptidet. Sukkergruppen av det modifiserte sukkeret er valgt fra nukleotid-sukkere, aktiverte sukkere og sukkere som hverken er nukleotider eller aktiverte.

Akseptor-peptidet (glykosylert eller ikke-glykosylert) blir typisk syntetisert *de novo*, eller rekombinant uttrykt i en prokaryot celle (f.eks. bakteriecelle, slik som *E. coli*) eller i en eukaryot celle slik som en pattedyr-, gjær-, insekt, sopp- eller plantecelle. G-CSF-peptidet kan være enten et fullengde protein eller et fragment. Videre kan G-CSF-peptidet være et villtype eller mutert peptid. I et eksempel på en utførelsesform omfatter G-CSF-peptidet en mutasjon som tilføyer én eller flere N- eller O-bundne glykosylerings seter til peptidsekvensen.

Peptidet blir enten fremstilt med et tilgjengelig aminosyre-glykosylerings sete eller, dersom glykosylert, blir glykosylgruppen "trimmet" bort for å eksponere aminosyren. For eksempel blir en serin eller treonin α -1N-acetylamino galaktosylert (GalNAc) og det NAc-galaktosylerte peptidet blir sialylert med en sialinsyremodifiserende gruppe-kassett ved bruk av ST6GalNAcT1. Alternativt blir det NAc-galaktosylerte peptidet galaktosylert ved bruk av Core-1-GalT-1 og produktet blir sialylert med en sialinsyremodifiserende gruppe-kassett ved bruk av ST3GalT1. Et eksempel på konjugat i henhold til denne metoden har følgende bindinger: Thr- α -1-GalNAc- β -1,3-Gal- α 2,3-Sia*, i hvilket Sia* er den sialinsyre-modifiserende gruppe-kassetten.

I fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse, slik som den vist ovenfor, hvor det anvendes multiple enzymer og sakkaryldonorer, kan de individuelle glykosyleringstrinnene utføres separat, eller kombinert i en "enkelt beholder"-reaksjon. For eksempel kan, i tre-enzymers reaksjonen vist ovenfor, GalNAc transferase, GalT og SiaT og deres donorer kombineres i en enkelt beholder. Alternativt kan GalNAc-reaksjonen utføres alene og både GalT og SiaT og passende sakkaryldonorer tilsettes som et enkelt trinn. En annen metode for utføring av reaksjonene omfatter å tilsette hvert enzym og en passende donor sekvensielt og utføre reaksjonen i et "enkelt beholder"-motiv. Kombinasjoner av hver av fremgangsmåtene vist ovenfor er anvendelige ved fremstilling av forbindelsene ifølge oppfinnelsen.

I konjugatene ifølge foreliggende beskrivelse, spesielt de glykopegylerede N-bundne glykanene, kan den Sia-modifiserende gruppe-kassetten være bundet til Gal i en α -2,6, eller α -2,3-binding.

Fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse tilveiebringer også modifikasjon av ufullstendig glykosylerte peptider som er fremstilt rekombinant. Ved å anvende et modifisert sukker i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, kan G-CSF-peptidet bli samtidig videre glykosylert og derivatisert med, f.eks. en PEG-gruppe, terapeutisk middel, eller lignende. Sukkergruppen av det modifiserte sukkeret kan være residuet som passende ville bli konjugert til akseptoren i et fullstendig glykosylert peptid, eller en annen sukkergruppe med ønskelige egenskaper.

G-CSF-peptider modifisert ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse kan være syntetiske eller villtype-peptider eller de kan være muterte peptider, fremstilt ved fremgangsmåter kjent på området, slik som seterettet mutagenese. Glykosylering av peptider er typisk enten N-bundet eller O-bundet. Et eksempel på N-binding er binding av det modifiserte sukkeret til sidekjeden av en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er hvilken som helst aminosyre unnatt prolin, er gjenkjennelsessekvensene for enzymatisk binding av en karbohydratgruppe til asparagin-sidekjeden. Tilstedeværelse av den ene eller andre av disse tripeptid-sekvensene i et polypeptid danner følgelig et potensielt glykosyleringssete. O-bundet glykosylering refererer til binding av ett sukker (f.eks. N-acetylgalaktosamin, galaktose, mannose, GlcNAc, glukose, fukose eller xylose) til hydroksy-sidekjeden av en hydroksyaminosyre, foretrukket serin eller treonin, selv om 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

I et eksempel på en utførelsesform blir G-CSF uttrykt i et mammalske system og modifisert ved behandling av sialidase for å trimme tilbake terminale sialinsyrerester, fulgt av pegylering ved bruk av ST3Gal3 og en donor av PEG-sialinsyre.

I et annet eksempel på utførelsesform blir G-CSF uttrykt i mammalske celler først behandlet med sialidase for å trimme tilbake terminale sialinsyrerester, deretter pegylert

ved bruk av ST3Gal3 og en donor av PEG-sialinsyre, og deretter sialylert ved bruk av ST3Gal3 og en sialinsyredonor.

G-CSF uttrykt i et mammals system kan også behandles med sialidase og galaktosidase for å trimme tilbake dens sialinsyre og galaktoserester, deretter galaktosylert ved bruk av en galaktosedonor og en galaktosyltransferase, og deretter pegylert ved bruk av ST3Gal3 og en donor av PEG-sialinsyre.

I enda et annet eksempel på utførelsesform blir G-CSF ikke først behandlet med sialidase, men blir glykopegyllert ved bruk av en sialinsyre overføringsreaksjon med modifierende gruppe-sialinsyre-kassetten, og et enzym slik som ST3Gal3.

I et ytterligere eksempel på utførelsesform blir G-CSF uttrykt i insektceller og modifisert ved følgende metode: N-acetylglukosamin blir først tilføyd til G-CSF ved bruk av en passende N-acetylglukosamin-donor og én eller flere av GnT-I, II, IV og V; G-CSF blir deretter pegylert ved bruk av en donor av PEG-galaktose og en galaktosyltransferase.

G-CSF produsert i gjær kan også bli glykopegyllert. For eksempel blir G-CSF først behandlet med endoglykanase for å trimme tilbake glykosylgruppene, galaktosylert ved bruk av en galaktosedonor og en galaktosyltransferase, og blir deretter pegylert med ST3Gal3 og en donor av PEG-sialinsyre.

Tilføyelse av glykosylerings seter til et peptid eller annen struktur blir hensiktsmessig oppnådd ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder ett eller flere glykosylerings seter. Tilføyelsen kan også foretas ved inkorporering av én eller flere spesier som fremviser en -OH gruppe, foretrukket serin eller treoninrester, innenfor sekvensen for G-CSF-peptidet (for O-bundne glykosylerings seter). Tilføyelsen kan foretas ved mutasjon eller ved fullstendig kjemisk syntese av G-CSF-peptidet. Aminosyresekvensen av G-CSF-peptidet blir foretrukket endret gjennom endringer på DNA-nivå, spesielt ved mutasjon av DNA som koder for peptidet ved forhåndsbestemte baser slik at det dannes kodoner som vil translateres til de ønskede aminosyrene. DNA-mutasjonen(e) blir foretrukket foretatt ved bruk av metoder kjent på området.

I et eksempel på utførelsesform blir glykosylerings setet tilføyd ved shuffling av polynukleotider. Polynukleotider som koder for et kandidat-peptid kan moduleres med DNA shuffling-metoder. DNA-stokking ("DNA-shuffling") er en prosess med rekursiv rekombinasjon og mutasjon, utført ved tilfeldig fragmentering av en samling av beslektede gener, fulgt av sammensetting av fragmentene igjen ved en polymerasekjedereaksjon-lignende prosess. Se, f.eks. Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389-391 (1994); og US Patenter Nr. 5,605,793, 5,837,458, 5,830,721 og 5,811,238.

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også fremgangsmåter for tilføyelse (eller

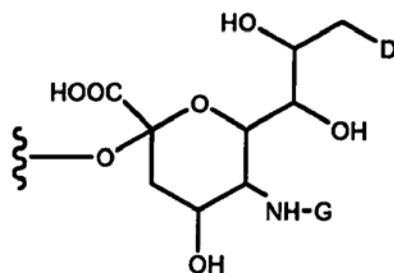
fjerning) av én eller flere valgte glykosylrester til et peptid, etter hvilken et modifisert sukker blir konjugert til minst én av de valgte glykosylrestene av peptidet. Foreliggende utførelsesform er anvendelig, for eksempel, når det er ønskelig å konjugere det modifiserte sukkeret til en valgt glykosylrest som enten ikke er til stede i et peptid eller ikke er til stede i en ønsket mengde. Før kobling av et modifisert sukker til et peptid, blir følgelig den valgte glykosylresten konjugert til G-CSF-peptidet ved enzymatisk eller kjemisk kobling. I en annen utførelsesform blir glykosyleringsmønsteret til et glykopeptid endret før konjugering av det modifiserte sukkeret ved fjerning av en karbohydratrest fra glykopeptidet. Se, for eksempel WO 98/31826.

Addisjon eller fjerning av hvilken som helst karbohydratgruppe til stede på glykopeptidet utføres enten kjemisk eller enzymatisk. Kjemisk deglykosylering blir foretrukket foretatt ved eksponering av polypeptidvarianten for forbindelsen trifluormetansulfonsyre, eller en ekvivalent forbindelse. Denne behandlingen fører til kløyving av de fleste eller alle sukkere unntatt bindings-sukkeret (N-acetylglukosamin eller N-acetylgalaktosamin), mens peptidet forblir intakt. Kjemisk deglykosylering er beskrevet av Hakimuddin et al, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) og av Edge et al, Anal. Biochem. 118: 131 (1981). Enzymatisk kløyving av karbohydratgrupper på polypeptidvarianter kan oppnås ved anvendelse av mange forskjellige endo- og ekso-glykosidaser som beskrevet av Thotakura et al, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Kjemisk addisjon av glykosylgrupper blir utført ved hvilken som helst metode kjent på området. Enzymatisk addisjon av sukkergrupper blir foretrukket oppnådd ved bruk av en modifikasjon av fremgangsmåtene vist heri, ved å erstatte native glykosylenheter med de modifiserte sukkere anvendt i beskrivelsen. Andre metoder for tilføyelse av sukkergrupper er beskrevet i US Patenter Nr. 5,876,980, 6,030,815, 5,728,554 og 5,922,577.

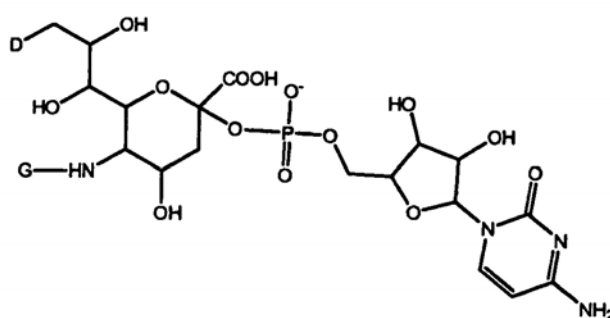
Eksempler på bindingspunkter for valgt glykosylrest omfatter, men er ikke begrenset til: (a) konsensussteder for N- og O-glykosylering; (b) terminale glykosylgrupper som er akseptorer for en glykosyltransferase; (c) arginin, asparagin og histidin; (d) frie karboksylgrupper; (e) frie sulfhydrylgrupper som for eksempel av cystein; (f) frie hydroksylgrupper slik som de fra serin, treonin eller hydroksyprolin; (g) aromatiske rester slik som de fra fenylalanin, tyrosin eller tryptofan; eller (h) amidgruppen av glutamin. Eksempler på fremgangsmåter for anvendelse i foreliggende beskrivelse er beskrevet i WO 87/05330 publisert 11. sept., 1987, og i Aplin og Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., s. 259-306 (1981).

I et eksempel på en utførelsesform tilveiebringer foreliggende beskrivelse en fremgangsmåte for fremstilling av et pegylert G-CSF omfattende gruppen:



hvor D er -OH eller R^1 -L-HN-. Symbolet G er R^1 -L- eller $-C(O)(C_1-C_6)$ alkyl. R^1 er en gruppe omfattende en rettkjedet eller forgrenet poly(etylglykol)-rest. Symbolet L er en linker valgt fra en binding, substituert eller usubstituert alkyl og substituert eller usubstituert heteroalkyl. Generelt når D er OH, er G lik R^1 -L-, og når G er $-C(O)(C_1-C_6)$ alkyl, er D lik R^1 -L-NH-. Fremgangsmåten ifølge foreliggende beskrivelse omfatter (a) bringe et substrat G-CSF-peptid i kontakt med en PEG-sialinsyre-donor og et enzym som er i stand til å overføre PEG-sialinsyregruppen fra donoren til substrat G-CSF peptidet.

Et eksempel på PEG-sialinsyre-donor er et nukleotid-sukker slik som et som har formelen:



og et enzym som overfører PEG-sialinsyren til en aminosyre eller glykosylrest av G-CSF-peptidet, under betingelser egnet for overføringen.

I én utførelsesform blir substrat G-CSF-peptidet uttrykt i en vertscelle før dannelsen av konjugatet ifølge oppfinnelsen. Et eksempel på vertscelle er en mammalsk celle. I andre utførelsesformer er vertscellen en insektcelle, plantecelle, en bakterie eller en sopp.

Fremgangsmåten presentert heri er anvendelig for hvert av G-CSF-konjugatene vist i avsnittene ovenfor.

G-CSF-peptider modifisert ved fremgangsmåtene ifølge beskrivelsen kan være syntetiske eller villtype-peptider eller de kan være muterte peptider, fremstilt ved metoder kjent på området, slik som seterrettet mutagenese. Glykosylering av peptider er typisk enten N-bundet eller O-bundet. Et eksempel på N-binding er binding av det modifiserte sukkeret til sidekjeden av en asparaginrest. Tripeptidsekvensen asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er hvilken som helst aminosyre unntatt

prolin, er gjenkjenningssekvensene for enzymatisk binding av en karbohydratgruppe til asparagin-sidekjeden. Tilstedeværelse av den ene eller andre av disse tripeptid-sekvensene i et polypeptid danner følgelig et potensielt glykosyleringssete. O-bundet glykosylering refererer til binding av ett sukker (f.eks. N-acetylgalaktosamin, galaktose, mannose, GlcNAc, glukose, fukose eller xylose) til hydrokso-sidekjeden av en hydroksyaminosyre, foretrukket serin eller treonin, selv om uvanlige eller ikke-naturlige aminosyrer, f.eks. 5-hydroksyprolin eller 5-hydroksylysin også kan anvendes.

Addisjon av glykosyleringsseter til et peptid eller annen struktur kan foretas i overensstemmelse med foreliggende beskrivelse ved å endre aminosyresekvensen slik at den inneholder ett eller flere glykosyleringsseter. Tilføyelse av glykosyleringsseter kan også foretas ved inkorporering av én eller flere spesier som fremviser en -OH-gruppe, foretrukket serin eller treoninrester, i sekvensen til peptidet (for O-bundne glykosyleringsseter). Tilføyelsen kan foretas ved mutasjon eller ved fullstendig kjemisk syntese av peptidet. Aminosyresekvensen av peptidet blir i noen utførelsesformer endret gjennom endringer på DNA-nivå, spesielt ved mutasjon av DNA som koder for peptidet ved forhåndsbestemte baser slik at det dannes kodoner som vil translateres til ønskede aminosyrer. DNA-mutasjonen(e) blir foretatt ved bruk av metoder kjent på området

I et eksempel på utførelsesform blir glykosyleringssetet tilføyd ved shuffling av polynukleotider. Polynukleotider som koder for et kandidat-peptid kan moduleres med DNA shuffling-metoder. DNA-shuffling er en prosess med rekursiv rekombinasjon og mutasjon, utført ved tilfeldig fragmentering av en samling av beslektede gener, fulgt av sammensetting av fragmentene igjen ved en polymerasekjedereaksjon-lignende prosess. Se f.eks. Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 (1994); Stemmer, Nature 370:389-391 (1994); og U.S. Patenter Nr. 5,605,793, 5,837,458, 5,830,721 og 5,811,238.

Eksempler på fremgangsmåter for addisjon eller fjerning av glykosyleringsseter, og addisjon eller fjerning av glykosylstrukturer eller substrukturer er detaljert beskrevet i WO04/099231, WO03/031464.

Foreliggende beskrivelse anvender også metoder for tilføyelse (eller fjerning) av én eller flere valgte glykosylrester til et G-CSF-peptid, etter hvilken et modifisert sukker blir konjugert til minst én av de valgte glykosylrestene av peptidet. Slike teknikker er anvendelige, for eksempel, når det er ønskelig å konjugere det modifiserte sukkeret til en valgt glykosylrest som enten ikke er til stede i et G-CSF-peptid eller ikke er til stede i en ønsket mengde. Før kobling av et modifisert sukker til et peptid, blir følgelig den valgte glykosylresten konjugert til G-CSF-peptidet ved enzymatisk eller kjemisk kobling. I en annen utførelsesform blir glykosyleringsmønsteret til et glykopeptid endret før

konjugering av det modifiserte sukkeret ved fjerning av en karbohydratrest fra glykopeptidet. Se, for eksempel WO 98/31826.

Eksempler på bindingspunkter for valgt glykosylrest omfatter, men er ikke begrenset til: (a) konsensusseter for N-bundet glykosylering, og seter for O-bundet glykosylering; (b) terminale glykosylgrupper som er akseptorer for en glykosyltransferase; (c) arginin, asparagin og histidin; (d) frie karboksylgrupper; (e) frie sulfhydrylgrupper som for eksempel fra cystein; (f) frie hydroksylgrupper slik som de fra serin, treonin eller hydroksyprolin; (g) aromatiske rester slik som de fra fenylalanin, tyrosin eller tryptofan; eller (h) amidgruppen fra glutamin. Eksempler på fremgangsmåter for anvendelse i foreliggende beskrivelseer beskrevet i WO 87/05330 publisert 11. sept., 1987, og i Aplin og Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., s. 259-306 (1981).

I overensstemmelse med foreliggende beskrivelse blir PEG-modifiserte sukkere konjugert til glykosylert eller ikke-glykosylert peptid ved anvendelse av egnet enzym for å mediere konjugering. Foretrukket blir konsentrasjonene av det/de modifiserte donor sukker(e), enzym(er) og akseptor-peptid(er) valgt slik at glykosylering fortsetter helt til ønsket grad av modifikasjon av akseptoren er oppnådd. Det vil forstås at betraktningene diskutert nedenfor, selv om de er vist i sammenheng med en sialyltransferase, er generelt anvendelige for andre glykosyltransferasereaksjoner.

Flere metoder for anvendelse av glykosyltransferaser for syntese av ønkede oligosakkaridstrukturer er kjent og er generelt anvendelige for foreliggende beskrivelse. Eksempler på metoder er beskrevet, for eksempel i, WO 96/32491, Ito et al., Pure Appl. Chem. 65: 753 (1993), US Pat. Nr. 5,352,670, 5,374,541, 5,545,553, og felles eid US Pat. Nr. 6,399,336 og 6,440,703.

Foreliggende beskrivelse utøves ved anvendelse av en enkelt glykosyltransferase eller en kombinasjon av glykosyltransferaser. For eksempel kan det anvendes en kombinasjon av en sialyltransferase og en galaktosyltransferase. I slike utførelsesformer hvor det anvendes mer enn ett enzym, blir enzymene og substratene foretrukket kombinert i en initiell rekajsonsblending, eller enzymene og reagensene for en andre enzymatisk reaksjon blir tilsatt til reaksjonsmediet straks den første reaksjonen er ferdig eller nesten ferdig. Ved å utføre to enzymatiske reaksjoner i rekkefølge i en enkelt beholder, forbedres totalt utbytte fremfor fremgangsmåter hvor en intermediær spesie isoleres. Videre reduseres opprydding og avfall av ekstra løsningsmidler og biprodukter.

I én utførelsesform er hvert av det første og andre enzymet en glykosyltransferase. I en annen foretrukket utførelsesform er ett enzym en endoglykosidase. I en annen utførelsesform blir mer enn to enzymer anvendt for å sette sammen det modifiserte glykoproteinet ifølge oppfinnelsen. Enzymene blir anvendt for å

endre en sakkaridstruktur på G-CSF-peptidet ved hvilket som helst punkt enten før eller etter addisjon av det modifiserte sukkeret til peptidet.

I enda en annen utførelsesform anvender fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse én eller flere ekso- eller endoglykosidaser. Glykosidasen kan være en mutant og/eller en variant, som danner eller er konstruert til å danne glykosylbindinger heller enn å bryte dem. En slik mutert glykanase inkluderer generelt en substitusjon av en aminosyrerest med en sur aminosyrerest fra det aktive sete. For eksempel, når endoglykanase er endo-H, vil restene ved det substituerte aktive sete typisk være Asp ved posisjon 130, Glu ved posisjon 132 eller en kombinasjon derav. Aminosyrene blir generelt erstattet med serin, alanin, asparagin eller glutamin.

Et slikt mutert enzym kan katalysere reaksjonen ved et syntesetrinn som er analogt med den omvendte reaksjonen av hydrolysetrinnet ved endoglykanase. I en slik utførelsesform inneholder glykosyl-donormolekylet (f.eks. en ønsket oligo- eller monosakkarid-struktur) en utgående gruppe og reaksjonen fortsetter med addisjon av donormolekylet til en GlcNAc-rest på proteinet. For eksempel kan den utgående gruppen være et halogen, slik som fluorid. I andre utførelsesformer er den utgående gruppen en Asn, eller en Asn-peptidgruppe. I enda ytterligere utførelsesformer er GlcNAc-resten på glykosyl-donormolekylet modifisert. For eksempel kan GlcNAc-residuet omfatte en 1,2 oksazolin-gruppe.

I én utførelsesform er enzymer anvendt for fremstilling av et konjugat ifølge oppfinnelsen til stede i en katalytisk mengde. Den katalytiske mengden av et bestemt enzym varierer i henhold til konsentrasjon av dette enzymets substrat så vel som til reaksjonsbetingelser slik som temperatur, tid og pH. Metoder for bestemmelse av den katalytiske mengden for et gitt enzym under forhåndsvalgte substratkonsentrasjoner og reaksjonsbetingelser er velkjent for fagfolk på området.

Temperaturen som reaksjoner i henhold til foreliggende oppfinnelse blir utført ved kan variere fra like over frysing til temperaturene hvor det mest følsomme enzymet denatureres. Foretrukne temperaturområder er omtrent 0° C til omtrent 55° C, og mer foretrukket omtrent 20° C til omtrent 37° C. I et annet eksempel på utførelsesform, blir én eller flere deler av foreliggende fremgangsmåte utført ved en forhøyet temperatur ved bruk av et termofilt enzym.

I ett aspekt blir reaksjonsblandingen opprettholdt i en tidsperiode tilstrekkelig for at akseptoren skal bli glykosylert, for derved å danne det ønskede konjugatet. Noe av konjugatet kan ofte detekteres etter noen få timer, mens gjenvinnbare mengder vanligvis oppnås innen 24 timer eller mindre. Fagfolk på området vil forstå at reaksjonsraten er avhengig av flere variable faktorer (f.eks. enzymkonsentrasjon, donor-konsentrasjon, akseptorkonsentrasjon, temperatur, løsningsmiddelvolum), som er

optimalisert for et valgt system.

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også produksjon av modifiserte peptider i industriell skala. Som anvendt heri refererer en "industriell skala" generelt til produksjon av minst ett gram ferdig, rensset konjugat.

I diskusjonen som følger blir oppfinnelsen eksemplifisert ved konjugering av modifiserte sialinsyre-grupper til et glykosylert peptid. Eksemplet på modifisert sialinsyre er merket med PEG.

En enzymatisk metode kan anvendes for selektiv innføring av PEGylerte eller PPGylerte karbohydrater til et peptid eller glykopeptid. Metoden anvender modifiserte sukkere inneholdende PEG, PPG, eller en maskert reaktiv funksjonell gruppe, og blir kombinert med hensiktsmessig glykosyltransferase eller glykosyntase. Ved å velge den glykosyltransferasen som vil danne den ønskede karbohydrat-koblingen og anvende det modifiserte sukkeret som donorsubstrat, kan PEG eller PPG innføres direkte til G-CSF-peptid-ryggraden, til eksisterende sukkerrester av et glykopeptid eller til sukkerrester som har blitt tilføyd til et peptid.

En akseptor for sialyltransferasen er til stede på G-CSF-peptidet som skal modifiseres ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse enten som en naturlig forekommende struktur eller én anbrakt der rekombinant, enzymatisk eller kjemisk. Egnede akseptorer omfatter, for eksempel, galaktosyl-akseptorer slik som Gal β 1,4GlcNAc, Gal β 1,4GalNAc, Gal β 1,3GalNAc, lakto-N-tetraose, Gal β 1,3GlcNAc, Gal β 1,3Ara, Gal β 1,6GlcNAc, Gal β 1,4Glc (laktose), og andre akseptorer kjent for fagfolk på området (se f.eks. Paulson et al, J. Biol. Chem. 253: 5617- 5624 (1978)).

I én utførelsesform er en akseptor for sialyltransferasen til stede på glykopeptidet som skal modifiseres ved *in vivo* syntese av glykopeptidet. Slike glykopeptider kan bli sialylert ved anvendelse av foreliggende fremgangsmåter uten foregående modifikasjon av glykosyleringsmønsteret av glykopeptidet. Alternativt kan fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen anvendes for å sialylere et peptid som ikke omfatter en egnet akseptor; først modifiseres G-CSF-peptidet til å omfatte en akseptor ved fremgangsmåter kjent for fagfolk på området. I et eksempel på en utførelsesform, blir en GalNAc-rest tilføyd ved virkningen av en GalNAc transferase.

I et eksempel på en utførelsesform blir galaktosyl-akseptoren satt sammen ved å binde en galaktoserest til en passende akseptor bundet til G-CSF-peptidet, f.eks. en GlcNAc. Fremgangsmåten omfatter å inkubere G-CSF-peptidet som skal modifiseres med en reaksjonsblanding som inneholder en passende mengde av en galaktosyltransferase (f.eks. gal β 1,3 eller gal β 1,4), og en egnet galaktosyl donor (f.eks. UDP-galaktose). Reaksjonen får fortsette til hovedsakelig til den er fullført eller, alternativt, blir reaksjonen avsluttet når en forhåndsvalgt mengde av galaktoseresten er tilsatt. Andre

metoder for å sette sammen en utvalgt sakkarid-akseptor vil være innlysende for fagfolk på området.

I enda en annen utførelsesform, blir glykopeptid-bundne oligosakkarider først "trimmet," enten fullstendig eller delvis, for å eksponere enten en akseptor for sialyltransferasen eller en gruppe til hvilken én eller flere passende rester kan tilføyes for å oppnå en egnet akseptor. Enzymer slik som glykosyltransferaser og endoglykosidaser (se, for eksempel US Patent Nr. 5,716,812) er anvendelige for bindings- og trimmings-reaksjonene.

I diskusjonen som følger blir fremgangsmåten ifølge foreliggende beskrivelse eksemplifisert ved bruk av modifiserte sukkere som har en PEG-gruppe bundet dertil.

I et eksempel på en utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse hvor en karbohydratrest blir "trimmet" før addisjon av det modifiserte sukkeret blir høy mannose trimmet tilbake til første generasjon "biantennary"-struktur. Et modifisert sukker som har en PEG-gruppe blir konjugert til én eller flere av sukkerestene eksponert ved å "trimme tilbake." I ett eksempel blir en PEG-gruppe tilføyd via en GlcNAc-gruppe konjugert til PEG-gruppen. Den modifiserte GlcNAc er festet til én eller begge av de terminale mannoserestene av biantennary-strukturen. Alternativt kan en umodifisert GlcNAc tilføyes til den ene eller begge de terminale endene av de forgrenede spesier.

I et annet eksempel på utførelsesform blir en PEG-gruppe tilføyd til én eller begge av de terminale mannoserestene av biantennary-strukturen via et modifisert sukker som har en galaktoserest, som er konjugert til en GlcNAc-rest tilføyd til den terminale mannoseresten. Alternativt kan en umodifisert Gal tilføyes til én av eller begge de terminale GlcNAc-restene.

I enda et ytterligere eksempel blir en PEG-gruppe tilføyd til en Gal-rest ved anvendelse av en modifisert sialinsyre.

I et annet eksempel på utførelsesform blir en høy-mannose struktur "trimmet tilbake" til mannose fra hvilken biantennary-strukturen forgrenes. I ett eksempel blir en PEG-gruppe tilføyd via en GlcNAc modifisert med polymeren. Alternativt blir en umodifisert GlcNAc tilføyd til mannosen, fulgt av en Gal med en forbundet PEG-gruppe. I enda en annen utførelsesform blir umodifisert GlcNAc og Gal-rester sekvensielt tilføyd til mannosen, fulgt av en sialinsyregruppe modifisert med en PEG-gruppe.

I et ytterligere eksempel på utførelsesform blir høy-mannose "trimmet tilbake" til GlcNAc som den første mannosen er forbundet med. GlcNAc blir konjugert til en Gal-rest som har en PEG-gruppe. Alternativt blir en umodifisert Gal tilføyd til GlcNAc, fulgt av tilføydelse av en sialinsyre modifisert med et vannløselig sukker. I enda et ytterligere eksempel blir den terminale GlcNAc konjugert med Gal og GlcNAc blir deretter fukosylert med en modifisert fukose som har en PEG-gruppe.

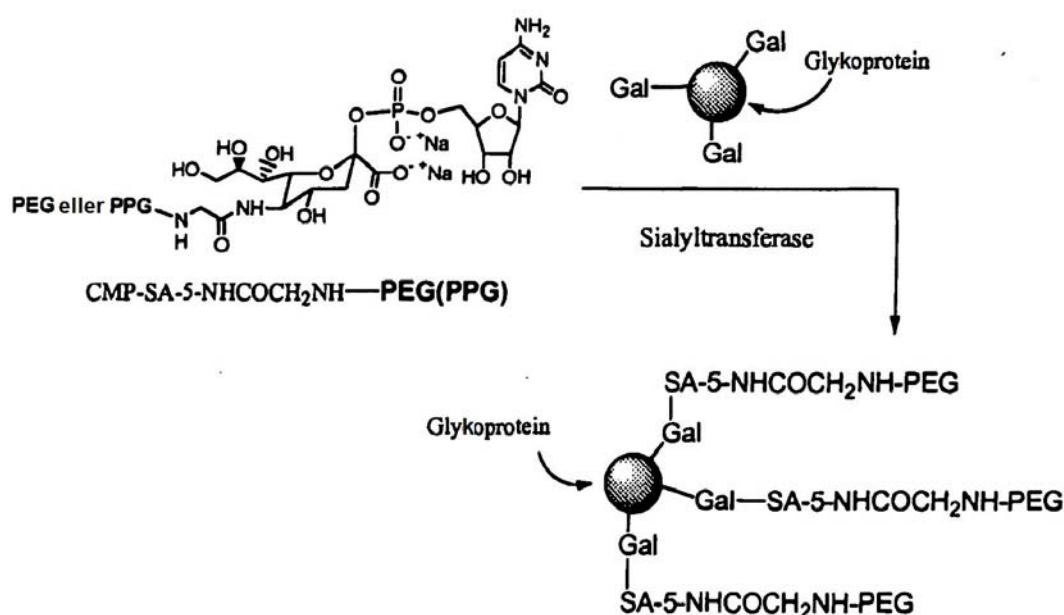
Høy-mannose kan også bli trimmet tilbake til den første GlcNAc forbundet til Asn av peptidet. I ett eksempel blir GlcNAc fra GlcNAc-(Fuc)_a-residuet konjugert med en GlcNAc som bærer en vannløselig polymer. I et annet eksempel blir GlcNAc fra GlcNAc-(Fuc)_a-residuet modifisert med Gal, som bærer en vannløselig polymer. I en enda ytterligere utførelsesform blir GlcNAc modifisert med Gal, fulgt av konjugering til Gal fra en sialinsyre modifisert med en PEG-gruppe.

Andre eksempler på utførelsesformer er vist i felles eid US Patentsøknad publikasjoner: 20040132640; 20040063911; 20040137557; US Patentsøknader nr: 10/369,979; 10/410,913; 10/360,770; 10/410,945 og PCT/US02/32263.

Eksempelene vist ovenfor gir en illustrasjon på styrken av fremgangsmåtene vist heri. Ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet heri, er det mulig å "trimme tilbake" og bygge opp en karbohydratrest fra hovedsakelig hvilken som helst ønsket struktur. Det modifiserte sukkeret kan tilføyes til de terminale endene av karbohydratgruppen som vist ovenfor, eller den kan ligge mellom peptidkjernen og de terminale endene av karbohydratet.

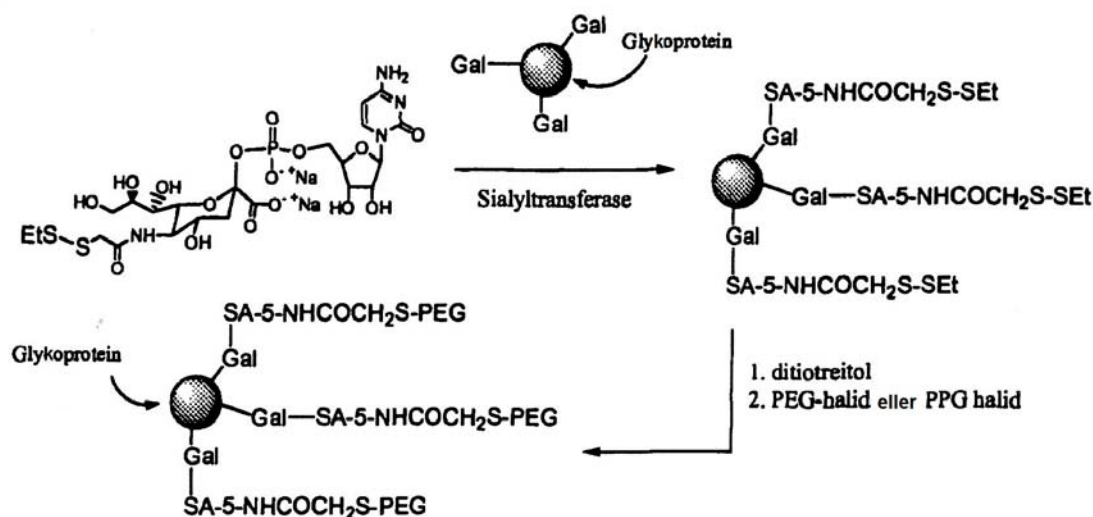
I et eksempel på utførelsesform, blir en eksisterende sialinsyre fjernet fra et G-CSF-glykopeptid ved anvendelse av en sialidase, hvilket derved avdekker alle eller de fleste av de underliggende galaktosylrestene. Alternativt blir et peptid eller glykopeptid merket med galaktoserester, eller en oligosakkaridrest som terminerer i en galaktose-enhet. Etter eksponering av eller addisjon av galaktoserestene, blir en passende sialyltransferase anvendt for å tilføye en modifisert sialinsyre. Metoden er oppsummert i Skjema 1.

Skjema 1



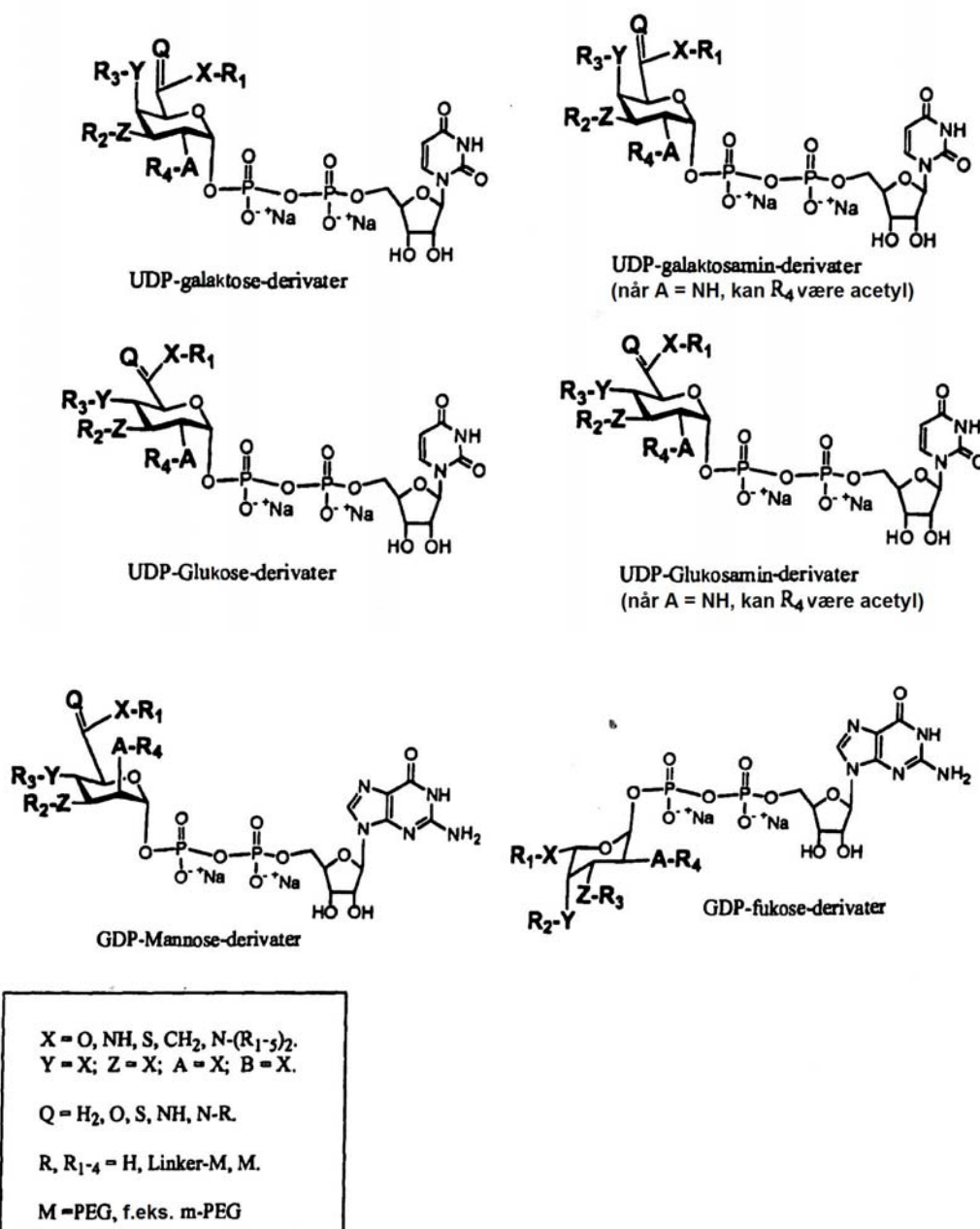
I enda en ytterligere metode, oppsummert i Skjema 2, er en maskert reaktiv funksjonalitet til stede på sialinsyren. Den maskerte reaktive gruppen er foretrukket uberørt av betingelsene anvendt for å forbinde den modifiserte sialinsyren til G-CSF. Etter kovalent binding av den modifiserte sialinsyren til G-CSF-peptidet, blir maskeringen fjernet og G-CSF-peptidet blir konjugert til et middel slik som PEG. Midlet blir konjugert til peptidet på en spesifikk måte ved dets reaksjon med den umaskerte reaktive gruppen på den modifiserte sukkerresten.

Skjema 2



Hvilket som helst modifisert sukker vist heri kan anvendes med dens hensiktsmessige glykosyltransferase, avhengig av de terminale sukkere av oligosakkarid sidekjeden av glykopeptidet (Tabell 1). Som diskutert ovenfor kan det terminale sukkeret av glykopeptidet nødvendig for innføring av den pegylerte strukturen innføres naturlig under ekspresjon eller den kan fremstilles etter ekspresjon ved anvendelse av passende glykosidase(r), glykosyltransferase(r) eller blanding av glykosidase(r) og glykosyltransferase(r).

Tabell 1



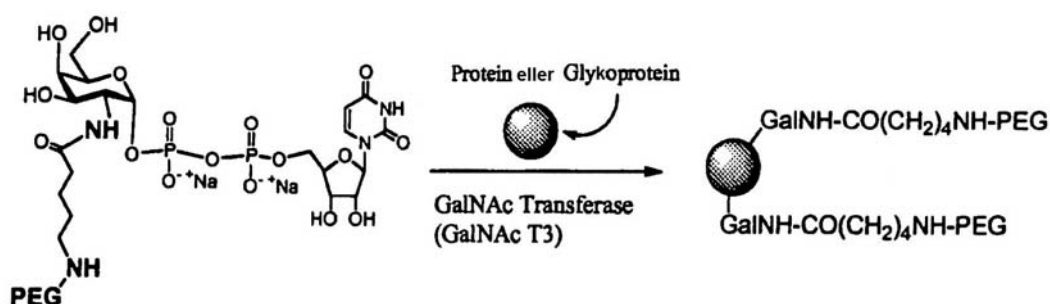
I et ytterligere eksempel på utførelsesform, blir UDP-galaktose-PEG omsatt med bovin melk β 1,4-galaktosyltransferase, for derved å overføre den modifiserte galaktosen til den passende terminale N-acetylglukosamin-strukturen. De terminale GlcNAc-restene på glykopeptidet kan fremstilles under ekspresjon, som kan finne sted i slike ekspresjonssystemer som mammalske, fra insekt, plante eller sopp, men som også kan fremstilles ved behandling av glykopeptidet med en sialidase og/eller glykosidase og/eller glykosyltransferase, etter behov.

I et annet eksempel på utførelsesform blir en GlcNAc transferase, slik som GNT1-5, anvendt for å overføre pegylert-GlcN til en terminal mannoserest på et glykopeptid. I et enda ytterligere eksempel på utførelsesform, blir de N- og/eller O-bundne

glykanstrukturene enzymatisk fjernet fra et glykopeptid for å eksponere en aminosyre eller en terminal glykosylrest som deretter blir konjugert med det modifiserte sukkeret. For eksempel blir en endoglykanase anvendt for å fjerne de N-bundne strukturene av et glykopeptid for å eksponere en terminal GlcNAc som en GlcNAc-bundet-Asn på glykopeptidet. UDP-Gal-PEG og passende galaktosyltransferase anvendes for å innføre PEG-galaktosen funksjonelt til den eksponerte GlcNAc.

I en alternativ utførelsesform blir det modifiserte sukkeret tilføyd direkte til G-CSF-peptid ryggraden ved bruk av en glykosyltransferase kjent å overføre sukkerrester til peptidryggraden. Dette eksemplet på en utførelsesform er vist i Skjema 3. Eksempler på glykosyltransferaser anvendelige ved utøvelse av foreliggende oppfinnelse omfatter, men er ikke begrenset til, GalNAc transferaser (GalNAc T1-14), GlcNAc transferaser, fukosyltransferaser, glukosyltransferaser, xylosyltransferaser, mannosyltransferaser og lignende. Anvendelse av denne metoden muliggjør direkte addisjon av modifiserte sukkere til peptider som mangler ethvert karbohydrat eller, alternativt, til eksisterende glykopeptider. I begge tilfeller finner addisjon av det modifiserte sukkeret sted ved spesifikke stillinger på peptidryggraden som definert ved substratspesifisiteten av glykosyltransferasen og ikke på en tilfeldig måte som den som finner sted under modifikasjon av et proteins peptidryggrad ved bruk av kjemiske metoder. En rekke midler kan innføres i proteiner eller glykopeptider som mangler glykosyltransferase substrat peptidsekvensen ved å konstruere den passende aminosyresekvensen inn i polypeptidkjeden.

Skjema 3



I hvert av eksemplene på utførelsesformer vist ovenfor, kan ett eller flere ytterligere kjemiske eller enzymatiske modifikasjonstrinn anvendes etter konjugering av det modifiserte sukkeret til peptidet. I et eksempel på utførelsesform blir et enzym (f.eks. fukosyltransferase) anvendt for å tilføye en glykosylenhet (f.eks. fukose) til det terminale modifiserte sukkeret forbundet til G-CSF-peptidet. I et annet eksempel blir en enzymatisk reaksjon anvendt for å "dekke" seter til hvilke det modifiserte sukkeret var ute av stand til å konjugere. Alternativt blir en kjemisk reaksjon anvendt for å endre strukturen av konjugert modifisert sukker. For eksempel blir det konjugerte modifiserte

sukkeret omsatt med midler som stabiliserer eller destabiliserer dets binding med peptidkomponenten til hvilken det modifiserte sukkeret er forbundet. I et annet eksempel blir en komponent av det modifiserte sukkeret avbeskyttet etter dets konjugering til peptidet. Fagfolk på området vil forstå at det finnes en rekke enzymatiske og kjemiske metoder som er anvendelige i fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse ved et trinn etter at det modifiserte sukkeret er konjugert til G-CSF-peptidet.

Enzymer

I tillegg til enzymene diskutert ovenfor i sammenheng med dannelsen av det acyl-bundne konjugatet, kan glykosyleringsmønsteret av konjugatet og utgangssubstratene (f.eks. peptider, lipider) utarbeides, trimmes tilbake eller på annen måte modifiseres ved metoder som anvender andre enzymer. Fremgangsmåtene for remodellering av peptider og lipider ved bruk av enzymer som overfører en sukker-donor til en akseptor er diskutert i nærmere detaljer i DeFrees, WO 03/031464 A2, publisert 17. april, 2003. En kort oppsummering av utvalgte enzymer for anvendelse i foreliggende fremgangsmåte er vist nedenfor.

Glykosyltransferaser

Glykosyltransferaser katalyserer tilføyelse av aktiverte sukkere (donor NDP- eller NMP-sukker), på en trinnvis måte, til et protein, glykopeptid, lipid eller glykolipid eller til den ikke-reduserende enden av et voksende oligosakkarid. N-bundne glykopeptider blir syntetisert via en transferase og en lipidbundet oligosakkarid-donor Dol-PP-NAG₂Glc₃Man₉ i en blokk overføring fulgt av trimming av kjernen. I dette tilfelle er karakteren av "kjerne" sakkaridet noe forskjellig fra senere bindinger. Et svært stort antall glykosyltransferaser er kjent på området.

Glykosyltransferasen for anvendelse i foreliggende beskrivelse kan være hvilken som helst så lenge den kan anvende det modifiserte sukkeret som en sukkerdonor. Eksempler på slike enzymer omfatter "Leloir pathway glykosyltransferase", slik som galaktosyltransferase, N-acetylglukosaminyltransferase, N-acetylgalaktosaminyltransferase, fukosyltransferase, sialyltransferase, mannosyltransferase, xylosyltransferase, glukurononyltransferase og lignende.

For enzymatisk sakkaridsyntese som omfatter glykosyltransferasereaksjoner kan glykosyltransferase være klonet, eller isolert fra hvilken som helst kilde. Mange klonede glykosyltransferaser er kjent, i likhet med deres polynukleotidsekvenser. Se, f.eks. "The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases," (<http://www.vei.co.uk/TGN/gtguide.htm>). Aminosyresekvenser av glykosyltransferaser og nukleotidsekvenser som koder for glykosyltransferaser fra hvilke aminosyresekvensene kan deduseres er også funnet i

forskjellige offentlig tilgjengelige databaser, inkludert GenBank, Swiss-Prot, EMBL og andre.

Glykosyltransferaser som kan anvendes i fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse omfatter, men er ikke begrenset til, galaktosyltransferaser, fukosyltransferaser, glukosyltransferaser, N-acetylgalaktosaminyltransferaser, N-acetylglukosaminyl-transferaser, glukuronyltransferaser, sialyltransferaser, mannosyltransferaser, glukuronsyretransferaser, galakturonsyretransferaser og oligosakkaryltransferaser. Egnede glykosyltransferaser omfatter slike som oppnås fra eukaryoter, så vel som fra prokaryoter.

DNA som koder for glykosyltransferaser kan oppnås ved kjemisk syntese, ved screening av reverse transkripter av mRNA fra egnede celler eller cellelinjekulturer, ved screening av genomiske biblioteker fra egnede celler, eller ved kombinasjoner av disse metodene. Screening av mRNA eller genomisk DNA kan utføres med oligonukleotidprober dannet fra gensekvensen av glykosyltransferase. Prober kan være merket med en detekterbar gruppe slik som en fluorescerende gruppe, et radioaktivt atom eller en kjemiluminescerende gruppe i overensstemmelse med kjente metoder og anvendt i konvensjonelle hybridiseringsanalyser. Alternativt kan glykosyltransferase-gensekvensene oppnås ved anvendelse av polymerasekjedereaksjon(PCR)-metoden, hvor PCR oligonukleotidprimerne er fremstilt fra glykosyltransferase gensekvensen. Se US Pat. Nr. 4,683,195 ved Mullis et al. og US Pat. Nr. 4,683,202 ved Mullis.

Glykosyltransferasen kan syntetiseres i vertsceller transformert med vektorer inneholdende DNA som koder for glykosyltransferaseenzymet. Vektorer anvendes enten for å amplifisere DNA som koder for glykosyltransferaseenzymet og/eller for å uttrykke DNA som koder for glykosyltransferaseenzymet. En ekspresjonsvektor er en replikerbar DNA-konstruksjon hvor en DNA-sekvens som koder for glykosyltransferaseenzymet blir operabelt bundet til passende kontrollsekvenser i stand til å bevirke ekspresjon av glykosyltransferaseenzymet i en egnet vert. Behovet for slike kontrollsekvenser vil variere avhengig av verten valgt og transformasjonsmetoden valgt. Generelt omfatter kontrollsekvenser en transkripsjonspromoter, en eventuell operatorsekvens for å regulere transkripsjon, en sekvens som koder for egnede mRNA ribosombindings seter, og sekvenser som kontrollerer terminering av transkripsjon og translasjon. Amplifikasjonsvektorer krever ikke ekspresjonskontroll-domener. Alt som er nødvendig er evne til å replikere i en vert, vanligvis meddelt ved et replikasjonsorigo, og et seleksjonsgen for å lette gjenkjenning av transformanter.

I et eksempel på en utførelsesform anvender fremgangsmåten ifølge foreliggende beskrivelse et prokaryot enzym. Slike glykosyltransferaser omfatter enzymer involvert i syntese av lipooligosakkarider (LOS), som produseres av mange gram-negative bakterier (Preston et al, Critical Reviews in Microbiology 23(3): 139-180 (1996)). Slike enzymer

omfatter, men er ikke begrenset til, proteinene fra *rfa*-operonene fra arter slik som *E. coli* og *Salmonella typhimurium*, som omfatter en β 1,6 galaktosyltransferase og en β 1,3 galaktosyltransferase (se f.eks. EMBL Aksesjonsnr. M80599 og M86935 (*E. coli*); EMBL Aksesjonsnr. S56361 (*S. typhimurium*)), en glukosyltransferase (Swiss-Prot Aksesjonsnr. P25740 (*E. coli*)), en β 1,2-glukosyltransferase (*rfaK*) (Swiss-Prot Aksesjonsnr. P27129 (*E. coli*) og Swiss-Prot Aksesjonsnr. P 19817 (*S. typhimurium*)), og en β 1,2-N-acetylglukosaminyltransferase (*rfaK*) (EMBL Aksesjonsnr. U00039 (*E. coli*)). Andre glykosyltransferaser for hvilke aminosyresekvenser er kjent omfatter slike som kodes for av operoner slik som *rfaB*, som har blitt karakterisert i organismer slik som *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium leprosum*, og *rh1*-operonet fra *Pseudomonas aeruginosa*.

Også egnet for anvendelse i foreliggende beskrivelse er glykosyltransferaser som er involvert i fremstilling av strukturer inneholdende lakto-N-neotetraose, D-galaktosyl- β 1,4-N-acetyl-D-glukosaminyl- β 1,3-D-galaktosyl- β 1,4-D-glukose, og P^k blodgruppe trisakkaridsekvensen, D-galaktosyl- α 1,4-D-galaktosyl- β 1,4-D-glukose, som har blitt identifisert i LOS fra de mukosale patogenene *Neisseria gonorrhoeae* og *N. meningitidis* (Scholten et al, J. Med. Microbiol. 41: 236-243 (1994)). Genene fra *N. meningitidis* og *N. gonorrhoeae* som koder for glykosyltransferaser involvert i biosyntese av disse strukturene har blitt identifisert fra *N. meningitidis* immunotypene L3 og L1 (Jennings et al., Mol. Microbiol. 18: 729-740 (1995)) og *N. gonorrhoeae* mutant F62 (Gotshlich, J. Exp. Med. 180: 2181-2190 (1994)). I *N. meningitidis*, koder et lokus bestående av tre gener, *IgtA*, *IgtB* og *IgE*, for glykosyltransferaseenzymene nødvendig for addisjon av de siste tre av sukkerene i lakto-N-neotetraose-kjeden (Wakarchuk et al, J. Biol. Chem. 271: 19166-73 (1996)). Nylig ble den enzymatiske aktiviteten av *IgtB* og *IgtA* genproduktet demonstrert, hvilket gir det første direkte bevis for deres foreslåtte glykosyltransferase-funksjon (Wakarchuk et al, J. Biol. Chem. 271(45): 28271-276 (1996)). I *N. gonorrhoeae*, finnes to ytterligere gener, *IgtD* som tilføyer β -D-GalNAc til 3-stillingen av den terminale galaktosen av lakto-N-neotetraosestrukturen og *IgtC* som tilføyer en terminal α -D-Gal til laktose-elementet av en trunkert LOS, hvilket følgelig danner P^k blodgruppe antigenstrukturen (Gotshlich (1994), supra). I *N. meningitidis* uttrykker en separat immunotype L1 også P^k blodgruppe-antigenet og har blitt vist å ha et *IgtC*-gen (Jennings et al, (1995), supra). *Neisseria* glykosyltransferaser og assosierte gener er også beskrevet i USPN 5,545,553 (Gotshlich). Gener for α 1,2-fukosyltransferase og α 1,3-fukosyltransferase fra *Helicobacter pylori* har også blitt karakterisert (Martin et al, J. Biol. Chem. 272: 21349-21356 (1997)). Også anvendelig i foreliggende oppfinnelse er glykosyltransferasene fra *Campylobacter jejuni* (se for eksempel http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_42.html).

Fukosyltransferaser

I noen utførelsesformer er en glykosyltransferase anvendt i fremgangsmåten ifølge beskrivelsen en fukosyltransferase. Fukosyltransferaser er kjent for fagfolk på området. Eksempel på fukosyltransferaser omfatter enzymer som overfører L-fukose fra GDP-fukose til en hydroksystilling av et akseptor-sukker. Fukosyltransferaser som overfører ikke-nukleotid-sukker til en akseptor er også anvendelige i foreliggende beskrivelse.

I noen utførelsesformer er akseptor-sukkeret, for eksempel, GlcNAc i en $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta$ -gruppe i et oligosakkarid-glykosid. Egnede fukosyltransferaser for denne reaksjonen omfatter $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta1-\alpha(1\rightarrow3,4)$ fukosyltransferase (FTIII E.C. Nr. 2.4.1.65), som først ble karakterisert fra human melk (se Palcic, et al, Carbohydrate Res. 190: 1-11 (1989); Prieels, et al, J. Biol. Chem. 256: 10456-10463 (1981); og Nunez, et al, Can. J. Chem. 59: 2086-2095 (1981)) og $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta$ - α fukosyltransferaser (FTIV, FTV, FTVI) som er funnet i humant serum. FTVII (E.C. Nr. 2.4.1.65), en sialyl $\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta((1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta$ fukosyltransferase, har også blitt karakterisert. En rekombinant form av $\text{Gal}\beta(1\rightarrow3,4)\text{GlcNAc}\beta-\alpha(1\rightarrow3,4)$ fukosyltransferase har også blitt karakterisert (se, Dumas, et al, Bioorg. Med. Letters 1: 425-428 (1991) og Kukowska-Latallo, et al, Genes and Development 4: 1288- 1303 (1990)). Andre eksempler på fukosyltransferaser omfatter, for eksempel, $\alpha1,2$ fukosyltransferase (E.C. Nr. 2.4.1.69). Enzymatisk fukosylering kan utføres ved fremgangsmåtene beskrevet i Mollicone, et al, Eur. J. Biochem. 191: 169-176 (1990) eller US Patent Nr. 5,374,655. Celler som anvendes for å produsere en fukosyltransferase vil også omfatte et enzymatisk system for syntese av GDP-fukose.

Galaktosyltransferaser

I en annen gruppe av utførelsesformer er glykosyltransferasen en galaktosyltransferase. Eksempler på galaktosyltransferaser omfatter $\alpha(1,3)$ galaktosyltransferaser (E.C. Nr. 2.4.1.151, se f.eks. Dabkowski et al, Transplant Proc. 25:2921 (1993) og Yamamoto et al. Nature 345: 229-233 (1990), bovin (GenBank j04989, Joziassse et al, J. Biol. Chem. 264: 14290- 14297 (1989)), murin (GenBank m26925; Larsen et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989)), fra svin (GenBank L36152; Strahan et al, Immunogenetics 41: 101-105 (1995)). En annen egnet $\alpha1,3$ galaktosyltransferase er den som er involvert i syntese av blodgruppe B-antigenet (EC 2.4.1.37, Yamamoto et al, J. Biol. Chem. 265: 1146-1151 (1990) (humant)). Enda et ytterligere eksempel på galaktosyltransferase er "core" Gal-TI.

Også egnet for anvendelse i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen er $\beta(1,4)$ -galaktosyltransferaser som omfatter for eksempel EC 2.4.1.90 (LacNAc syntetase) og EC 2.4.1.22 (laktosesyntetase) (bovin (D'Agostaro et al, Eur. J. Biochem. 183: 211-217 (1989)), human (Masri et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 657-663 (1988)), murin (Nakazawa et al, J. Biochem. 104: 165-168 (1988)), så vel som E.C. 2.4.1.38 og ceramid-galaktosyltransferase (EC 2.4.1.45, Stahl et al, J. Neurosci. Res. 38: 234-242 (1994)). Andre egnede galaktosyltransferaser omfatter for eksempel $\alpha 1,2$ -galaktosyltransferaser (fra f.eks. *Schizosaccharomyces pombe*, Chapell et al, Mol. Biol. Cell 5: 519-528 (1994)).

Sialyltransferaser

Sialyltransferaser er en annen type glykosyltransferase som er anvendelige i de rekombinante cellene og reaksjonsblandingene ifølge foreliggende beskrivelse. Celler som produserer rekombinante sialyltransferaser vil også produsere CMP-sialinsyre, som er en sialinsyre-donor for sialyltransferaser. Eksempler på sialyltransferaser som er egnet for anvendelse i foreliggende oppfinnelse omfatter ST3Gal III (f.eks. fra rotte, eller human ST3Gal III), ST3Gal IV, ST3Gal I, ST3Gal III, ST6Gal I, ST3Gal V, ST6Gal II, ST6GalNAc I, ST6GalNAc II og ST6GalNAc III (sialyltransferase nomenklaturen anvendt heri er som beskrevet i Tsuji et al, Glycobiology 6: v-xiv (1996)). Et eksempel på $\alpha(2,3)$ sialyltransferase referert til som $\alpha(2,3)$ sialyltransferase (EC 2.4.99.6) overfører sialinsyre til den ikke-reduserende terminale enden av Gal av et $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{Glc}$ disakkarid eller glykosid. Se Van den Eijnden et al, J. Biol. Chem. 256: 3159 (1981), Weinstein et al, J. Biol. Chem. 257: 13845 (1982) og Wen et al, J. Biol. Chem. 267: 21011 (1992). Et annet eksempel på $\alpha 2,3$ -sialyltransferase (EC 2.4.99.4) overfører sialinsyre til den ikke-reduserende terminale Gal av disakkaridet eller glykosidet, se, Rearick et al, J. Biol. Chem. 254: 4444 (1979) og Gillespie et al, J. Biol. Chem. 267: 21004 (1992). Ytterligere eksempler på enzymer omfatter $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc } \alpha 2,6$ sialyltransferase (Se Kurosawa et al Eur. J. Biochem. 219: 375-381 (1994)).

Foretrukket vil sialyltransferasen, for glykosylering av karbohydrater av glykopeptider, være i stand til å overføre sialinsyre til sekvensen $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ -, den mest vanlige siste sekvensen underliggende den terminale sialinsyren på fullstendig sialylerte karbohydratstrukturer (se Tabell 2).

Tabell 2: Sialyltransferaser som anvender $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ -sekvensen som et akseptorsubstrat

Sialyltransferase	Kilde	Sekvens(er) dannet	Ref.
ST6Gal I	Mammalsk	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	1
ST3Gal III	Mammalsk	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST3Gal IV	Mammalsk	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc- NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc-	1
ST6Gal II	Mammalsk	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNA	
ST6Gal II	photobacterium	NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc-	2
ST3Gal V	<i>N. meningitides</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc-	3
1) Gooch et al., Bio/Technology 9: 1347-1355 (1991) 2) Yamamoto et al., J. Biochem. 120: 104-110 (1996) 3) Gilbert et al., J. Biol. Chem. 271: 28271-28276 (1996)			

Et eksempel på en sialyltransferase som er anvendelig i fremgangsmåtene er ST3Gal III, som også er referert til som α (2,3)sialyltransferase (EC 2.4.99.6). Dette enzymet katalyserer overføring av sialinsyre til Gal av et Gal β 1,3GlcNAc eller Gal β 1,4GlcNAc glykosid (se f.eks. Wen et al, J. Biol Chem. 267: 21011 (1992); Van den Eijnden et al, J. Biol Chem. 256: 3159 (1991)) og er ansvarlig for sialylering av asparagin-bundne oligosakkarider i glykopeptider. Sialinsyren er bundet til en Gal med dannelse av en α -binding mellom de to sakkaridene. Binding (forbindelse) mellom sakkaridene er mellom 2-stillingen av NeuAc og 3-stillingen av Gal. Dette bestemte enzymet kan isoleres fra rottelever (Weinstein et al, J. Biol Chem. 257: 13845 (1982)); human cDNA (Sasaki et al (1993) J. Biol Chem. 268: 22782-22787; Kitagawa & Paulson (1994) J. Biol Chem. 269: 1394-1401) og genomiske (Kitagawa et al (1996) J. Biol. Chem. 271: 931-938) DNA-sekvenser er kjent, hvilket letter produksjon av dette enzymet ved rekombinant ekspresjon. I én utførelsesform anvender sialyleringsmetoden en rotte ST3Gal III.

Andre eksempler på sialyltransferaser anvendelige i foreliggende beskrivelse omfatter slike som er isolert fra *Campylobacter jejuni*, inkludert CST-I og CST-II og slike som danner α (2,3)-bindinger. Se f.eks. WO99/49051.

Sialyltransferaser andre enn de som er listet opp i Tabell 2, er også anvendelige i en økonomisk og effektiv storskala prosess for sialylering av kommersielt viktige glykopeptider. Som en enkel test for å finne anvendeligheten av disse andre enzymene, blir forskjellige mengder av hvert enzym (1-100 mU/mg protein) omsatt med asialo- α_1 AGP (ved 1-10 mg/ml) for å sammenligne evnen av sialyltransferasen av interesse til å sialylere glykopeptider relativt til enten bovin ST6Gal I, ST3Gal III eller begge sialyltransferasene. Alternativt kan andre glykopeptider eller glykopeptider, eller N-

bundne oligosakkarider enzymatisk frigjort fra peptidryggraden anvendes i stedet for asialo- α_1 AGP i denne evalueringen. Sialyltransferaser med evne til å sialylere N-bundne oligosakkarider av glykopeptider mer effektivt enn ST6Gal I er anvendelige i en praktisk storskala prosess for sialylering av peptid.

GalNAc transferaser

N-acetylgalaktosaminyltransferaser er anvendelige for utøvelse av foreliggende beskrivelse, spesielt for binding av en GalNAc-gruppe til en aminosyre fra det O-bundne glykosyleringssetet av peptidet. Egnede N-acetylgalaktosaminyltransferaser omfatter, men er ikke begrenset til, $\alpha(1,3)$ N-acetylgalaktosaminyltransferase, $\beta(1,4)$ N-acetylgalaktosaminyltransferaser (Nagata et al, J. Biol. Chem. 267: 12082-12089 (1992) og Smith et al, J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) og polypeptid N-acetylgalaktosaminyltransferase (Homa et al, J. Biol. Chem. 268: 12609 (1993)).

Produksjon av proteiner slik som enzymet GalNAc T_{I-XX} fra klonede gener ved genetisk konstruksjon er velkjent. Se, for eksempel, US Pat. Nr. 4,761,371. En metode omfatter oppsamling av tilstrekkelige prøver, deretter blir aminosyresekvensen av enzymet bestemt ved N-terminal sekvensering. Denne informasjonen blir deretter anvendt for å isolere en cDNA-klon som koder for en fullengde (membranbundet) transferase som ved ekspresjon i insektcellelinjen Sf9 resulterte i syntese av et fullstendig aktivt enzym. Akseptor-spesifisiteten av enzymet blir deretter bestemt ved bruk av en semikvantitativ analyse av aminosyrene som omgir kjente glykosyleringssteder i 16 forskjellige proteiner fulgt av *in vitro* glykosyleringsstudier av syntetiske peptider. Dette arbeidet har vist at visse aminosyrerester er overrepresentert i glykosylerte peptidsegmenter og at rester i spesifikke posisjoner som omgir glykosylerte serin og treoninrester kan ha en mer tydelig innvirkning på akseptor-effektivitet enn andre aminosyregrupper.

Cellebundne glykosyltransferaser

I en annen utførelsesform er enzymene anvendt i fremgangsmåten ifølge foreliggende beskrivelse cellebundne glykosyltransferaser. Selv om mange løselige glykosyltransferaser er kjent (se for eksempel US Pat. Nr. 5,032,519), er glykosyltransferaser generelt i membranbundet form når de er assosiert med celler. Mange av de membranbundne enzymene studert hittil er ansett for å være intrinsiske proteiner; det vil si at de ikke frigjøres fra membranene ved sonikering og krever detergenter for solubilisering. Overflate glykosyltransferaser har blitt identifisert på overflatene hos celler fra virveldyr og virvelløse dyr, og det har også blitt funnet at disse overflatetransferasene bibeholder katalytisk aktivitet under fysiologiske betingelser. Den mer kjente funksjonen for celleoverflate-glykosyltransferaser er imidlertid for

intercellulær gjenkjennelse (Roth, MOLECULAR APPROACHES to SUPRACELLULAR PHENOMENA, 1990).

Det har blitt utviklet metoder for å endre glykosyltransferasene uttrykt av celler. For eksempel rapporterer Larsen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8227-8231 (1989), en genetisk metode for å isolere klonede cDNA-sekvenser som bestemmer ekspresjon av celleoverflate oligosakkaridstrukturer og deres kognate glykosyltransferaser. Et cDNA-bibliotek dannet fra mRNA isolert fra en murin cellelinje kjent å uttrykke UDP-galaktose: β -D-galaktosyl-1,4-N-acetyl-D-glukosaminid- α -1,3-galaktosyltransferase ble transfektert inn i COS-1-celler. De transfekterte cellene ble deretter dyrket og analysert for α -1,3-galaktosyltransferaseaktivitet.

Francisco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2713-2717 (1992), beskriver en metode for å forankre β -laktamase til den ytre overflaten av *Escherichia coli*. En tresidig fusjon bestående av (i) en signalsekvens av et yttermembranprotein, (ii) en membran-spennede del av et yttermembranprotein, og (iii) en komplett moden β -laktamase-sekvens blir fremstilt og resulterer i et aktivt overflatebundet β -laktamasemolekyl. Imidlertid er Francisco's metode begrenset til kun prokaryot celle-systemer og krever som erkjent av forfatterne, den komplette tresidige fusjonen for riktig funksjon.

Sulfotransferaser

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av peptider som omfatter sulfaterte molekyler, inkludert, for eksempel sulfaterte polysakkarider slik som heparin, heparansulfat, karragenen, og beslektede forbindelser. Egnede sulfotransferaser omfatter, for eksempel, chondroitin-6-sulfotransferase (kylling cDNA beskrevet av Fukuta et al., J. Biol. Chem. 270: 18575-18580 (1995); GenBank Aksesjonnr. D49915), glykosaminoglykan N-acetylglukosamin N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 (Dixon et al, Genomics 26: 239-241 (1995); UL18918), og glykosaminoglykan N-acetylglukosamin N-deacetylase/N-sulfotransferase 2 (murin cDNA beskrevet i Orellana et al, J. Biol. Chem. 269: 2270-2276 (1994) og Eriksson et al, J. Biol. Chem. 269: 10438-10443 (1994); human cDNA beskrevet i GenBank Aksesjonnr. U2304).

Glykosidaser

Foreliggende beskrivelse omfatter også anvendelse av villtype og muterte glykosidaser. Mutant β -galaktosidase-enzymmer har blitt vist å katalysere dannelsen av disakkarider gjennom kobling av et α -glykosyl-fluorid til et galaktosyl akseptormolekyl. (Withers, US Pat. Nr. 6,284,494; bevilget 4. sept., 2001). Andre glykosidaser anvendelige i foreliggende oppfinnelse omfatter, for eksempel, β -glukosidaser, β -

galaktosidaser, β -mannosidaser, β -acetyl-glukosaminidaser, β -N-acetyl-galaktosaminidaser, β -xylosidaser, β -fukosidaser, cellulaser, xylanaser, galaktanaser, mannanaser, hemicellulaser, amylaser, glukoamylaser, α -glukosidaser, α -galaktosidaser, α -mannosidaser, α -N-acetyl-glukosaminidaser, α -N-acetyl-galaktose-aminidaser, α -xylosidaser, α -fukosidaser, og neuraminidaser/sialidaser.

Immobiliserte enzymer

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer også anvendelse av enzymer som er immobilisert på en fast og/eller løselig bærer. I et eksempel på en utførelsesform tilveiebringes en glykosyltransferase som er konjugert til en PEG via en intakt glykosyl-linker i henhold til fremgangsmåtene ifølge beskrivelsen. PEG-linker-enzym-konjugatet er eventuelt bundet til fast bærer. Anvendelse av enzymer med fast bærer i fremgangsmåtene ifølge beskrivelsen forenkler bearbeidingen av reaksjonsblandingen og rensing av reaksjonsproduktet, og muliggjør også lett gjenvinning av enzymet. Glykosyltransferase-konjugatet anvendes i fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse. Andre kombinasjoner av enzymer og bærere vil være innlysende for fagfolk på området.

Fusjonsproteiner

I andre eksempler på utførelsesformer anvender fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse fusjonsproteiner som har mer enn én enzymatisk aktivitet som er involvert i syntese av et ønsket glykopeptidkonjugat. Fusjonspolypeptidene kan være sammensatt av, for eksempel, et katalytisk aktivt domene fra en glykosyltransferase som er forbundet til et katalystisk aktivt domene av et hjelpe-enzym. Det katalytiske domenet fra hjelpe-enzymet kan, for eksempel, katalysere et trinn i dannelsen av et nukleotid-sukker som er en donor for glykosyltransferasen, eller katalysere en reaksjon involvert i en glykosyltransferasesyklus. For eksempel kan et polynukleotid som koder for en glykosyltransferase forbindes i leseramme med et polynukleotid som koder for et enzym involvert i syntese av nukleotid-sukker. Det resulterende fusjonsproteinet kan deretter katalysere ikke bare syntesen av nukleotid-sukkeret, men også overføringen av sukkergruppen til akseptormolekylet. Fusjonsproteinet kan være to eller flere syklus enzymer bundet til én uttrykkelig nukleotidsekvens. I andre utførelsesformer omfatter fusjonsproteinet de katalytisk aktive domenene fra to eller flere glykosyltransferaser. Se, for eksempel, 5,641,668. De modifiserte glykopeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse kan enkelt utformes og fremstilles ved anvendelse av passende fusjonsproteiner (se, for

eksempel, PCT Patentsøknad PCT/CA98/01180, som ble publisert som WO 99/31224 den 24. juni, 1999.)

Fremstilling av modifiserte sukkere

Fremgangsmåter ifølge foreliggende beskrivelse anvender generelt modifiserte sukkere. I ett aspekt er sukkergruppen eller sukkergruppe-linker-kassetten og PEG eller PEG-linker-kassetten bundet sammen gjennom anvendelse av reaktive grupper, hvilke typisk blir omdannet ved bindingsprosessen til en ny organisk funksjonell gruppe eller ikke-reaktive spesier. De(n) reaktive funksjonelle gruppen(e) av sukkeret er lokalisert ved hvilken som helst stilling på sukkergruppen. Reaktive grupper og klasser av reaksjoner anvendelige ved utøvelse av foreliggende beskrivelse er generelt slike som er velkjent på området biokonjugat kjemi. For øyeblikket er foretrukne klasser av reaksjoner tilgjengelige med reaktive sukkergrupper, slike som foregår under relativt milde betingelser. Disse omfatter, men er ikke begrenset til nukleofile substitusjoner (f.eks. reaksjoner av aminer og alkoholer med acylhalider, aktive estere), elektrofile substitusjoner (f.eks. enaminreaksjoner) og addisjoner til karbon-karbon og karbon-heteroatom multiple bindinger (f.eks. Michael reaksjon, Diels-Alder addisjon). Disse og andre anvendelige reaksjoner er diskutert i, for eksempel, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; og Feeney et al, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D. C, 1982.

Anvendelige reaktive funksjonelle grupper som rager ut fra en sukkerkjerne eller modifiserende gruppe omfatter, men er ikke begrenset til:

- (a) karboksylgrupper og forskjellige derivater derav omfattende, men ikke begrenset til, N-hydroksysuccinimid-estere, N-hydroksybenztriazol-estere, syrehalider, acylimidazoler, tioestere, p-nitrofenyl-estere, alkyl, alkenyl, alkynyl og aromatiske estere;
- (b) hydroksylgrupper, som kan omdannes til, f.eks. estere, etere, aldehyder, osv.
- (c) haloalkylgrupper, hvori halidet senere kan erstattes med en nukleofil gruppe slik som, for eksempel, et amin, et karboksylat anion, tiol anion, karbanion, eller et alkoksidion, hvilket derved resulterer i en kovalent binding av en ny gruppe ved den funksjonelle gruppen av halogenatomet;
- (d) dienofile grupper, som er i stand til å delta i Diels-Alder reaksjoner slik som, for eksempel, maleimidogrupper;
- (e) aldehyd eller keton-grupper, slik at senere derivatisering er mulig via dannelse av karbonylderivater slik som, for eksempel, iminer, hydrazoner, semikarbazoner

eller oksimer eller via slike mekanismer som Grignard addisjon eller alkylitium addisjon;

(f) sulfonylhalid-grupper for senere reaksjon med aminer, for eksempel for å danne sulfonamider;

(g) tiolgrupper, som kan, for eksempel, omdannes til disulfider eller omsettes med acylhalider;

(h) amin eller sulfhydrylgrupper, som kan være, for eksempel, acylert, alkylert eller oksidert;

(i) alkener, som kan gjennomgå, for eksempel, sykloaddisjoner, acylering, Michael addisjon, osv; og

(j) epoksider, som kan reagere med, for eksempel, aminer og hydroksylforbindelser.

De reaktive funksjonelle gruppene kan velges slik at de ikke deltar i, eller interfererer med, reaksjonene nødvendig for å sette sammen den reaktive sukkerkjernen eller modifierende gruppen. Alternativt kan en reaktiv funksjonell gruppe beskyttes fra å delta i reaksjonen ved tilstedeværelse av en beskyttelsesgruppe. Fagfolk på området vil forstå hvordan en bestemt funksjonell gruppe skal beskyttes slik at den ikke interfererer med et valgt sett av reaksjonsbetingelser. For eksempler på anvendelige beskyttelsesgrupper, se, for eksempel, Greene et al, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991.

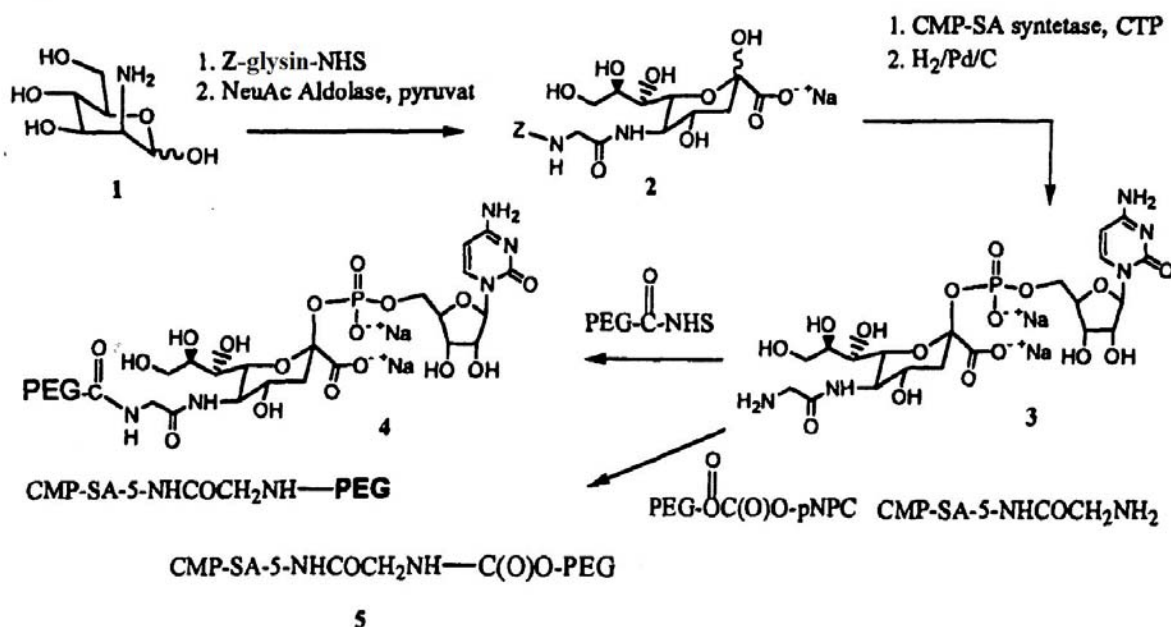
I diskusjonen som følger blir flere spesifikke eksempler på modifiserte sukkere som er anvendelige ved utøvelse av foreliggende beskrivelse vist. I eksemplene på utførelsesformer, blir et sialinsyrederivat anvendt som sukker-kjernen til hvilken den modifierende gruppen er forbundet.

I et eksempel på utførelsesform er G-CSF-peptidet som er modifisert ved en fremgangsmåte ifølge beskrivelsen et glykopeptid som er produsert i mammalske celler (f.eks. CHO-celler) eller i et transgent dyr og inneholder følgelig N- og/eller O-bundne oligosakkaridkjeder, som er ufullstendig sialylert. Oligosakkaridkjedene av glykopeptidet som mangler en sialinsyre og inneholder en terminal galaktoserest kan bli PEGgylert, PPGylert eller på annen måte modifisert med en modifisert sialinsyre.

I Skjema 4 blir aminoglykosid **1**, behandlet med den aktive esteren av et beskyttet aminosyre-(f.eks. glysin)derivat, hvilket derved omdanner sukker-aminresten til det tilsvarende beskyttede aminosyre amid-adduktet. Adduktet blir behandlet med en aldolase for å danne α -hydroksykarboksylat **2**. Forbindelse **2** omdannes til det tilsvarende CMP-derivatet ved virkningen av CMP-SA syntetase, fulgt av katalytisk hydrogenering av CMP-derivatet for å fremstille forbindelse **3**. Aminet innført via dannelsen av glysin-

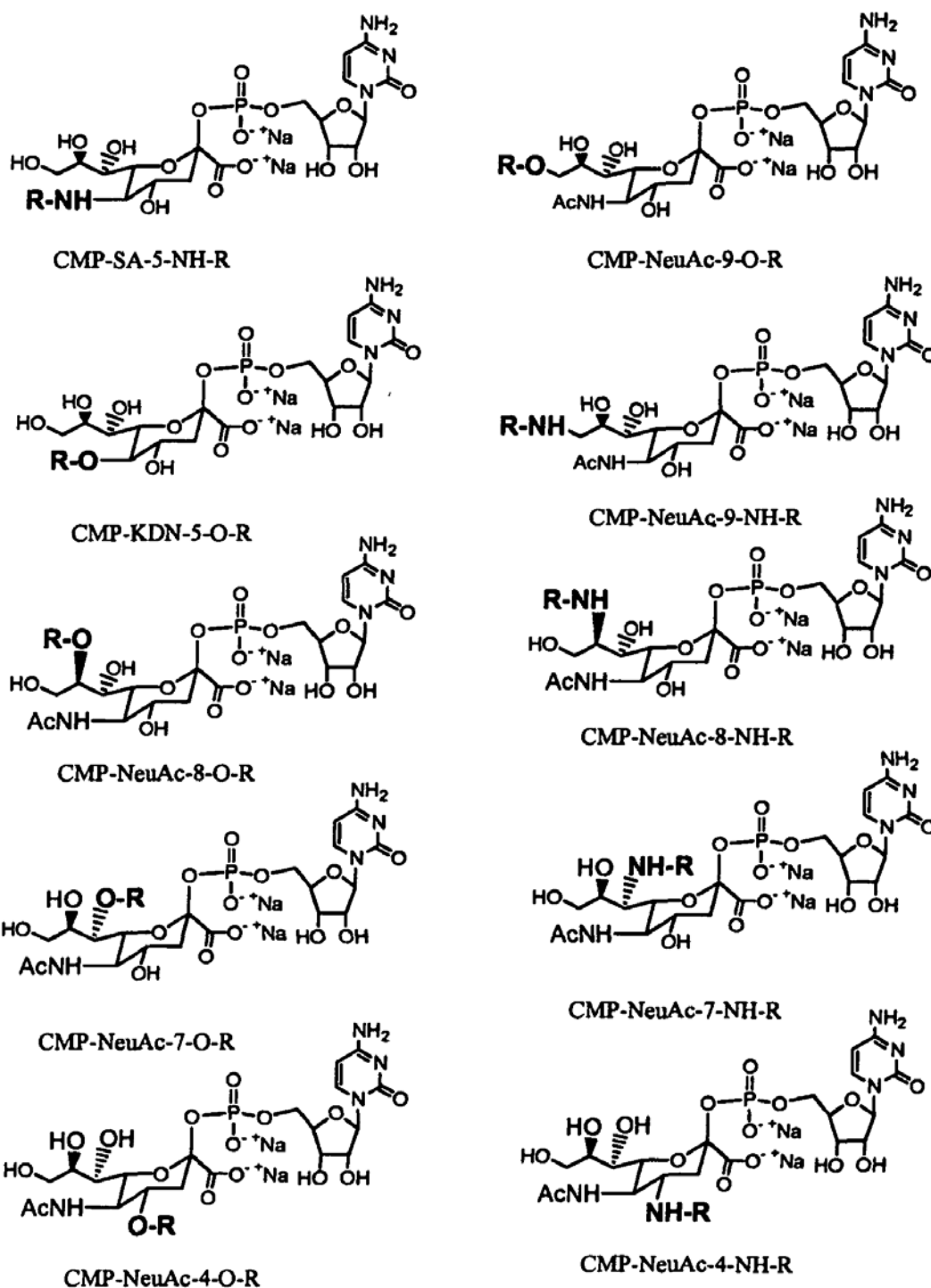
adduktet blir anvendt som et lokus for PEG-binding ved å omsette forbindelse **3** med et aktivert PEG eller PPG-derivat (f.eks. PEG-C(O)NHS, PEG-OC(O)O-p-nitrofenyl), for å fremstille spesier slik som **4** eller **5**, henholdsvis.

Skjema 4

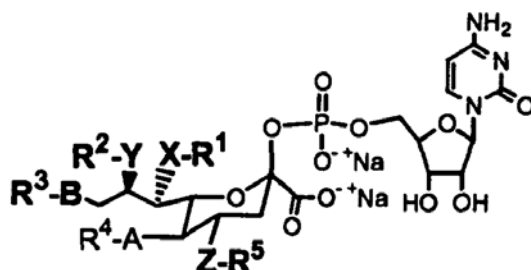


Tabell 3 viser representative eksempler på sukkermonofosfater som er derivatisert med en en PEG-gruppe. Visse av forbindelsene fra Tabell 3 fremstilles ved fremgangsmåten ifølge Skjema 4. Andre derivater fremstilles ved fremgangsmåter kjent på området. Se, for eksempel, Keppler et al., *Glycobiology* 11: 11R (2001); og Charter et al., *Glycobiology* 10: 1049 (2000)). Andre amin-reaktive PEG og PPG-analoger er kommersielt tilgjengelige, eller de kan fremstilles ved fremgangsmåter lett tilgjengelige for fagfolk på området.

Tabell 3



De modifiserte sukkerfosfatene for anvendelse ved utøvelse av foreliggende beskrivelse kan substitueres i andre stillinger så vel som de vist ovenfor. For tiden foretrukne substitusjoner av sialinsyre er vist i formelen nedenfor:



hvor X er en bindingsgruppe, som er foretrukket valgt fra -O-, -N(H)-, -S, CH₂-, og -N(R)₂, hvor hver R er et medlem uavhengig valgt fra R¹-R⁵. Symbolene Y, Z, A og B er hver en gruppe som er valgt fra gruppen vist ovenfor for identiteten av X. X, Y, Z, A og B er hver uavhengig valgt og derfor kan de være like eller forskjellige. Symbolene R¹, R², R³, R⁴ og R⁵ er H, en PEG-gruppe, terapeutisk gruppe, biomolekyl eller annen gruppe. Alternativt er disse symbolene en linker som er bundet til en PEG-gruppe, terapeutisk gruppe, biomolekyl eller annen gruppe.

Eksempler på grupper bundet til konjugatene beskrevet heri omfatter, men er ikke begrenset til, PEG-derivater (f.eks. acyl-PEG, acyl-alkyl-PEG, alkyl-acyl-PEG, karbamoyl-PEG, aryl-PEG), PPG-derivater (f.eks. acyl-PPG, acyl-alkyl-PPG, alkyl-acyl-PPG, karbamoyl-PPG, aryl-PPG), terapeutiske grupper, diagnostiske grupper, mannose-6-fosfat, heparin, heparan, SLe_x, mannose, mannose-6-fosfat, Sialyl Lewis X, FGF, VFGF, proteiner, chondroitin, keratan, dermatan, albumin, integriner, antennary oligosakkarider, peptider og lignende. Metoder for konjugering av de forskjellige modifierende gruppene til en sakkaridgruppe er lett tilgjengelig for fagfolk på området (POLY (ETHYLENE GLYCOL CHEMISTRY : BIOTECHNICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., Plenum Pub. Corp., 1992; POLY (ETHYLENE GLYCOL) CHEMICAL AND BIOLOGICAL APPLICATIONS, J. Milton Harris, Ed., ACS Symposium Series Nr. 680, American Chemical Society, 1997; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; og Dunn et al, Eds. POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D. C. 1991).

Linkergrupper (kryssbindende grupper)

Fremstilling av det modifiserte sukkeret for anvendelse i fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse omfatter binding av en PEG-gruppe til en sukkerrest og foretrukket, dannelse av et stabilt addukt, som er et substrat for en glykosyltransferase. Følgelig er det ofte foretrukket å anvende en linker, f.eks. en dannet ved reaksjon av PEG og sukkergruppen med et kryssbindende middel for å konjugere PEG og sukkeret. Eksempler på bifunksjonelle forbindelser som kan anvendes for binding av modifierende

grupper til karbohydratgrupper omfatter, men er ikke begrenset til, bifunksjonelle poly(etylenglykoler), polyamider, polyetere, polyestere og lignende. Generelle metoder for binding av karbohydrater til andre molekyler er kjent i litteraturen. Se, for eksempel, Lee et al, *Biochemistry* 28: 1856 (1989); Bhatia et al, *Anal. Biochem.* 178: 408 (1989); Janda et al, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 8886 (1990) og Bednarski et al., WO 92/18135. I diskusjonen som følger blir de reaktive gruppene behandlet som gunstige på sukkergruppen av det voksende modifiserte sukkeret. Fokus for diskusjonen er klarhet for illustrasjon. Fagfolk på området vil forstå at diskusjonen også er relevant for reaktive grupper på den modifierende gruppen.

Mange forskjellige reagenser blir anvendt for å modifisere komponentene av det modifiserte sukkeret med intramolekylære kjemiske kryssbindinger (for oversikt over kryssbindende reagenser og fremgangsmåter for kryssbinding se: Wold, F., *Meth. Enzymol.* 25: 623-651, 1972; Weetall, H. H., og Cooney, D. A., In: *ENZYMES AS DRUGS.* (Holcenberg, og Roberts, eds.) s. 395-442, Wiley, New York, 1981; Ji, T. H., *Meth. Enzymol.* 91: 580-609, 1983; Mattson et al., *Mol. Biol. Rep.* 17: 167- 183, 1993). Foretrukne kryssbindende reagenser er avledet fra forskjellige null-lengde ("zero-length"), homo-bifunksjonelle og hetero-bifunksjonelle kryssbindende reagenser. Null-lengde kryssbindende reagenser omfatter direkte konjugering av to intrinsiske kjemiske grupper uten innføring av ekstrinsisk materiale. Midler som katalyserer dannelsen av en disulfidbinding tilhører denne kategorien. Et annet eksempel er reagenser som induserer kondensering av et karboksyl og en primær aminogruppe for å danne en amidbinding slik som karbodiimider, etylklorformat, Woodward's reagens K (2-etyl-5-fenylisoksazolium-3'-sulfonat), og karbonyldiimidazol. I tillegg til disse kjemiske reagensene, kan enzymet transglutaminase (glutamyl-peptid γ -glutamyltransferase; EC 2.3.2.13) anvendes som null-lengde kryssbindende reagens. Dette enzymet katalyserer acyloverføringsreaksjoner ved karboksamidgrupper av proteinbundne glutaminyrester, vanligvis med en primær aminogruppe som substrat. Foretrukne homo- og hetero-bifunksjonelle reagenser inneholder to identiske eller to ulike seter, henholdsvis, som kan være reaktive for amino, sulfhydryl, guanidino, indol, eller uspesifikke grupper.

Refolding av uløselig G-CSF

Mange rekombinante proteiner uttrykt i bakterier blir uttrykt som uløselige aggregater i bakterielle inklusjonslegemer. Inklusjonslegemer er proteinavleiringer funnet i både det cytoplasmatiske og periplasmatiske rom i bakterier. (Se, f.eks. Clark, *Cur. Op. Biotech.* 12:202-207 (2001)). Rekombinante G-CSF-proteiner blir uttrykt i bakterielle inklusjonslegemer, og metoder for refolding av disse proteinene for å

produsere aktive G-CSF-proteiner er gitt heri.

Betingelser for refolding av aktiv G-CSF

For å fremstille aktive G-CSF-proteiner fra bakterielle celler, blir G-CSF-proteiner uttrykt i bakterielle inklusjonslegemer, bakteriene blir høstet, oppbrutt og inklusjonslegemene blir isolert og vasket. I én utførelsesform blir tre vaskinger utført: en første vask i en buffer med en pH mellom 6,0 og 9,0; et monovalent salt, f.eks. natriumklorid; en ikke-ionisk detergent, f.eks. Triton X-100; en ionisk detergent, f.eks. natrium-deoksyholat; og EDTA; en andre vask i en detergentfri buffer, og en tredje vask i H₂O. Proteinene i inklusjonslegemene blir deretter solubilisert. Solubilisering kan utføres ved bruk av denatureringsmidler, guanidiniumklorid eller urea; ytterligheter av pH; eller detergenter eller hvilken som helst kombinasjon av disse. I én utførelsesform blir 5-6M guanidin HCl eller urea anvendt for å solubilisere GCSF. I en annen utførelsesform tilsettes DTT.

Etter solubilisering fjernes denatureringsmidler fra GCSF proteinblandingen. Fjerning av denatureringsmidlet kan utføres ved mange forskjellige metoder, inkludert i en refoldingsbuffer- eller buffer-utvekslingsmetoder. Buffer-utvekslingsmetoder omfatter dialyse, diafiltrasjon, gelfiltrering, og immobilisering av proteinet til en fast bærer. (Se, f.eks. Clark, Cur. Op. Biotech. 12:202-207 (2001)). Hvilken som helst av metodene ovenfor kan kombineres for å fjerne denatureringsmidler.

Dannelse av disulfidbindinger i GCSF-proteiner fremmes ved tilsetning av refoldingsbuffer omfattende et redokspare. Redokspare omfatter redusert og oksidert glutation ((-JSF-I/GSSG), cystein/cystin, cysteamin/cystamin, DTT/GSSG og DTE/GSSG. (Se f.eks. Clark, Cur. Op. Biotech. 12:202-207 (2001)). I én utførelsesform er redoksparet GSH/GSSG i et forhold på 10:1.

Refolding kan utføres i buffere ved pH i området fra, for eksempel, 6,0 til 10,0. Refoldingsbuffere kan omfatte andre hjelpestoffer for å øke refolding, f.eks. L-arginin (0,4-1 M); PEG; lave konsentrasjoner av denatureringsmidler, slik som urea (1-2M) og guanidiniumklorid (0,5-1,5 M); og detergenter (f.eks. Chaps, SDS, CTAB, lauryl maltoside, Tween 80, og Triton X-100).

Etter refolding kan GCSF-proteinet dialyseres for å fjerne redoksparet eller andre uønskede bufferkomponenter. I én utførelsesform blir dialyse utført ved bruk av en buffer omfattende natriumacetat, glyserol, og en ikke-ionisk detergent, f.eks. Tween-80. Etter dialyse kan GCSF-proteinet renses ytterligere, og/eller konsentreres ved ionebytterkromatografi. I én utførelse anvendes en SP-sefarose kationbytterresin.

Fagfolk på området vil være klar over at et protein har blitt refoldet korrekt når det refoldede proteinet har detekterbar biologisk aktivitet. For et GCSF-protein kan biologisk aktivitet måles ved bruk av mange forskjellige metoder. For eksempel er biologisk aktive GCSF-proteiner substrater for O-bundet glykosylering. GCSF proteinaktivitet kan også måles ved bruk av celleproliferasjonsanalyser eller analyser av hvite blodlegemer (WBC) i rotter. Proliferasjonsanalyser og WBC-analyser kan utføres før eller etter O-bundet glykosylering av de refoldede GCSF-proteinene.

Metoder for isolering av konjugater ifølge oppfinnelsen

Alternativt kan produktene fremstilt ved fremgangsmåtene ovenfor anvendes uten rensing. Imidlertid er det vanligvis foretrukket å gjenvinne produktet. Standard velkjente teknikker for gjenvinning av glykosylerte sakkarider slik som tynn- eller tykk-sjikt-kromatografi, kolonnekromatografi, ionebytterkromatografi eller membranfiltrering kan anvendes. Det er foretrukket å anvende membranfiltrering, mer foretrukket å anvende en revers osmose-membran, eller én eller flere kolonnekromatografiske teknikker for gjenvinningen som er diskutert i det følgende og i litteraturen angitt heri. For eksempel kan membranfiltrering hvori membranene har molekylvekt-cutoff på omtrent 3000 til omtrent 10,000 anvendes for å fjerne proteiner slik som glykosyltransferaser. Nanofiltrering eller revers osmose kan deretter anvendes for å fjerne salter og/eller rense de fremstilte sakkaridene (se f.eks. WO 98/15581). Nanofiltermembraner er en klasse av revers osmose-membraner som slipper gjennom monovalente salter men holder tilbake polyvalente salter og uladet løst stoff større enn omtrent 100 til omtrent 2,000 Dalton, avhengig av membranen anvendt. I en typisk anvendelse vil følgelig sakkarider fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse holdes tilbake i membranen og kontaminerende salter vil passere gjennom.

Dersom det modifiserte glykoproteinet produseres intracellulært blir, som et første trinn, partikulær debris, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, fjernet for eksempel ved sentrifugering eller ultrafiltrering; eventuelt kan proteinet konsentreres med et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter, fulgt av separering av polypeptidvarianten fra andre urenheter ved ett eller flere trinn valgt fra immunoaffinitetskromatografi, ionebytterkolonne-fraksjonering (f.eks. på diethylaminoetyl (DEAE) eller matrikser inneholdende karboksymetyl eller sulfopropyl-grupper), kromatografi på Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, linse lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl, Fenyl Toyopearl, eller protein A Sepharose, SDS-PAGE kromatografi, silika kromatografi, kromatofokusering, reversfase HPLC (f.eks. silikagel med tilføyde alifatiske grupper), gelfiltrering ved bruk av, f.eks. Sephadex molekylsil eller størrelseseksklusjons-

kromatografi, kromatografi på kolonner som selektivt binder polypeptidet, og etanol eller ammoniumsulfat-presipitering.

Modifiserte glykopeptider fremstilt i kultur blir vanligvis isolert ved initiell ekstraksjon fra celler, enzymer, osv., fulgt av ett eller flere konsentrasjons-, utsalting-, vandig ionebytter-, eller størrelseseksklusjonskromatografitrinn. I tillegg kan det modifiserte glykoproteinet renses ved affinitetskromatografi. Til slutt kan HPLC anvendes for endelige rensetrinn.

En proteasehemmer, f.eks. metylsulfonylfluorid (PMSF) kan inkluderes i hvilket som helst av de foregående trinnene for å inhibere proteolyse og antibiotika kan inkluderes for å hindre vekst av fremmede kontaminanter.

I en annen utførelsesform blir supernatanter fra systemer som fremstiller det modifiserte glykopeptidet ifølge oppfinnelsen først konsentrert ved bruk av et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter, for eksempel, en Amicon eller Millipore Pellicon ultrafiltreringsenhet. Etter konsentrasjonstrinnet kan konsentratet påføres på en egnet rensematriks. For eksempel kan en egnet affinitetsmatriks omfatte en ligand for peptidet, et lektin eller antistoffmolekyl bundet til en egnet bærer. Alternativt kan en anionbytterresin anvendes, for eksempel, en matriks eller substrat som har pendante DEAE grupper. Egnede matrikser omfatter akrylamid, agarose, dekstran, cellulose, eller andre typer vanlig anvendt i proteinrensing. Alternativt kan et kationbytter-trinn anvendes. Egnede kationbyttere omfatter forskjellige uløselige matrikser omfattende sulfopropyl eller karboksymetylgrupper. Sulfopropylgrupper er spesielt foretrukket.

Til slutt kan ett eller flere RP-HPLC-trinn som anvender hydrofobe RP-HPLC-media, f.eks. silikagel med pendant metyl eller andre alifatiske grupper, anvendes for å ytterligere rense et polypeptidvariant-preparat. Noen av eller alle de foregående rensetrinnene kan, i ulike kombinasjoner, også anvendes for tilveiebringe et homogent modifisert glykoprotein.

Det modifiserte glykopeptidet ifølge oppfinnelsen som er et resultat av storskala fermentering kan renses ved metoder analoge med de beskrevet av Urdal et al, J. Chromatog. 296: 171 (1984). Denne referansen beskriver to sekvensielle RP-HPLC-trinn forrensing av rekombinant human IL-2 på en preparativ HPLC-kolonne. Alternativt kan teknikker slik som affinitetskromatografi anvendes for å rense det modifiserte glykoproteinet.

Farmasøytiske preparater

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et farmasøytisk preparat. Det farmasøytiske preparatet omfatter et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel og et

kovalent konjugat mellom en ikke-naturlig forekommende, PEG-gruppe, terapeutisk gruppe eller biomolekyl og et glykosylert eller ikke-glykosylert peptid. Polymeren, den terapeutiske gruppen eller biomolekylet er konjugert til G-CSF-peptidet via en intakt glykosylbindingsgruppe anbrakt mellom og kovalent bundet til både G-CSF-peptidet og polymeren, den terapeutiske gruppen eller biomolekylet.

Farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen er egnet for anvendelse i mange forskjellige medikamentlevering-systemer. Egnede formuleringer for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse finnes i Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). For en kort gjennomgang av metoder for medikamentlevering, se Langer, Science 249:1527- 1533 (1990).

De farmasøytiske preparatene kan formuleres for hvilken som helst passende administreringsmetode, inkludert for eksempel, topikal, oral, nasal, intravenøs, intrakraniell, intraperitoneal, subkutan eller intramuskulær administrering. For parenteral administrering, slik som subkutan injeksjon, omfatter bæreren foretrukket vann, saltoppløsning, alkohol, et fett, en voks eller en buffer. For oral administrering kan hvilken som helst av de ovennevnte bærerne eller en fast bærer, slik som mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natrium-sakkarin, talkum, cellulose, glukose, sukrose og magnesiumkarbonat, anvendes. Biodegraderbare mikrokuler (f.eks. polylaktat polyglykolat) kan også anvendes som bærere for de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse. Egnede biodegraderbare mikrokuler er beskrevet, for eksempel, i US Patenter Nr. 4,897,268 og 5,075,109.

Vanligvis blir de farmasøytiske preparatene administrert parenteralt, f.eks. intravenøst. Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen preparater for parenteral administrering som omfatter forbindelsen oppløst eller suspendert i en akseptabel bærer, foretrukket en vandig bærer, f.eks. vann, bufret vann, saltoppløsning, PBS og lignende. Preparatene kan inneholde farmasøytisk akseptable hjelpestoffer etter behov for å komme nært opptil fysiologiske betingelser, slik som pH-regulerende midler og bufringsmidler, tonisitetstjusterende midler, fuktemidler, detergenter og lignende.

Disse preparatene kan steriliseres ved konvensjonelle steriliseringsteknikker, eller kan sterilfiltreres. De resulterende vandige oppløsningene kan pakkes for anvendelse som sådan, eller lyofiliseres, hvor det lyofiliserte preparatet kombineres med en steril vandig bærer før administrering. pH av preparatene vil typisk være mellom 3 og 11, mer foretrukket fra 5 til 9 og mest foretrukket fra 7 og 8.

I noen utførelsesformer kan glykopeptidene ifølge oppfinnelsen inkorporeres i liposomer dannet fra standard vesikkeldannende lipider. Mange forskjellige metoder er tilgjengelig for fremstilling av liposomer, som beskrevet i, f.eks. Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), US Pat. nr. 4,235,871, 4,501,728 og 4,837,028. Målretting av liposomer ved anvendelse av mange forskjellige målrettede midler (f.eks.

sialyl-galaktosidene ifølge foreliggende beskrivelse) er velkjent på området (se f.eks. US Patenter nr. 4,957,773 og 4,603,044).

Standardmetoder for binding av målrettede midler til liposomer kan anvendes. Disse metodene omfatter generelt inkorporering inn i liposomer av lipidkomponenter, slik som fosfatidyletanolamin, som kan aktiveres for binding av målrettede midler, eller derivatiserte lipofile forbindelser, slik som lipid-derivatiserte glykopeptider ifølge foreliggende beskrivelse.

Mekanismer for målretting krever generelt at de målrettede midlene er plassert på overflaten av liposomet på en slik måte at målgruppen er tilgjengelig for interaksjon med målet, for eksempel, en celleoverflatereseptor. Karbohydratene ifølge foreliggende beskrivelse kan bindes til et lipidmolekyl før liposomet dannes ved bruk av metoder kjent for fagfolk på området (f.eks. alkylering eller acylering av en hydroksylgruppe til stede på karbohydratet med et langkjedet alkylhalid eller med en fettsyre, henholdsvis). Alternativt kan liposomet formes på en slik måte at en konnektordel først blir inkorporert i membranen ved tidspunktet for dannelse av membranen. Konnektordelen må ha en lipofil andel, som blir solid innstøpt og forankret i membranen. Den må også ha en reaktiv andel, som er kjemisk tilgjengelig på den vandige overflaten av liposomet. Den reaktive andelen blir valgt slik at den vil være kjemisk egnet til å danne en stabil binding med det målrettede midlet eller karbohydratet, som tilsettes senere. I noen tilfeller er det mulig å binde det målrette midlet direkte til konnektormolekylet, men i de fleste tilfeller er det mer passende å anvende et tredje molekyl som kan tjene som en kjemisk bro, hvilket følgelig forbinder konnektormolekylet som er i membranen med det målrettede midlet eller karbohydratet som er forlenget, tredimensjonalt, bort fra vesikkeloverflaten.

Forbindelsene fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende beskrivelse kan også anvendes som diagnostiske reagenser. For eksempel kan merkede forbindelser anvendes for å lokalisere områder med inflammasjon eller tumormetastase hos en pasient mistenkt for å ha en inflammasjon. For denne anvendelsen kan forbindelsene være merket med ^{125}I , ^{14}C eller tritium.

Den aktive bestanddelen anvendt i de farmasøytiske preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse er glykopegylert G-CSF. Foretrukket blir G-CSF-preparatet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert parenteralt (f.eks. IV, IM, SC eller IP). Effektive doser er forventet å variere betydelig avhengig av tilstanden som behandles og administreringsveien men er forventet å være i området på omtrent 0,1 ($\sim 7\text{U}$) til 100 (-7000U) $\mu\text{g/kg}$ kroppsvekt av det aktive materialet. Foretrukne doser for behandling av anemiske tilstander er omtrent 50 til omtrent 300 enheter/kg tre ganger pr. uke. Fordi foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en G-CSF med en økt *in vivo* residensid, blir de

angitte dosene eventuelt redusert når et preparat ifølge oppfinnelsen blir administrert.

Doseringsformer

Peptidkonjugatene anvendt for behandling av lidelser relatert til hematopoese eller myelosuppresjon kan tilveiebringes i en oral doseringsform. Disse orale doseringsformene omfatter følgende komponenter: (a) et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en vannløselig polymer, hvori den vannløselige polymeren er kovalent bundet til G-CSF-peptidet ved en glykosyl eller aminosyrerest av G-CSF-peptidet via en intakt glykosyl bindingsgruppe; (b) én eller flere surfaktanter; (c) én eller flere fettsyrer; og (d) enterisk materiale. Peptidet, surfaktanter og fettsyrer kan blandes i flytende fase og lyofiliseres før kombinasjon med enterisk materiale.

De følgende eksemplene er gitt for å illustrere preparatene og fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, men ikke for å begrense oppfinnelsen.

EKSEMPLER

Eksempel 1 : Farmakodynamiske data for nøytrofilitall i respons til G-CSF konjugat-peptid ifølge oppfinnelsen

Farmakodynamiske studier av nøytrofilitall i respons til G-CSF-konjugater ifølge oppfinnelsen og det kommersielt tilgjengelige G-CSF Neulasta viste at preparatene ifølge oppfinnelsen oppviste et lignende tidsforløp for virkning som Neulasta (FIG. 1) ved samme konsentrasjon. Det var en doseavhengighet i nøytrofilitallet, med økende konsentrasjoner av G-CSF-konjugatene ifølge oppfinnelsen (Glyko-PEG G-CSF) som resulterte i et økt antall nøytrofiler ved toppen av tidsforløpet for aktivitet. Glyko-PEG G-CSF ga en omtrentlig 30 % høyere respons enn Neulasta, hvilket indikerer 60 % høyere biotilgjengelighet for Glyko-PEG G-CSF enn Neulasta ved sammenlignbare doser.

Denne studien inkluderte 53 individer. Det var 20 individer i hver dosegruppe, med 15 individer randomisert til Glyko-PEG G-CSF og fem til Neulasta. Glyko-PEG G-CSF var generelt veltolerert med en bivirkningsprofil lik den for Neulasta. Det var ingen avbrudd for bivirkninger. Det var heller ingen alvorlige bivirkninger. I tillegg ble ingen antistoffer mot Glyko-PEG G-CSF detektert.

Tabell 4 lister opp noen representative datapunkter for tre forskjellige konsentrasjoner av Glyko-PEG G-CSF over en tidsperiode fra 24 til 168 timer etter administrering av Glyko-PEG G-CSF.

Tabell 4

Timer	Glyko-PEG G-CSF (100µg)	Glyko-PEG G-CSF (50µg)	Glyko-PEG G-CSF (25µg)
24	26,0778	27,8917	25,825
72	35,222	31,5167	16,550
96	36,9222	23,7667	12,4625
144	24,2667	19,625	11,7625
168	22,9556	16,8167	12,3625

Eksempel 2: Farmakodynamiske data for CD34+ telling i respons til G-CSF konjugat-peptid ifølge oppfinnelsen

Farmakodynamiske studier av CD34+ telling i respons til G-CSF-konjugater ifølge oppfinnelsen (Glyko-PEG G-CSF) og det kommersielt tilgjengelige G-CSF Neulasta viste at preparatene ifølge oppfinnelsen hadde et lignende tidsforløp for virkning som Neulasta (FIG. 2) ved samme konsentrasjon. Glyko-PEG G-CSF oppviste en betydelig høyere CD34+ telling ved dens aktivitetstopp enn Neulasta ved samme konsentrasjon.

Det var en doseavhengighet i celletallet, hvor økende konsentrasjoner av Glyko-PEG G-CSF førte til et økt antall nøytrofiler ved toppen av tidsforløpet for aktivitet.

Tabell 5 lister opp noen representative datapunkter for tre ulike konsentrasjoner av Glyko-PEG G-CSF over en tidsperiode på fra 72 til 168 timer etter administrering av Glyko-PEG G-CSF.

Tabell 5

Timer	Glyko-PEG G-CSF (100µg)	Glyko-PEG G-CSF (50 µg)	Glyko-PEG G-CSF (25 µg)
72	68,444	33	14
96	101	44,4167	20,125
120	76,222	43,5	18,5
144	43,667	33,9167	13,875
168	33	17,8333	10,375

Eksempel 3 : Farmakodynamiske data for nøytrofiltall i respons til G-Csf konjugat-peptid ifølge oppfinnelsen:

Fast dose-studie

En fast dose, farmakodynamisk studie av nøytrofiltall i respons til G-CSF-konjugater ifølge oppfinnelsen (Glyko-PEG G-CSF) og det kommersielt tilgjengelige G-CSF Neulasta viste at preparatene ifølge oppfinnelsen oppviste et lignende tidsforløp for virkning som Neulasta (FIG. 4). Glyko-PEG G-CSF ga omtrent 30 % høyere respons enn Neulasta, hvilket indikerer en 60 % høyere biotilgjengelighet for Glyko-PEG G-CSF enn Neulasta ved denne dosen.

Studien innrullerte 36 friske subjekter. Glyko-PEG G-CSF var generelt veltolerert, med bivirkninger lik Neulasta. Det var ingen avbrudd for bivirkninger, og det var heller ingen alvorlige bivirkninger. Ingen antistoffer mot Glyko-PEG G-CSF ble detektert.

Eksempel 4: Farmakodynamiske data for CD34+ telling i respons til G-CSF konjugat-peptid ifølge oppfinnelsen:

Fast dose-studie

En fast dose, farmakodynamisk studie av CD34+ telling i respons til G-CSF konjugater ifølge oppfinnelsen (Glyko-PEG G-CSF) og det kommersielt tilgjengelige G-CSF Neulasta viste at preparatene ifølge oppfinnelsen oppviste et lignende tidsforløp for virkning som Neulasta (FIG. 5).

Eksempel 5: Mobilisering av allogene/ autologe CD34+ perifert blod progenitorceller

Donorer ved benmargtransplantasjon behandles med 10-20 µg/kg glykopegyllert G-CSF (Glyko-PEG G-CSF) i fem dager for å øke CD34+ celler fra hvilende nivåer (~2/µl) til omtrent 10/µl, som er en mengde tilstrekkelig til å gi $2-4 \times 10^6$ CD34+ celler/kg i en enkelt aferese. Donorer ved benmargtransplantasjon kan være allogene (samme som mottaker) eller autologe (forskjellig fra mottaker) donorer.

SEKVENSLISTE

<110> BioGenerix AG
 <120> Methods of treatment using glycopegylated G-CSF
 <130> B 9334/RN
 <150> US 60/909,917
 <151> 2007-04-03
 <150> US 60/911,788
 <151> 2007-04-13
 <150> US 60/986,240
 <151> 2007-11-07
 <150> WO2008124406
 <151> 2008-04-01
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(175)
 <223> wild-type human G-CSF with an N-terminal methionine

 <400> 1
 Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 50 55 60
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 65 70 75 80
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 85 90 95
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 100 105 110
 Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
 115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 175

<210> 2
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(174)
 <223> wild-type human G-CSF

<400> 2

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
 20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
 65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
 85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
 100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
 115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
 130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
 145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170

<210> 3
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> G-CSF variant

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30

Gln Glu Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro
 35 40 45

Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
 50 55 60

Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser
 65 70 75 80

Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu
 85 90 95

Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu
 100 105 110

Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu
 115 120 125

Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe
 130 135 140

Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His
 145 150 155 160

Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala
 165 170 175

Gln Pro

<210> 4
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> G-CSF variant

<400> 4

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
 35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
 50 55 60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
 65 70 75 80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
 85 90 95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
 100 105 110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu
 115 120 125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala
 130 135 140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
 165 170 175

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
 180 185 190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 195 200

<210> 5

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> G-CSF variant

<400> 5

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
50 55 60

Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
65 70 75 80

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
85 90 95

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
100 105 110

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
115 120 125

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
130 135 140

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
145 150 155 160

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
165 170 175

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
180 185 190

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195 200 205

<210> 6
<211> 176
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> G-CSF variant

<400> 6

Met Val Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala
20 25 30

Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
35 40 45

Leu Val Leu Leu Gly His Thr Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
50 55 60

Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
65 70 75 80

His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly
85 90 95

Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
100 105 110

Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
115 120 125

Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
130 135 140

Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
145 150 155 160

Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 7
<211> 175
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> G-CSF variant

<400> 7

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Val Leu Leu Gly His Thr Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 8

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> G-CSF variant

<400> 8

Met Val Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala
20 25 30

Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
35 40 45

Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
50 55 60

Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
65 70 75 80

His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly
85 90 95

Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
100 105 110

Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
115 120 125

Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
130 135 140

Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
145 150 155 160

Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 175

<210> 9
 <211> 176
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> G-CSF variant

<400> 9

Met Gln Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
 1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala
 20 25 30

Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
 35 40 45

Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser
 50 55 60

Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu
 65 70 75 80

His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly
 85 90 95

Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
 100 105 110

Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
 115 120 125

Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
 130 135 140

Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 165 170 175

<210> 10
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> G-CSF variant

<400> 10

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
 50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
 65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
 85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
 100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
 115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
 130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro Thr
 165 170 175

Gln Gly Ala Met Pro
 180

<210> 11

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> G-CSF variant

<400> 11

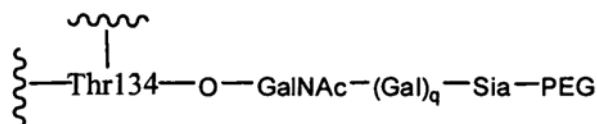
Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
 20 25 30

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

PATENTKRAV

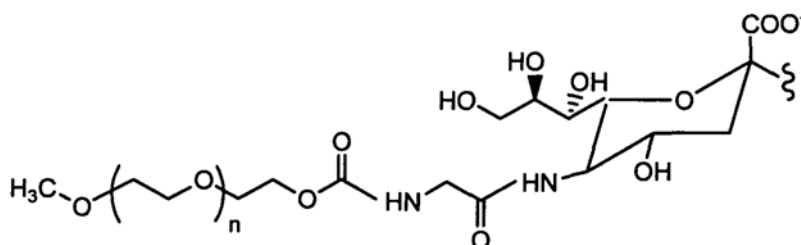
1. Peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

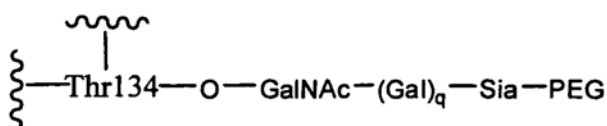
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved økning av stamcelleproduksjon i en donor.

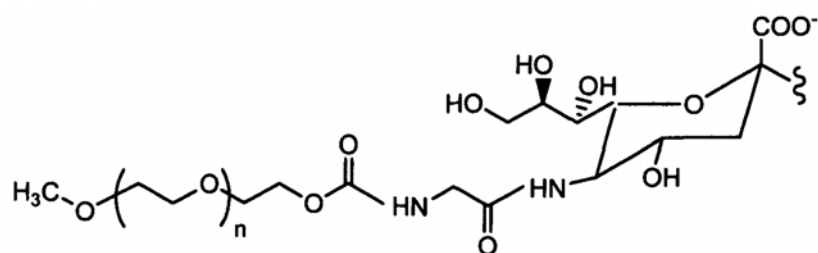
2. Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte G-CSF-peptid har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 1.
3. Peptid for anvendelse ifølge krav 2, hvori nevnte aminosyrerest er treonin ved posisjon 134 ifølge SEKV ID NR: 1.
4. Peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

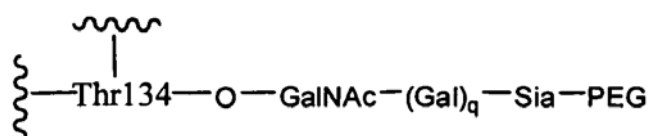
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvori n er et helt tall fra 400 til 500, hvori nevnte G-CSF-peptid har aminosyresekvensen ifølge SEKV ID NR: 1, for anvendelse ved økning av antallet granulocytter hos en pasient, hvori nevnte pasient er egnet for en benmargstransplantasjon.

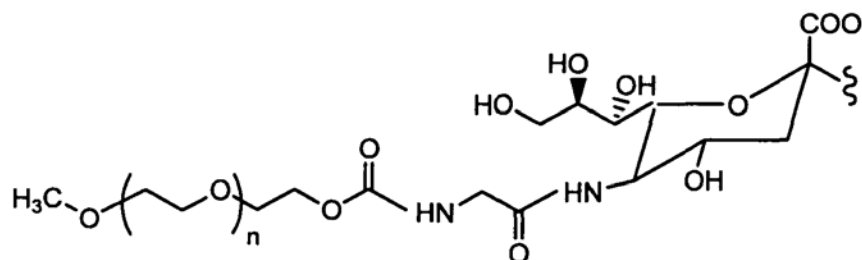
- 5.** Peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen:



hvor

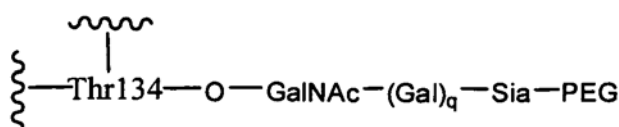
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved økning av stamcelleproduksjon hos en pasient.

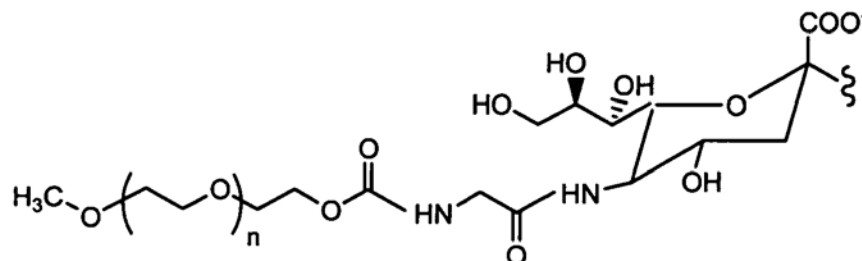
- 6.** Peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

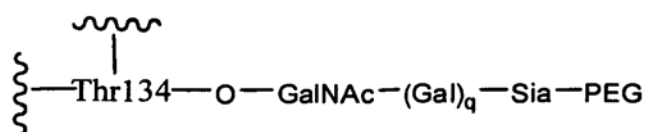
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved forebygging, behandling eller lindring av myelosuppresjon som følger av kreftbehandling hos en mottaker av nevnte kreftbehandling.

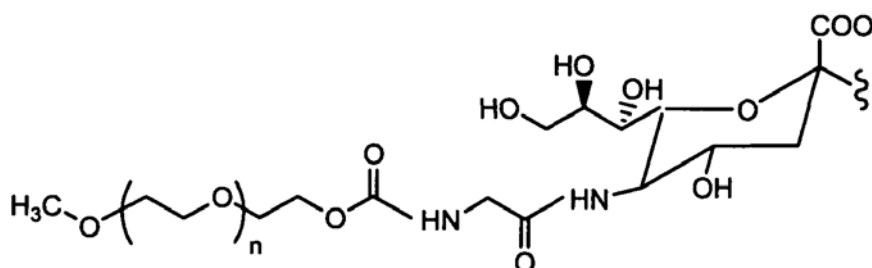
7. Farmasøytisk effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvor nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

q er 0 eller 1; og

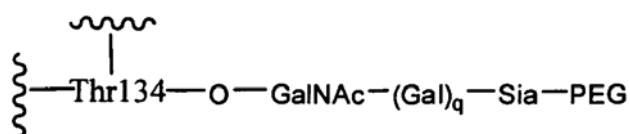
Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved behandling av nøytropeni eller trombocytopeni hos et pattedyr.

8. Fremgangsmåte for ekspansjon av hematopetiske stamceller i kultur, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med å administrere til nevnte stamceller en effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvor

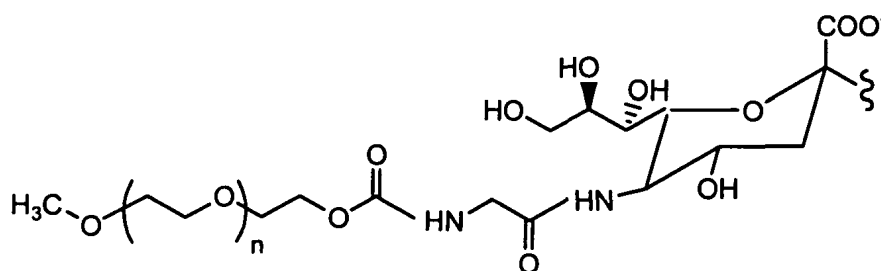
nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

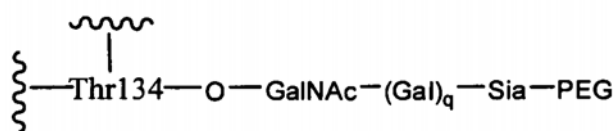
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500.

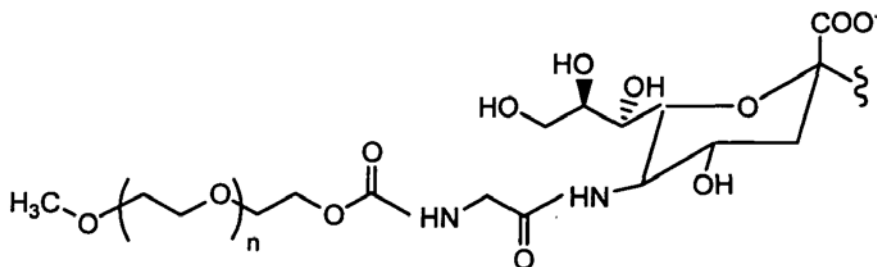
9. Effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifiserende gruppe, hvor
- nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

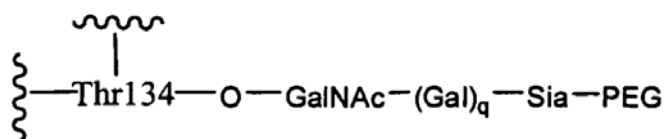
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved økning av hematopoese eller økning av antallet hematopoetiske progenitorceller i en pasient.

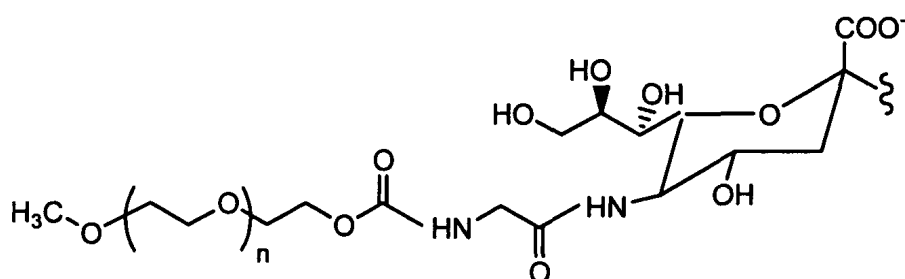
- 10.** Peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

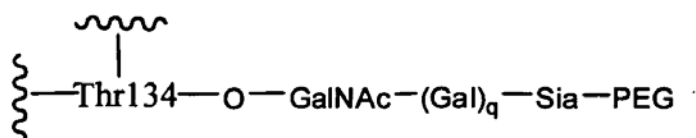
q er 0 eller 1; og

Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



hvor n er et helt tall fra 400-500, for anvendelse i en fremgangsmåte for å tilveiebringe stabil innpoding av benmarg, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter følgende trinn:

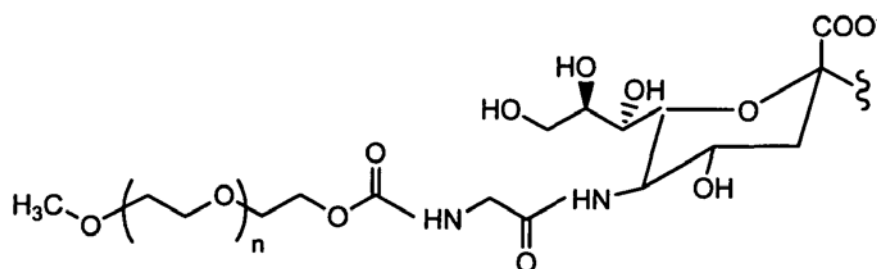
- (a) administrering av nevnte peptid til en donor av nevnte benmarg;
 - (b) isolering av nevnte benmarg fra nevnte donor; og
 - (c) infundering av nevnte benmarg inn i en mottaker.
- 11.** Et første preparat omfattende en forbindelse ifølge formel (1) som er 1,1'-[1,4-fenyl-bis-(metylen)-bis-1,4,8,11-tetraazasyklo-tetradekan (AMD3100); og et andre preparat omfattende et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifierende gruppe, hvori nevnte G-CSF-peptid omfatter en struktur ifølge formelen



hvor

q er 0 eller 1; og

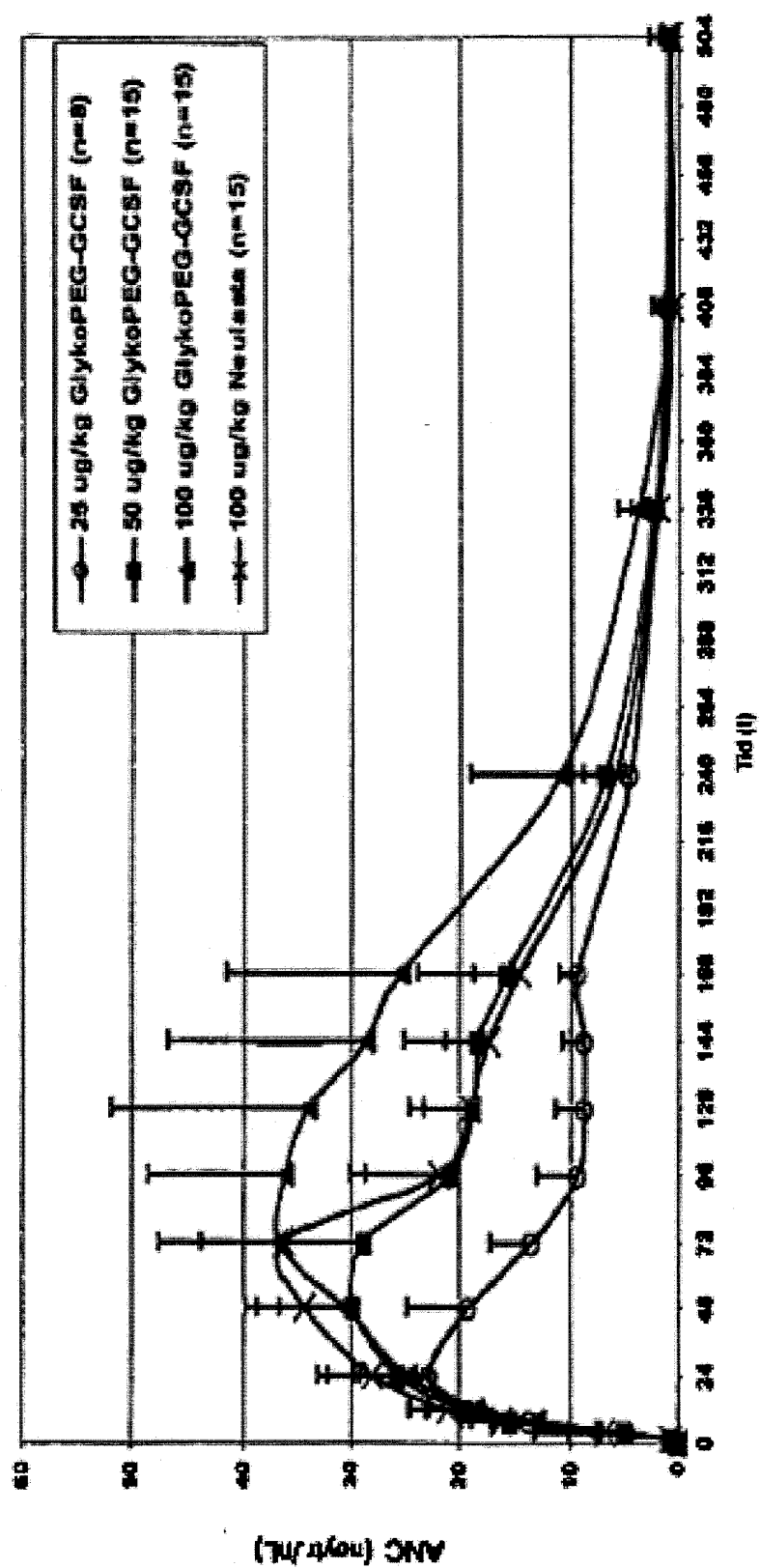
Sia-PEG har en struktur ifølge formelen:



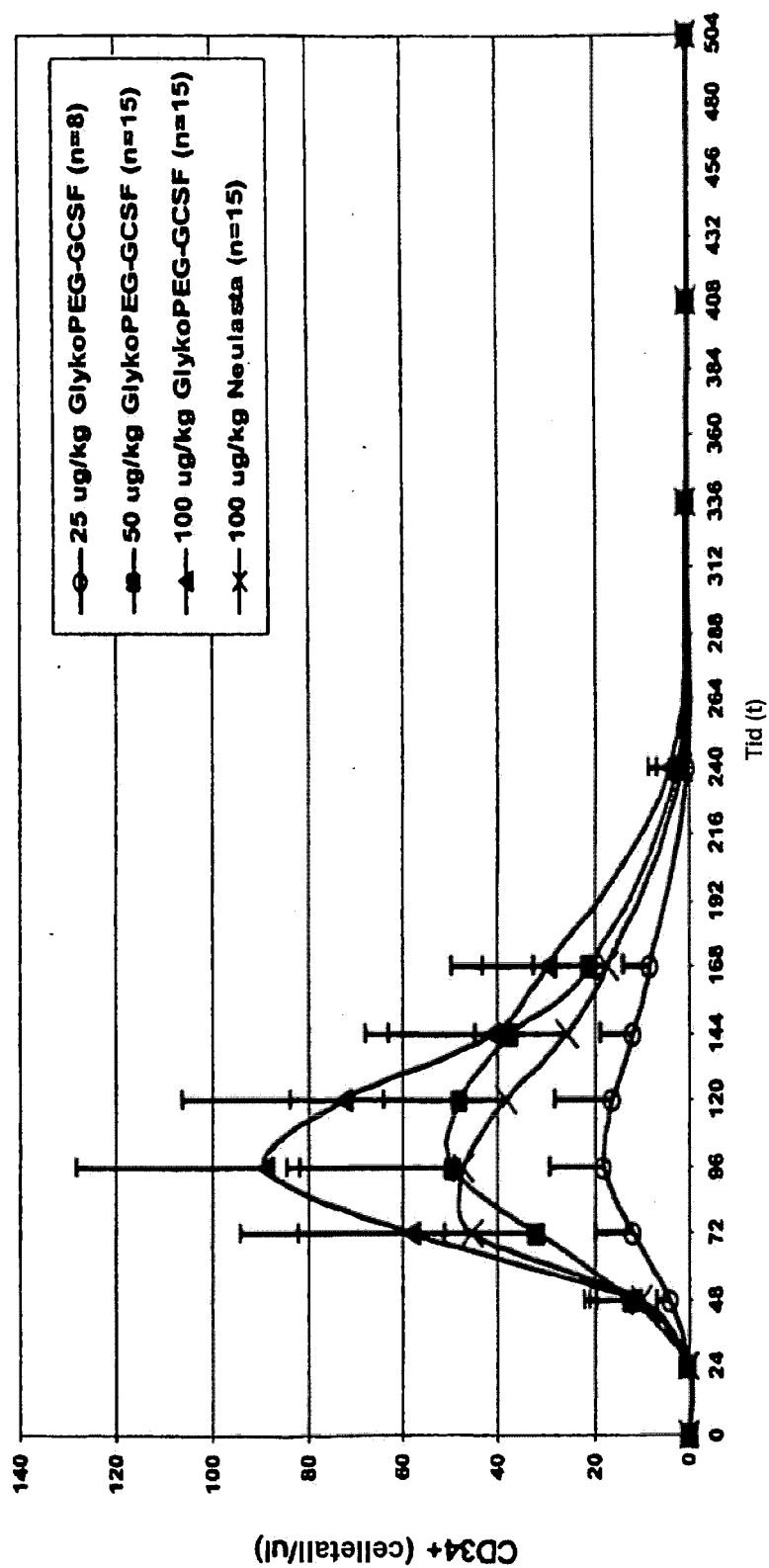
hvor n er et helt tall fra 400 til 500, for anvendelse ved økning av antallet av hematopoetiske progenitorceller i en pasient; hvor det første preparatet og det andre preparatet skal administreres sekvensielt og i hvilken som helst rekkefølge eller samtidig.

- 12.** Peptid for anvendelse ifølge krav 1, hvor det anvendes i en mengde i et område på fra omtrent 1 mg til omtrent 20 mg.
- 13.** Farmasøytisk preparat omfattende peptidet som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifiserende gruppe, for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1 til 6 eller 12, eller en effektiv mengde av et peptid som er et kovalent konjugat mellom et G-CSF-peptid og en polymerisk modifiserende gruppe for anvendelse ifølge kravene 7 eller 9, hvor peptidet er definert som i krav 1.

FIGUR 1



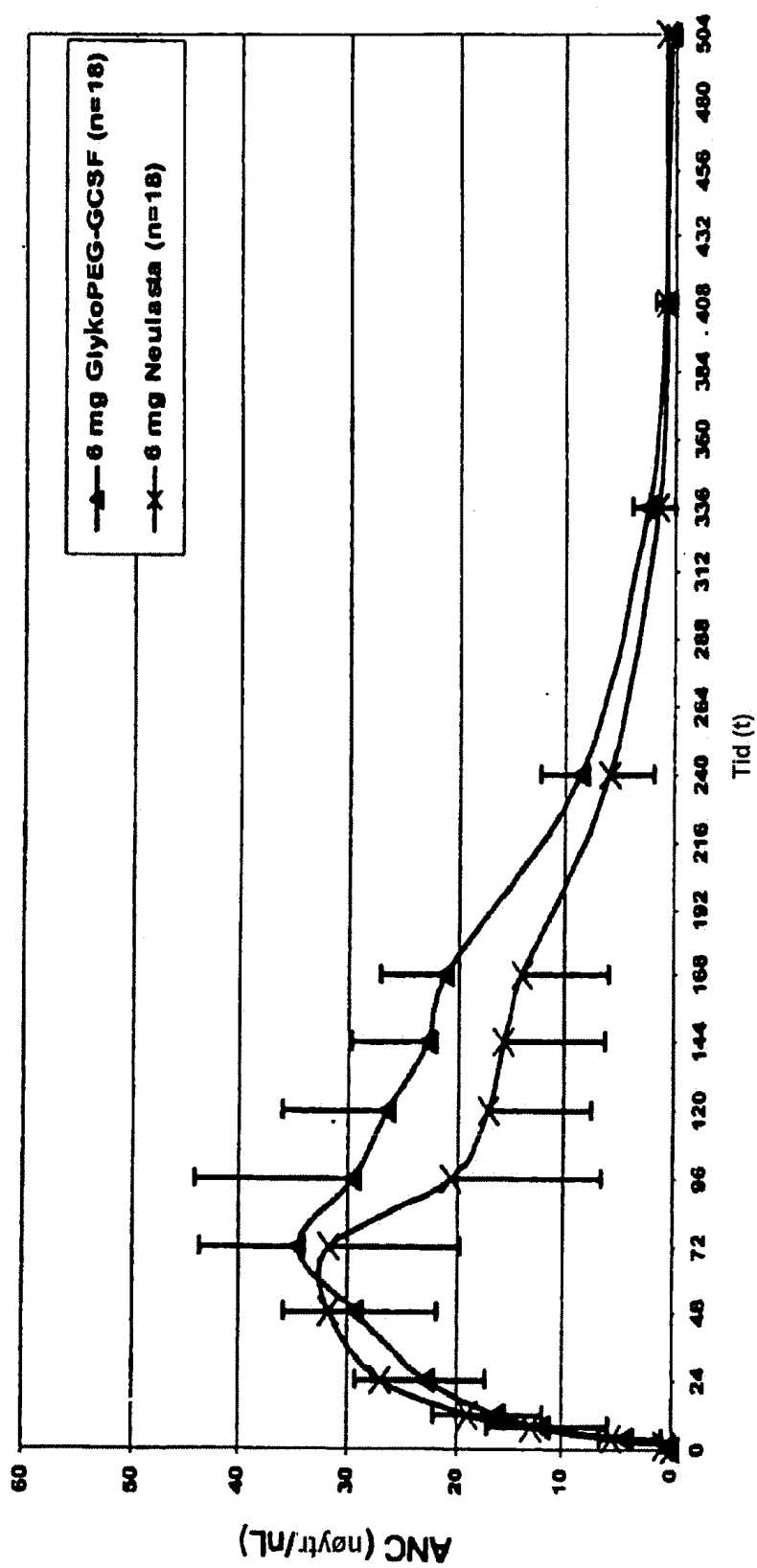
FIGUR 2



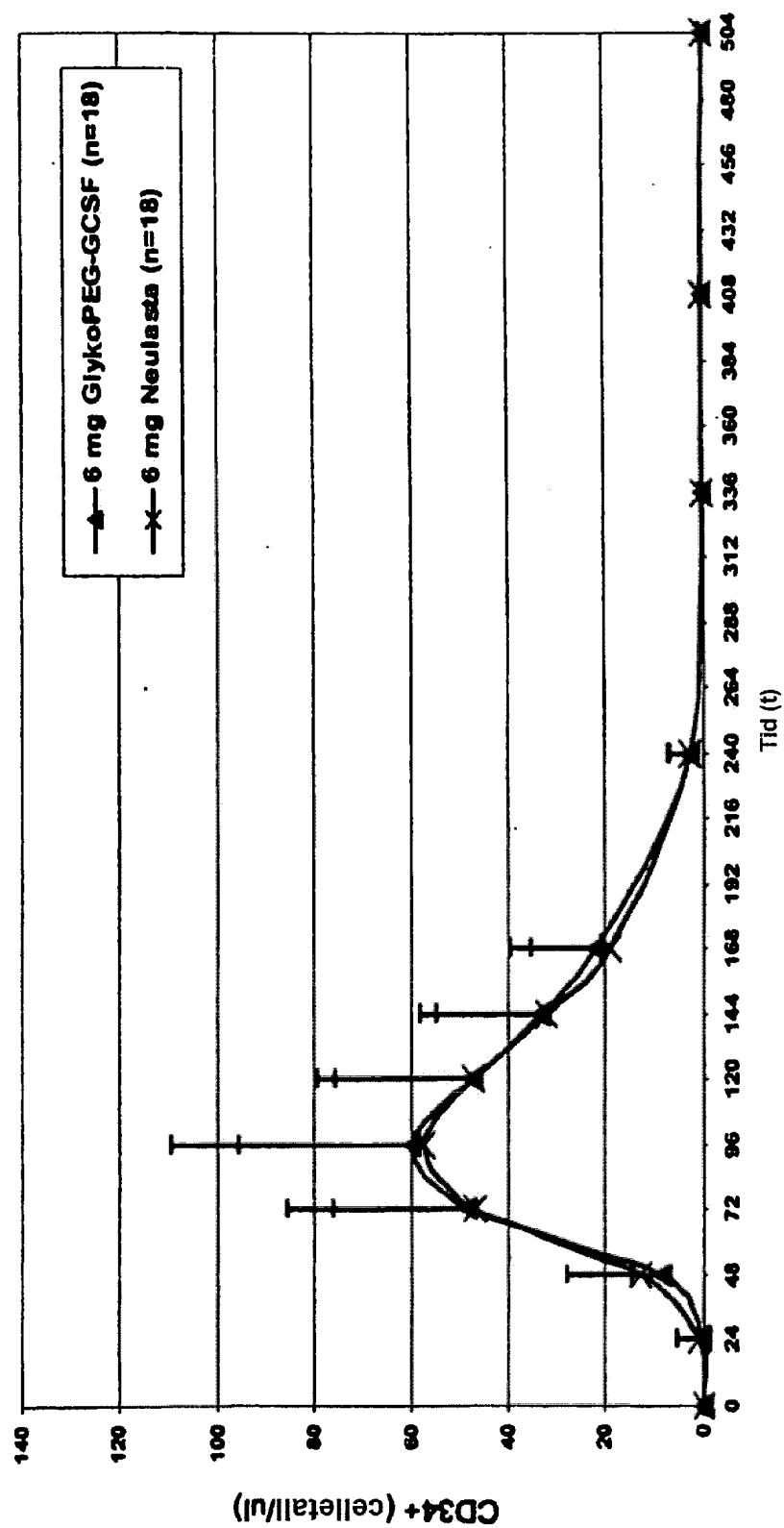
FIGUR 3

<i>Farmakokinetiske parametre G-CSF (XM-22 eller pegfilgrastim) [unit]</i>	<i>Pilot kohort (25 µg/kg, test)</i>	<i>Gruppe A (50 µg/kg XM22, test)</i>	<i>Gruppe B (100 µg/kg XM22, test)</i>	<i>Gruppe D (100 µg/kg Neulasta[®], Referanse)</i>
$AUC_{(0-t_{last})}$ [t*pg/mL]	965895.10	2516797.22	15744903.59	12450575.03
$AUC_{(0-\infty)}$ [t*pg/mL]	1123056.06	2651018.14	15903783.04	12617511.87
Cl [mL/t/kg]	22.26	18.86	6.29	7.93
C_{maks} [pg/mL]	36424.95	62430.32	296626.65	287545.34
t_{maks} [t]	10.00	18.00	30.12	24.00
$t_{1/2}$ [t]	48.84	34.13	35.57	25.35
MRT [t]	54.55	48.85	45.60	35.37

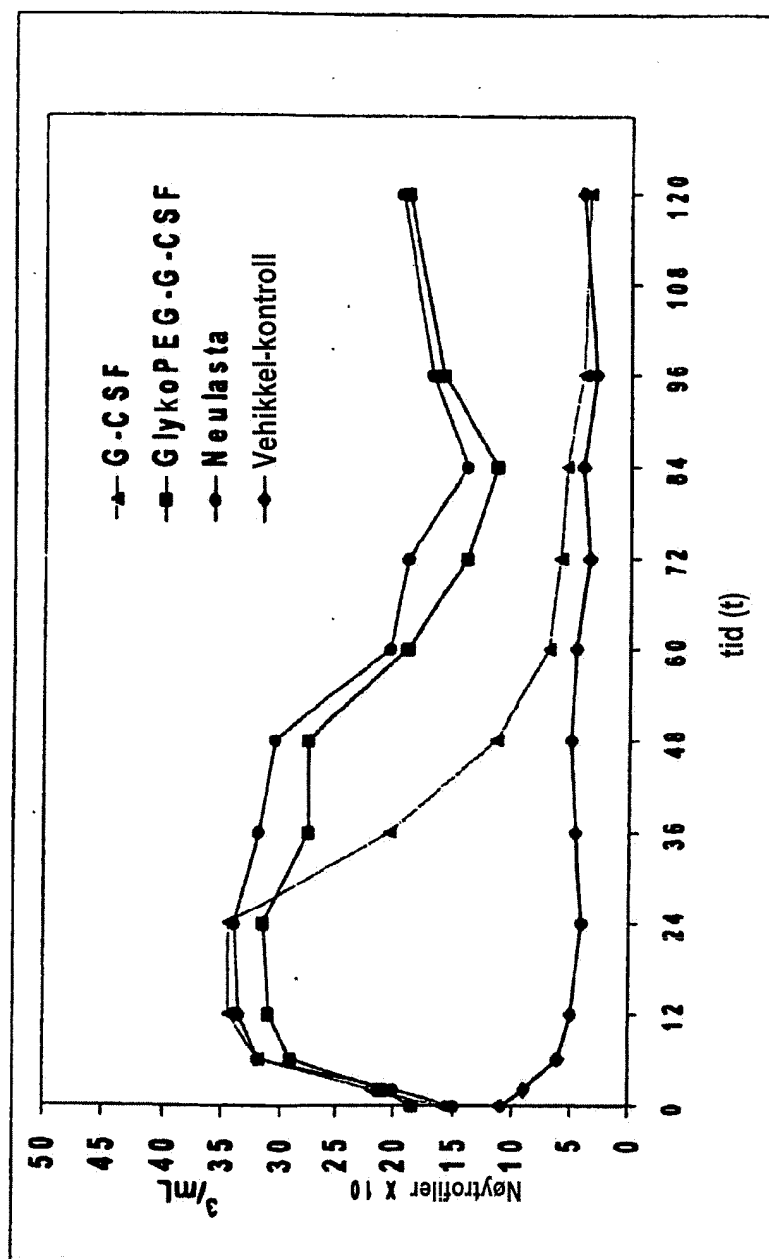
FIGUR 4



FIGUR 5



FIGUR 6
Farmakodynamiske resultater i cynomolgusaper



FIGUR 7

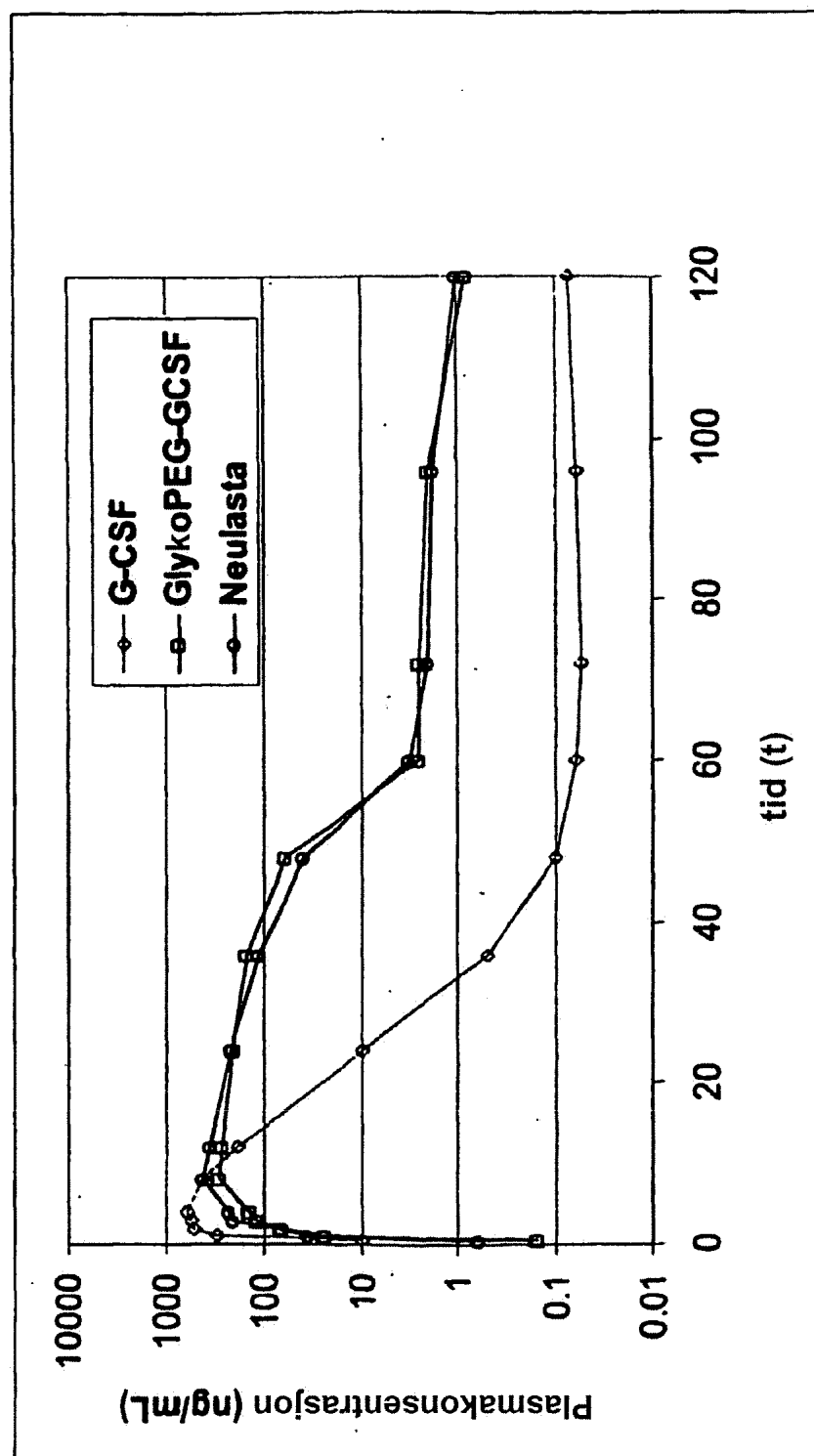
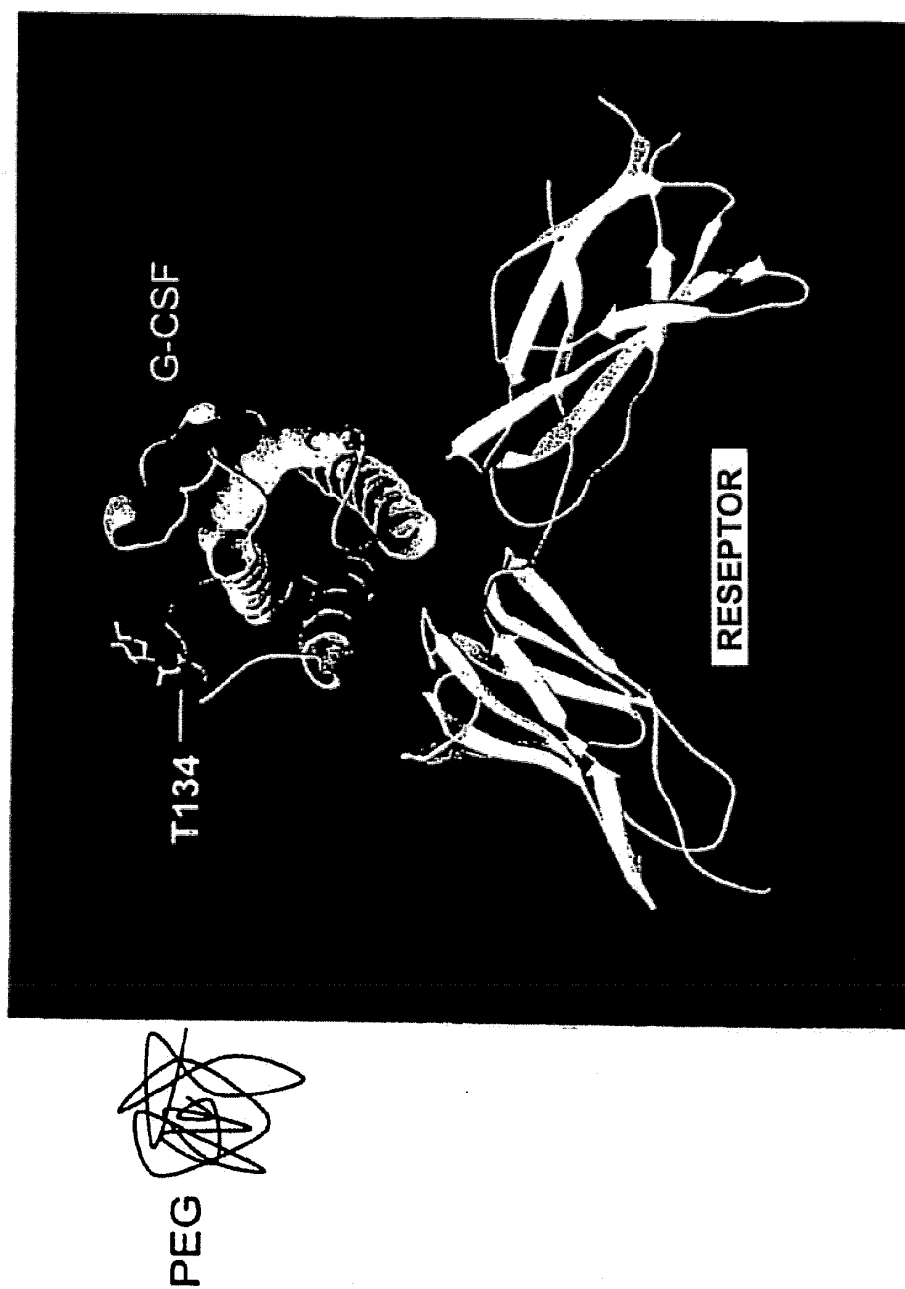
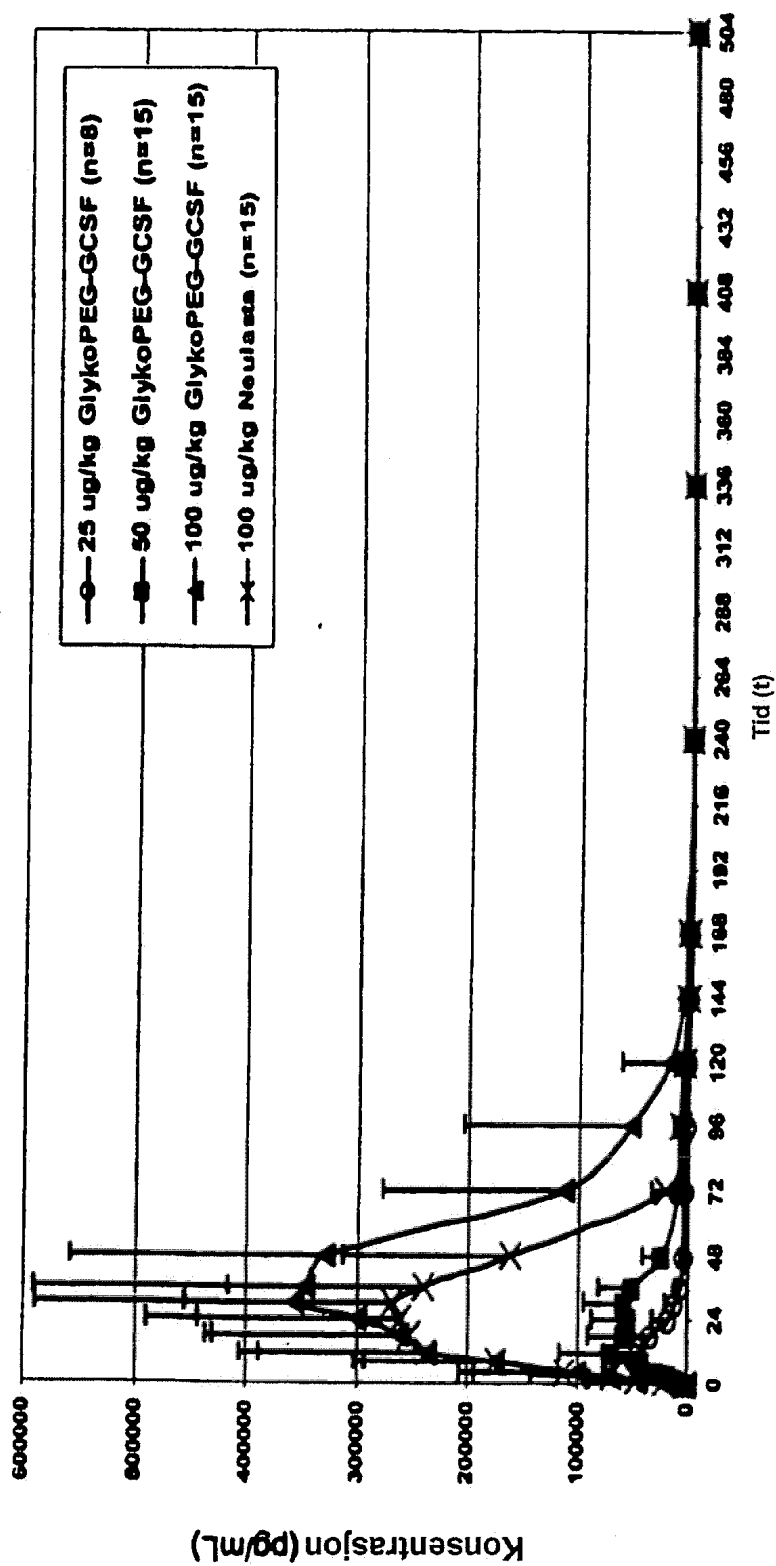
Farmakokinetiske resultater i cynomolgusaper, sc, 100 $\mu\text{g/kg}$ 

FIG. 8

GlykoPEG-GCSF og Reseptor



FIGUR 9



FIGUR 10

