



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 139**

51 Int. Cl.:
C07K 14/505 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99955046 .0**
86 Fecha de presentación : **18.10.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1123313**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2001**

54 Título: **Métodos y composiciones que permiten prevenir y tratar la anemia.**

30 Prioridad: **23.10.1998 US 178292**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es: **Egrie, Joan, C.;**
Elliott, Steven, G. y
Brown, Jeffrey, K.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 283 139 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones que permiten prevenir y tratar la anemia.

5 **Campo de la invención**

La invención está relacionada con la elevación del hematocrito en un mamífero utilizando análogos hiperglicosilados de la eritropoyetina. Más particularmente, la invención está relacionada con la dosificación menos frecuente de un análogo hiperglicosilado, en comparación con la eritropoyetina humana recombinante, con el fin de elevar y mantener el hematocrito y tratar la anemia. Es descrita también la administración de cantidades menores de un análogo hiperglicosilado, en comparación con la eritropoyetina humana recombinante, con una frecuencia de dosificación equivalente, con el fin de elevar y mantener el hematocrito y tratar la anemia. También son descritos nuevos análogos hiperglicosilados de la eritropoyetina.

15 **Antecedentes de la invención**

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoprotéica, necesaria para la maduración de las células progenitoras eritroides en eritrocitos. Es producida en el riñón y es esencial a la hora de regular los niveles de células rojas sanguíneas en circulación. Condiciones marcadas por bajos niveles de señal de oxígeno tisular incrementan la producción de EPO, lo cual, a su vez, estimula la eritropoyesis. Una pérdida de la función renal, como la que se ve en el fallo renal crónico (CRF), por ejemplo, normalmente da como resultado una disminución en la producción de EPO y una reducción concomitante de las células rojas sanguíneas.

Fue purificada Epo urinaria humana por Miyake *et al.* (J. Biol. Chem. 252, 5558 (1977)) procedente de pacientes con anemia aplásica. Sin embargo, la cantidad de proteína EPO purificada obtenida de esta fuente fue insuficiente para las aplicaciones terapéuticas. La identificación y clonado del gen codificando la EPO humana y la expresión de la proteína recombinante fueron revelados en la Patente americana nº 4.703.008, de Lin, cuya explicación es incorporada aquí a modo de referencia. Es revelado en la Patente americana nº 4.667.016, de Lai *et al.*, un método para la purificación de eritropoyetina humana recombinante procedente de medio celular, lo cual es incorporado aquí a modo de referencia. La producción de EPO biológicamente activa procedente de células huésped de mamífero ha hecho posible, por primera vez, la disponibilidad de cantidades adecuadas de EPO para aplicaciones terapéuticas. Además, el conocimiento de la secuencia génica y el aumento en la disponibilidad de proteína purificada ha llevado a una mejor comprensión del modo de actuación de esta proteína.

Tanto la EPO procedente de orina humana (Miyake *et al. supra*) como la EPO humana recombinante expresada en células de mamífero, contienen tres cadenas de oligosacáridos ligadas a N y una cadena de oligosacáridos ligada a O, las cuales, juntas, comprenden alrededor del 40% del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación ligada a N tiene lugar en los residuos de asparagina, situados en las posiciones 24, 38 y 83, mientras que la glicosilación ligada a O tiene lugar en un residuo de serina situado en la posición 126 (Lai *et al.* J. Biol. Chem. 261, 3116 (1986); Broudy *et al.* Arch. Biochem. Biophys. 265, 329 (1988)). Las cadenas de oligosacáridos han demostrado ser modificadas con residuos de ácido siálico terminales con cadenas ligadas a N, poseyendo usualmente hasta cuatro ácidos siálicos por cadena, y cadenas ligadas a O, poseyendo hasta dos ácidos siálicos. Por lo tanto, un polipéptido EPO puede acomodar hasta un total de 14 ácidos siálicos.

Varios estudios han demostrado que las alteraciones en las cadenas de carbohidratos de la EPO pueden afectar a la actividad biológica. En un estudio, sin embargo, la supresión de cadenas de oligosacáridos ligadas a N o ligadas a O, individualmente o juntas, por medio de mutagénesis de los residuos de asparagina o de serina, que son sitios de glicosilación, reduce de forma drástica la actividad *in vitro* de la EPO alterada, que es producida en las células de mamífero (Dube *et al.* J. Biol. Chem. 263, 17516 (1988)). Sin embargo, DeLorme *et al.* (Biochemistry 31, 9871-9876 (1992)) reportó que la supresión de sitios de glicosilación ligados a N en la EPO redujo la actividad biológica *in vivo*, pero no *in vitro*.

La relación entre el contenido de ácido siálico en EPO y la actividad biológica *in vivo* fue explicada por medio de la determinación de la actividad *in vivo* de isoformas aisladas de EPO. Ha sido descubierto que un incremento progresivo en el contenido de ácido siálico por molécula de EPO proporcionó un incremento progresivo correspondiente en la actividad biológica *in vivo*, conforme es medido por la habilidad de concentraciones equimolares de isoformas aisladas de EPO de elevar el hematocrito de ratones normales (Egrie *et al.* Glycoconjugate J. 10, 263 (1993)). Aquellas isoformas de EPO poseyendo un contenido mayor de ácido siálico mostraron también una vida media en el suero más larga, pero con una disminución en la afinidad por el receptor EPO, sugiriendo que la vida media en suero es un determinante importante en la actividad biológica *in vivo*.

La introducción de nuevos sitios de glicosilación en el polipéptido de EPO puede dar como resultado la producción de moléculas con cadenas adicionales de carbohidratos. Ver las publicaciones PCT núms. WO91/05867 y WO95/05465. Son revelados análogos de glicosilación de EPO poseyendo, al menos, una cadena adicional de carbohidratos ligada a N y/o poseyendo, al menos, una cadena adicional de carbohidratos ligada a O. Fue determinado que un análogo de glicosilación poseyendo una cadena adicional ligada a N posee una vida media en circulación más larga, si se compara con la EPO humana recombinante (rHuEpo) (isoformas 9-14) y con una isoforma purificada de rHuEpo poseyendo 14 ácidos siálicos por molécula.

La administración de eritropoyetina humana recombinante (rHuEpo) es efectiva a la hora de elevar los niveles de células rojas sanguíneas en pacientes anémicos con enfermedad renal en fase final (Eschbach *et al.* New Eng. J. Med. 316, 73-38 (1987)). Estudios subsiguientes han demostrado que el tratamiento con rHuEpo puede corregir la anemia asociada a una variedad de otras dolencias. (Fischl *et al.* New Eng. J. Med. 322, 1488-1493 (1990)); Laupacis, Lancet 341, 1228-1232 (1993). Han sido concedidas autorizaciones regulatorias para la utilización de la rHuEpo en el tratamiento de la anemia asociada a CRF, de la anemia asociada a terapia con AZT (zidovudina) en pacientes infectados con VIH, de la anemia en pacientes con enfermedades malignas no mieloides recibiendo quimioterapia y de la anemia en pacientes que pasan por cirugía con el fin de reducir la necesidad de transfusiones sanguíneas alogénicas. La terapia actual para todas las indicaciones aprobadas (a excepción de la indicación de cirugía) implica una dosis inicial de entre 50 a 150 unidades/kg tres veces por semana (TIW), administradas por medio de una inyección intravenosa (IV) o subcutánea, con el fin de alcanzar un rango diana sugerido de hematocrito. Para la indicación de cirugía, la rHuEpo es administrada cada día, 10 días antes de la cirugía, el día de la cirugía y cuatro días después de la misma (EPOGEN[®], Package Insert, 12/23/96). Por lo general, las dosis iniciales recomendadas actualmente de rHuEpo elevan el hematocrito hasta el rango diana en alrededor de seis a ocho semanas. Una vez que ha sido conseguido el rango diana del hematocrito, es establecido un calendario de dosificación de mantenimiento, el cual variará dependiendo del paciente, pero normalmente es de tres veces por semana para los pacientes anémicos con CRF. La administración de rHuEpo descrita más arriba es un régimen efectivo y bien tolerado para el tratamiento de la anemia.

Sería deseable poseer una sustancia terapéutica con una potencia mayor que la rHuEpo. Una ventaja de una molécula tal sería que podría ser administrada con una frecuencia menor y/o en una dosis inferior. Los tratamientos actuales para pacientes que sufren anemia precisan de la administración de EPOGEN[®] tres veces por semana, y para pacientes en cirugía de la administración una vez al día. Un calendario de dosificación menos frecuente sería más conveniente tanto para médicos como para pacientes, especialmente para aquellos pacientes que no realizan visitas agendadas regularmente a las consultas de los doctores o a las clínicas, o para aquellos que se auto-inyectan su EPO. Otra ventaja de una molécula más potente es que es introducido menos fármaco en los pacientes con una elevación comparable del hematocrito.

Por lo tanto, es un objetivo de la invención el identificar moléculas más potentes para el tratamiento de la anemia que permitan un calendario de dosificación menos frecuente. Es un objetivo adicional de la invención el proporcionar moléculas que eleven y mantengan el hematocrito en niveles que sean, al menos, comparables a los de la EPO, cuando sean administradas en una dosis inferior. Es también un objetivo de la invención que estas moléculas, seleccionadas para una dosificación menos frecuente, sean al menos tan bien toleradas como la rHuEpo, y potencialmente mejor toleradas en algunos pacientes.

Resumen de la invención

Ha sido descubierto que un análogo hiperglicosilado de la EPO, denominado N47 (EPO Asn³⁰Thr³²Val¹⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰) posee una vida media en suero más larga que la eritropoyetina humana recombinante (rHuEpo) y una actividad mayor *in vivo* cuando es administrado con la misma dosis y frecuencia que la rHuEpo. Además, el análogo ha demostrado que eleva el hematocrito en ratones con una administración de una vez por semana, que es comparable a la elevación del hematocrito con rHuEpo administrada tres veces por semana. Las farmacocinéticas del análogo de la EPO N47 administrado a ratones y a humanos fueron similares.

La investigación proporciona un método para elevar y mantener el hematocrito en un mamífero, comprendiendo la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo hiperglicosilado de la EPO en una composición farmacéutica, en donde el análogo es administrado con una frecuencia inferior que la de una cantidad molar equivalente de la rHuEpo, con el fin de obtener un hematocrito diana comparable. La frecuencia de dosificación de la presente invención, con el fin de alcanzar un rango de hematocrito óptimo para el paciente, es inferior a tres veces por semana. Las frecuencias de dosificación pueden ser de dos veces por semana, una vez por semana o menos de una vez por semana, como una vez cada dos semanas, una vez por mes o una vez cada dos meses. La frecuencia de dosificación requerida para mantener un hematocrito diana en un paciente es inferior a tres veces por semana. Las frecuencias de dosificación pueden ser de dos veces por semana, una vez por semana o menos de una vez por semana, como una vez cada dos semanas, una vez por mes o una vez cada dos meses.

También son proporcionadas composiciones farmacéuticas comprendiendo análogos hiperglicosilados de la EPO, en donde las composiciones son adecuadas para una frecuencia de dosificación de menos de tres veces por semana. Las composiciones incluirán adyuvantes farmacéuticamente aceptables, adecuados para su uso con análogos hiperglicosilados de la EPO.

La invención puede ser utilizada con cualquier dolencia en donde, como resultado de la misma, se produzca una disminución en los niveles de células rojas sanguíneas, tales como la anemia asociada a una disminución o pérdida de la función renal, (fallo renal crónico), terapia mielosupresiva, cáncer, infección viral, enfermedad crónica y pérdida excesiva de sangre durante procedimientos quirúrgicos. En una realización, el tratamiento con una dosificación de una vez por semana, o con una frecuencia menor, es para la anemia resultante de fallo renal crónico.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia aminoacídica de la eritropoyetina humana.

5 La Figura 2 muestra un análisis Western Blot de la rHuEpo y de análogos hiperglicosilados de la EPO procedentes de la expresión de la línea celular CHO en medio libre de suero. La construcción de los análogos N53 y N61 es descrita en el Ejemplo 1. Es indicado el número de cadenas de carbohidratos ligados a N en cada análogo.

10 La Figura 3 compara la actividad de la rHuEpo, los análogos de la EPO N4, N18 y N50 (conteniendo cuatro cadenas de carbohidratos ligadas a N), N47 (conteniendo cinco cadenas de carbohidratos ligadas a N) y N53 (conteniendo seis cadenas de carbohidratos ligadas a N) en el bioensayo del ratón policitémico exhipóxico. Son descritos procedimientos experimentales en el Ejemplo 3. Cada punto representa la respuesta media de cinco animales. Los análogos N4, N18 y N47 han sido descritos previamente en la WO95/05464.

15 La Figura 4 compara la vida media en suero de la rHuEpo y del análogo de la EPO N47, administrados a ratas normales por medio de inyección intravenosa (IV). Son descritos en el Ejemplo 4 los procedimientos experimentales. Los resultados son la media (\pm SD) para cada grupo.

20 La Figura 5 compara la vida media en suero de la rHuEpo y del análogo de la EPO N47, administrados a perros Beagle por medio de inyección intravenosa (IV). Los procedimientos experimentales son descritos en el Ejemplo 4. Los resultados son la media (\pm SD) para cada grupo.

25 La Figura 6 muestra la elevación del hematocrito en ratones, en respuesta a diferentes dosis de la rHuEpo y del análogo de la EPO N47, administradas por medio de inyección intraperitoneal (IP) tres veces por semana (TIW) durante seis semanas. Los procedimientos experimentales son descritos en el Ejemplo 5. Los resultados mostrados son la media (\pm SD) por grupo del cambio en el hematocrito para cada grupo de dosificación.

30 La Figura 7 compara la potencia relativa de la rHuEpo y del análogo de la EPO N47 en ratones, inyectados por medio de ruta de administración intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV), con una frecuencia de una vez por semana (QW) o de tres veces por semana (TIW). Los procedimientos experimentales son descritos en el Ejemplo 5. Cada punto representa la media (\pm SD) de los datos procedentes de experimentos separados como sigue: N47, IP, TIW (n=5); N47, IV, TIW (n=1); N47, IP, QW (n=2); N47, IV, QW (n=3); rHuEpo, IP, TIW (n=5); rHuEpo, IV, QW (n=2). Cada experimento utilizó de 7 a 13 ratones por dosis.

35 La Figura 8 muestra la elevación del hematocrito en ratones, en respuesta a distintas dosis de la rHuEpo o del análogo de la EPO N47, administradas por inyección intravenosa (IV) una vez por semana (QW) durante aproximadamente seis semanas. Los procedimientos experimentales son descritos en el Ejemplo 5. Los resultados mostrados son la media (\pm SD) por grupo del cambio en el hematocrito para cada grupo de dosificación.

40 La Figura 9 muestra la elevación del hematocrito en ratones, en respuesta a distintas dosis del análogo de la EPO N47 administrado por inyección intravenosa (IV), una vez por semana (QW) o una vez cada dos semanas (EOW), durante aproximadamente seis semanas. Los procedimientos experimentales son descritos en el Ejemplo 5. Los resultados mostrados son la media (\pm SD) por grupo del cambio en el hematocrito para cada grupo de dosificación.

45 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para elevar y mantener el hematocrito, comprendiendo la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina en una composición farmacéutica. El análogo es administrado con una frecuencia inferior que una cantidad molar equivalente de la rHuEpo, con el fin de obtener un hematocrito diana comparable. La composición puede ser administrada por ruta intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

55 Sorprendentemente ha sido descubierto que el análogo N47, un análogo hiperglicosilado de la EPO descrito en la WO95/05465, podía conseguir una elevación en el hematocrito siendo administrado una vez por semana, que era comparable a la observada para la rHuEpo administrada tres veces por semana. El análogo N47 posee los siguientes cambios aminoacídicos: ala en lugar de asn en la posición 30; his en lugar de thr en la 32; pro en lugar de val en la 87; trp en lugar de asn en la 88; y pro en lugar de thr en la 90, lo cual da como resultado la adición de dos cadenas de carbohidratos ligadas a N en los residuos de asparagina 30 y 88. El análogo fue expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) (conforme es descrito en el Ejemplo 1) y purificado conforme es descrito en el Ejemplo 2, con el fin de proporcionar las isoformas de 17 a 22 ácidos siálicos. El análogo N47 mostró una vida media en suero más larga en ratas y perros beagle que la rHuEpo cuando fue inyectado por ruta intravenosa (Figuras 4 y 5). Cuando fue inyectado intraperitonealmente tres veces por semana el N47 indujo elevaciones en el hematocrito de ratones normales comparables a las de la rHuEpo, a concentraciones más bajas (Figura 6). La potencia del N47 demostró que fue alrededor de 3 a 4 veces mayor que la de la rHuEpo cuando fue administrado tres veces por semana (Figuras 6 y 7). Cuando fue administrada una vez por semana, en dosis similares, la rHuEpo mostró una baja estimulación del hematocrito en ratones normales, mientras que el N47 proporcionó una marcada elevación (Figura 8). La potencia del N47 fue alrededor de 14 veces superior que la de la rHuEpo para una dosificación de una vez por semana (Figura 7). De forma significativa, la respuesta del hematocrito al análogo N47 administrado una vez por semana es comparable a

la de la rHuEpo administrada tres veces por semana. Incluso cuando es administrado cada dos semanas, el N47 produjo también una elevación significativa en el hematocrito de ratones normales (Figura 9). Tomados en su conjunto, los datos indicaron que los análogos hiperglicosilados de la Epo y, en particular, el análogo N47, pueden ser utilizados de forma ventajosa para elevar el hematocrito utilizando una dosificación menos frecuente que la del tratamiento actual con rHuEpo.

Se ha demostrado también que los resultados descritos más arriba obtenidos en ratones pueden ser extrapolados a humanos. Los parámetros farmacocinéticos para la administración de la rHuEpo y del análogo N47 a 11 pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD) demostraron que el análogo N47 posee una vida media en suero tres veces más larga que la de la rHuEpo (Ejemplo 6 y Tabla 5). Estos resultados sugieren que los análogos hiperglicosilados de la Epo permiten una frecuencia inferior en la dosificación en humanos que la rHuEpo.

Conforme es utilizado aquí, el término “análogo hiperglicosilado de la Epo” se refiere a la Epo comprendiendo, al menos, un sitio adicional de glicosilación con una cadena adicional de carbohidratos añadida al sitio. Los sitios de glicosilación pueden ser para cadenas de carbohidratos ligadas a N o ligadas a O. Los nuevos sitios de glicosilación ligados a N son introducidos por medio de la alteración en la secuencia de ADN, con el fin de codificar el sitio de consenso para la adición de carbohidratos ligados a N (los aminoácidos Asn-X-Ser/Thr) en la cadena polipéptida, mientras que los nuevos sitios ligados a O son introducidos por medio de alteraciones en la secuencia de ADN para codificar un residuo de serina o de treonina. Los análogos son producidos por medio de técnicas de mutagénesis para la introducción de adiciones, supresiones o sustituciones de residuos aminoacídicos que incrementan o alteran los sitios que se encuentran disponibles para la glicosilación en el polipéptido de la Epo. El ADN que codifica un análogo hiperglicosilado de la Epo es transfectado a una célula huésped eucariota y la glicoproteína expresada es analizada para determinar la presencia de una cadena adicional de carbohidratos.

Los análogos hiperglicosilados de la Epo han mostrado actividad *in vitro*, la cual fue comparable, o incluso inferior, a la determinada para la rHuEpo, sugiriendo que la unión al receptor de la Epo no se ve mejorada, y puede en algunos casos verse disminuida, por la adición de cadenas de carbohidratos. Sin embargo, la hiperglicosilación puede usualmente incrementar la vida media en suero y llevar potencialmente a un incremento de la actividad biológica *in vivo*. Un análogo de la Epo poseyendo una cadena adicional de carbohidratos ligada a N en la posición 88 mostró una disminución en la afinidad por el receptor, en comparación con la rHuEpo (isoformas 9-14) o con una isoforma purificada de la rHuEpo poseyendo 14 ácidos siálicos por molécula, aunque demostró una vida media en circulación más larga y una mejora en la actividad *in vivo* en comparación con una mezcla de las isoformas 9-14 de la Epo o con la isoforma 14 de la Epo aislada.

Los análogos hiperglicosilados de la Epo que pueden ser administrados conforme a la presente invención poseerán, al menos, una cadena adicional de carbohidratos ligada a N o ligada a O. En una realización, los análogos poseerán dos cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N. En otras realizaciones, los análogos tendrán tres, cuatro o más cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N. Como ejemplos, los análogos de la invención poseerán, al menos, una cadena adicional ligada a N, en uno o más de los residuos aminoacídicos 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 y 138 de la secuencia de la Epo humana. En una realización, el análogo posee cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N en los residuos 30 y 88 de la Epo humana. La numeración de los residuos aminoacídicos de la Epo humana es conforme es mostrado en la Figura 1 y en la SEC. ID. N° 1. La Figura 1 muestra un polipéptido maduro predicho de la Epo de 166 aminoácidos, mientras que la Epo recombinante producida posee 165 aminoácidos después de la eliminación del residuo C-terminal de arginina. Se entiende que la rHuEpo y los análogos hiperglicosilados de la Epo pueden poseer 165 o 166 aminoácidos.

Los análogos de la invención tendrán, al menos, cuatro cadenas de carbohidratos ligadas a N. De las cuatro cadenas, tres pueden encontrarse en los sitios naturales, en las posiciones 24, 38 y 83. Sin embargo, se contempla que algunos análogos de la invención pueden presentar alteraciones en uno o más de los sitios naturales de glicosilación, de tal forma que uno o más de los sitios se encuentre suprimido y sustituido por un nuevo sitio. Tales análogos son proporcionados también por la invención. Por ejemplo, cualquiera de los sitios en las posiciones 24, 38 y 83 puede ser suprimido y sustituido por un sitio en la posición 88. Opcionalmente, los análogos pueden poseer un sitio ligado a O en la posición 126.

La invención proporciona también nuevos análogos hiperglicosilados de la Epo poseyendo, al menos, una cadena adicional de carbohidratos. Se ha descubierto que es añadida una cadena adicional de carbohidratos ligada a N en cualquiera de las posiciones 52, 53, 55, 86 y 114, las cuales han sido modificadas para ser un sitio de glicosilación. Realizaciones específicas incluyen los análogos N49 a N61, conforme es descrito en la Tabla 1. Los nuevos análogos poseerán, al menos, un nuevo sitio de glicosilación ligado a N en cualquiera de las posiciones 52, 53, 55, 86 y 114, y pueden comprender adicionalmente en otros sitios cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N o ligadas a O. Los análogos pueden poseer una, dos, tres o cuatro cadenas adicionales de carbohidratos, o más de cuatro cadenas adicionales. En una realización preferida, los análogos poseerán tres cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N (en total, seis cadenas ligadas a N). En otra realización preferida, los análogos tendrán cuatro cadenas adicionales ligadas a N (en total, siete cadenas ligadas a N). Los análogos con tres o cuatro, o más de cuatro, cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N pueden poseer, aunque sin estar limitados a la misma, una cadena adicional en cualquiera de las posiciones 52, 53, 55, 86 y 114.

ES 2 283 139 T3

Sorprendentemente se ha descubierto que un análogo hiperglicosilado con tres cadenas adicionales ligadas a N en las posiciones 30, 53 y 88 (en total, seis cadenas ligadas a N) presenta una mayor actividad *in vivo* que el análogo N47 con dos cadenas adicionales (cinco en total). Los resultados son mostrados en la Figura 3. Es evidente que la actividad *in vivo* de los análogos es directamente dependiente del número de cadenas de carbohidratos ligadas a N. Estos resultados pueden ser extrapolados al ajuste terapéutico, en donde los análogos poseyendo más cadenas de carbohidratos ligadas a N que el N47 pueden ser dosificados incluso con una frecuencia menor.

Los análogos pueden ser preparados por medio de una variedad de técnicas de mutagénesis, disponibles para cualquier persona experta en este campo, tales como la mutagénesis dirigida a sitio, la mutagénesis por PCR y la mutagénesis con casete (Zoller *et al.* Meth. Enz. 100, 468-500 (1983)); Higuchi, en *PCR Protocols* páginas 177-183 (Academic Press, 1990); Wells *et al.* Gene 34, 315-323 (1985)). El Ejemplo 1 describe la utilización de la técnica de mutagénesis por PCR para construir nuevos análogos hiperglicosilados de la Epo.

Es insertada una secuencia de ADN de la Epo que ha experimentado mutagénesis dentro de un vector de expresión utilizando técnicas estándar, siendo adecuado el vector para su mantenimiento dentro de una célula huésped de mamífero. El vector contendrá, usualmente, los siguientes elementos: promotor y otros elementos reguladores “aguas arriba”, origen de replicado, sitio de unión al ribosoma, sitio de finalización de transcripción, sitio del poliligador y marcador seleccionable, que son compatibles con la utilización en una célula huésped de mamífero. Asimismo, los vectores pueden contener también elementos que permitan la propagación y mantenimiento en las células huésped procarióticas.

Células o líneas celulares adecuadas incluyen cualquiera procedente de fuentes de mamíferos, incluyendo fuentes humanas. Ejemplos incluyen la COS-7 (ATCC número de acceso CRL 1651), la 293 humana, de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC número de acceso CCL 10), células de ovario de hámster chino (incluyendo células con déficit de dihidrofolato reductasa (DHFR), Urlab *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 (1980)). Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, aunque sin estar limitadas a las mismas, la HeLa, la de ratón L-929 y la 3T3. En una realización preferida son utilizadas las células CHO con déficit de DHFR.

Los vectores comprendiendo secuencias codificadoras de los análogos hiperglicosilados de la Epo son introducidos dentro de las células huésped por medio de técnicas estándar de transformación o transfección. El cultivo, amplificación y escrutinio de células huésped transformadas o transfectadas son realizados utilizando métodos públicamente disponibles (Gething *et al.* Nature 293, 620-625 (1981); Kaufman *et al.* Mol Cell. Biol. 5, 1750-1759 (1985); Patente americana n° 4.419.446). Las células huésped albergando secuencias de ADN codificadoras de los análogos hiperglicosilados de la Epo son cultivadas bajo condiciones que permitan la expresión de los análogos. Los análogos son recuperados del medio celular y purificados utilizando procedimientos esencialmente conforme es descrito previamente (WO94/09257) y aquéllos del Ejemplo 2. Los procedimientos de purificación permiten el aislamiento de isoformas de la Epo con un contenido mayor de ácido siálico, resultantes de la adición de cadenas de carbohidratos adicionales.

Los análogos hiperglicosilados de la Epo pueden incluir, además de nuevos sitios de glicosilación, adiciones, supresiones o sustituciones de residuos aminoacídicos que no crean nuevos sitios de glicosilación y que no alteran de forma sustancial la actividad biológica del análogo hiperglicosilado. Aquellos sitios o regiones individuales de la Epo, que pueden ser alterados sin que ello afecte a la actividad biológica, pueden ser determinados por medio del examen de la estructura del complejo Epo-receptor de la Epo, conforme es descrito en Syed *et al.* Nature 395, 511 (1998). El examen de la estructura del complejo Epo-receptor de la Epo revela aquellos residuos que interactúan con el sitio de unión al receptor de la Epo, o que están cerca del mismo, y que deben ser evitados cuando se realizan alteraciones en la secuencia aminoacídica de la Epo. Alternativamente, se pueden determinar empíricamente aquellas regiones que tolerarían sustituciones aminoacídicas por medio de mutagénesis mediante alanina (Cunningham *et al.* Science 244, 1081-1085 (1989)). En este método los residuos aminoacídicos seleccionados son sustituidos individualmente por un aminoácido neutral (e.g., alanina), con el fin de determinar los efectos sobre la actividad biológica.

Es generalmente reconocido que los cambios aminoacídicos conservadores presentan una probabilidad menor de perturbar la estructura y/o función de un polipéptido. Por consiguiente, la invención comprende uno o más cambios aminoacídicos conservadores dentro de un análogo hiperglicosilado de la Epo. Los cambios aminoacídicos conservadores generalmente implican la sustitución de un aminoácido por otro que es similar en cuanto a estructura y/o función (e.g., aminoácidos con cadenas laterales similares en tamaño, carga y configuración). La naturaleza de estos cambios es de sobra conocida para cualquier experto en este campo, y son resumidos en la Tabla 1 más abajo. Tales sustituciones conservadoras son mostradas bajo el encabezamiento de “Sustituciones Preferidas”. Son contemplados también cambios más sustanciales (“Sustituciones ejemplares”), los cuales pueden ser introducidos también. Un experto en este campo apreciará que, inicialmente, los sitios deberían ser modificados por medio de sustitución de una manera relativamente conservadora. Si tales sustituciones dan como resultado una retención de la actividad biológica, entonces pueden ser introducidos cambios más sustanciales (Sustituciones Ejemplares) y/o pueden ser realizadas otras adiciones/supresiones y los productos resultantes ser sometidos a escrutinio.

65

TABLA 1

Sustituciones Aminoacídicas

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Residuo Original	Sustituciones Preferidas	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina
Leu (L)	Ile	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina

55

60

También son descritas supresiones o adiciones de aminoácidos en un análogo hiperglicosilado de la Epo, las cuales no afectan de forma sustancial la actividad biológica. Tales adiciones y supresiones pueden tener lugar en el N-terminal o en el C-terminal del polipéptido, o pueden ser internas del mismo. Por lo general, es menos probable que supresiones o adiciones relativamente pequeñas afecten a la estructura y/o función de la Epo o de un análogo hiperglicosilado. En una realización, las supresiones o adiciones pueden serlo en los residuos 5 a 10, alternativamente en los residuos aminoacídicos 2 a 5, o en los residuos 1 a 2.

65

El término "cantidad molar" se refiere a una cantidad de un análogo hiperglicosilado o de la rHuEpo, la cual está basada en el peso molecular del polipéptido de eritropoyetina correspondiente sin glicosilación. Cantidades equivalentes de la rHuEpo y del análogo se refieren a cantidades que son iguales cuando se tienen en cuenta las variaciones normales en el procedimiento utilizado para determinar tales cantidades. Es necesario el determinar las cantidades equivalentes de esta manera, ya que el peso molecular de la rHuEpo y de los análogos variará dependiendo del número de cadenas de carbohidratos. Para la rHuEpo, el peso molecular del polipéptido de eritropoyetina es calculado

ES 2 283 139 T3

basándose en los residuos aminoacídicos 1-165, conforme es mostrado en la Figura 1 y en la SEC. ID. N° 1. Para los análogos hiperglicosilados los pesos moleculares son ajustados dependiendo de los cambios aminoacídicos en los residuos 1-165 de la Figura 1 y de la SEC. ID. N° 1.

5 La frecuencia en la dosificación para un análogo hiperglicosilado variará dependiendo de la dolencia en tratamiento y del hematocrito diana pero, por lo general, será inferior a tres veces por semana. La frecuencia en la dosificación será de alrededor de dos veces por semana, alrededor de una vez por semana. La frecuencia en la dosificación puede ser también inferior a alrededor de una vez por semana, por ejemplo alrededor de una vez cada dos semanas (alrededor de una vez cada 14 días), una vez al mes o una vez cada dos meses. Se entiende que las frecuencias en la dosificación
10 utilizadas realmente pueden variar algo en relación con las frecuencias aquí reveladas, debido a variaciones en las respuestas de los distintos individuos a los análogos de la Epo; se pretende que el término “alrededor” refleje tales variaciones.

15 Conforme es utilizado aquí, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de un análogo hiperglicosilado que proporcione una elevación en el hematocrito hasta alcanzar un hematocrito diana, o un rango de hematocrito diana que proporcione beneficios a un paciente o, alternativamente, mantenga a un paciente en un hematocrito diana, o dentro de un rango de hematocrito diana. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de un número de factores, incluyendo el estado físico general del paciente, la gravedad y causa subyacente de la anemia y el hematocrito diana definitivo para el paciente individual. Un hematocrito diana es usualmente, al menos,
20 de alrededor del 30% o en un rango del 30% al 38%, preferiblemente por encima del 38% y, más preferiblemente, del 40% al 45%. Las pautas generales en relación con rangos de hematocrito diana para la rHuEpo se encuentran también en las especificaciones del EPOGEN® de fecha 23/12/96 y son del 30% al 36% o, alternativamente, del 32% al 38%, conforme a lo indicado en las mismas. Se entiende que tales dianas variarán de un individuo a otro, de tal forma que el juicio del médico puede ser apropiado a la hora de determinar un hematocrito diana real para cualquier
25 paciente dado. No obstante, el determinar un hematocrito diana se encuentra dentro del grado de conocimiento en este campo.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de las presentes composiciones puede ser determinada fácilmente por un experto en este campo. El Ejemplo 6 expone un protocolo clínico que tiene como uno de sus objetivos el determinar
30 una cantidad terapéuticamente efectiva del análogo N47, tanto con una dosificación de una vez por semana como de tres veces por semana. Un rango de dosificación de administración una vez por semana es de alrededor de 0,075 a alrededor de 4,5 μg de péptido de eritropoyetina por kg por dosis. Un rango de dosificación de administración de tres veces por semana es de 0,025 a 1,5 μg de péptido de eritropoyetina por kg por dosis. Este rango de dosificación puede ser utilizado con otros análogos hiperglicosilados de la Epo, siendo algo rutinario para una persona experta en este
35 campo cualquier ajuste en el rango de dosificación.

Una ventaja significativa de la presente invención es la habilidad para correlacionar el grado de hiperglicosilación tanto con una cantidad de dosificación como con un intervalo de dosificación, lo cual permitiría “adaptar” un análogo de la Epo a una dosificación o calendario de dosificación dados. Basándose en el incremento de las actividades *in vivo*
40 de los análogos de la Epo que poseen una, dos o tres cadenas adicionales de carbohidratos, conforme es mostrado en la Figura 3, el médico encargado del tratamiento puede seleccionar un análogo que sea adecuado y conveniente para la dolencia anémica en tratamiento. Por ejemplo, en pacientes que muestran anemia aguda y que necesitan una dosis efectiva grande, o en pacientes que requieren un tratamiento a largo plazo, puede ser preferida la administración de un análogo hiperglicosilado con tres o cuatro -o incluso más- cadenas adicionales de carbohidratos. Para otros
45 pacientes que experimentan una anemia menos grave o que requieren de un tratamiento durante un período de tiempo relativamente corto, puede ser preferido un análogo con una o dos cadenas adicionales de carbohidratos. Los análogos de la presente invención proporcionan al médico una considerable flexibilidad a la hora de prevenir y tratar la anemia que puede ser el resultado de una variedad de dolencias subyacentes.

50 La invención proporciona también la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro, con el fin de mantener una eritropoyesis elevada durante la terapia. La cantidad a ser facilitada puede ser determinada fácilmente por un experto en este campo, basándose en la terapia con rHuEpo.

La presente invención puede ser utilizada para estimular la producción de células rojas sanguíneas y para prevenir
55 y tratar la anemia. Entre las dolencias tratables por medio de la presente invención se encuentran incluidas la anemia asociada a una disminución o pérdida de la función renal (fallo renal crónico), la anemia asociada a terapia mielo-supresiva, como los fármacos quimioterapéuticos o antivirales (como el AZT), la anemia asociada a la progresión de cánceres no mieloides, la anemia asociada a infecciones virales (tales como el VIH) y la anemia debida a enfermedad crónica. También son tratables las dolencias que pueden llevar a un individuo de otra manera sano a tener anemia,
60 tales como una pérdida prevista de sangre durante cirugía. Por lo general, cualquier dolencia tratable con la rHuEpo puede ser tratada también con los análogos hiperglicosilados de la Epo de la invención.

Son descritas también composiciones farmacéuticas comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo hiperglicosilado de la Epo junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsificador, preservante y/o ad-
65 yuvante farmacéuticamente aceptable. La composición será adecuada para un calendario de dosificación inferior a tres veces por semana. La composición puede encontrarse en forma líquida o liofilizada y comprende un diluyente (tampones Tris, citrato, acetato o fosfato) con distintos valores de pH y fuerzas iónicas, un solubilizador como el Tween o el polisorbato, portadores como la albúmina sérica humana o la gelatina, preservantes tales como el timerosal, los parabe-

nos, el cloruro de benzalconio o el alcohol bencílico, antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el metabisulfito de sodio, y otros componentes tales como la lisina o la glicina. La selección de una composición determinada dependerá de un número de factores, incluyendo la dolencia a ser tratada, la ruta de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Un examen más extenso de los componentes adecuados para las composiciones farmacéuticas se puede encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18 edic. A.R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980). En una realización preferida, los análogos hiperglicosilados de la Epo de la invención son formulados en forma líquida en una solución isotónica tamponada con cloruro sódico/citrato sódico conteniendo albúmina humana y, opcionalmente, conteniendo alcohol bencílico como preservante. Las composiciones contienen preferiblemente análogos con una, dos, tres, cuatro, o más cadenas adicionales de carbohidratos.

Las composiciones de la invención son administradas preferiblemente por medio de inyección, subcutánea o intravenosa. La ruta de administración eventualmente escogida dependerá de un número de factores y puede ser determinada por un experto en este campo.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos con el fin de ilustrar en mayor medida la invención, pero no han de ser interpretados como limitadores del ámbito de la misma.

Ejemplo 1

Construcción de Análogos Hiperglicosilados de la Epo

Construcción de ADNcs codificando para Análogos Hiperglicosilados de la Epo

Fueron preparados análogos de la Epo por medio de mutagénesis *in vitro* utilizando varios métodos diferentes. Los análogos N49 y N50 fueron construidos conforme es descrito en WO95/05465. Los análogos fueron construidos también por medio de variaciones de métodos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con solapamiento. El procedimiento básico incluyó dos fases sucesivas. En la primera fase fueron realizadas dos reacciones (PCR1 y PCR2) con ADN templete de la Epo, o del análogo de la Epo, utilizando un total de cuatro oligonucleótidos: un iniciador (delantero "forward") 5', un iniciador mutagénico reverso, un iniciador mutagénico delantero (usualmente complementario del iniciador mutagénico reverso) y un iniciador (opuesto "reverse") 3'. Los iniciadores mutagénicos contenían los cambios nucleotídicos deseados, así como de 6 a 14 nucleótidos con coincidencia exacta en cada lado de estos cambios. La PCR1 utilizó el iniciador (delantero) 5' y el iniciador mutagénico reverso. La PCR2 utilizó el iniciador (opuesto) 3' y el iniciador mutagénico delantero. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa. Fueron separadas del gel pequeñas porciones de agarosa conteniendo fragmentos de ADN de tamaño adecuado. Los fragmentos de ADN procedentes de la PCR1 y de la PCR2 fueron combinados entre sí y fue llevada a cabo una tercera reacción PCR utilizando únicamente los iniciadores delantero 5' y opuesto 3'. De esta forma fue amplificado un segmento de ADN completo conteniendo las mutaciones deseadas. En algunos casos fueron combinadas dos o tres mutaciones por medio de la introducción de una nueva sustitución en el ADN que ya contenía un cambio, utilizando el mismo proceso PCR. Para construir estos análogos con múltiples sitios de glicosilación fueron utilizados análogos con un único sitio, con dos sitios o con tres sitios de glicosilación (producidos según es descrito más arriba) como un templete para PCR, y fue introducido un sitio adicional de glicosilación por medio de mutagénesis dirigida a sitio con los iniciadores adecuados.

Los análogos de la Epo N51, N52 y N53 fueron construidos por medio del método 1 de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con solapamiento. Fue introducido en cada caso un sitio adicional de N-glicosilación. El N56 añadió un sitio de glicosilación (N114 T116) a la secuencia original de rHuEpo al utilizar Epo pDSR α 2 como templete de PCR; el N51 añadió un sitio de glicosilación ligada a O (Thr125) a la Epo N47 al utilizar el templete Epo N47 Epo pDSR α 2 (Asn30, Thr32, Val87, Asn88, Thr90); y el análogo N59 añadió un sitio de glicosilación (Asn53) al análogo N47 al utilizar el templete Epo N47 pDSR α 2.

Las reacciones en cadena de la polimerasa para el método 1 fueron realizadas utilizando un protocolo adaptado de Cheng *et al.*, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5695 (1994)). El iniciador (opuesto) 3' contenía secuencias que introdujeron un codón terminador seguido de un sitio de restricción Xba I:

ATCTAGAAGTTGCTCTCTGGACAGTTCCT

(SEC. ID. N° 2).

El iniciador de reacción delantero 5':

GAAGCTTGCGCCACCATGGGGGTGCACGAATG (SEC. ID. N° 3) tenía un sitio de restricción Hind III seguido de una secuencia Kozak aguas arriba del codón iniciador (ATG) de la Epo. La mezcla de reacción usual de PCR contenía: 4 μ l de cada uno de los iniciadores, delantero y opuesto (5 pmol/ μ l), 1 μ l de templete (25 ng), 10 μ l de tampón LP 5X (100 mM de Tricina pH 8,7/25% glicerol/425 mM de KOAc), 10 μ l de dNTP stock (1 mM de cada uno de ellos: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,8 μ l de rTth polimerasa (Perkin Elmer; 2,5 U/ μ l), y 2 μ l de Vent polimerasa (NEB; 0,01 U/ μ l después de dilución fresca 1:100 en tampón LP 1X). Fue añadido H₂O para que el volumen final fuera de 50 μ l. Todos los componentes fueron añadidos juntos en el orden mostrado y fue comenzada la PCR cuando la temperatura

ES 2 283 139 T3

5 durante el primer ciclo se encontraba por encima de los 60°C, al añadir 1 µl de 50 mM de MgOAc. Las condiciones usuales de la reacción fueron: 2 ciclos de 94°C, 10 seg/ 50°C, 1 min/ 68°C, 5 min, seguido de 25 ciclos de 94°C, 10 seg/ 55°C, 1 min/ 68°C, 5 min. Los fragmentos amplificados fueron separados por medio de electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de ADN de tamaño correcto fue purificado utilizando un kit GeneClean™ y los procedimientos
10 facilitados por el fabricante (Bio 101, Inc.). El ADN purificado fue digerido con Hind III y Xba I, a continuación fue purificado de nuevo utilizando el kit GeneClean™. Después, el fragmento fue ligado al vector pDSRα2 cortado con Hind III y Xba I. El ADN ligado fue precipitado con 2 volúmenes de etanol en 0,3M de NaOAc, pH 5.2, en presencia de ARNt portador, y fue transformado en *E. Coli*. Los análogos de la Epo fueron sometidos a escrutinio por medio de digesto de restricción en preparados de ADN mini. Fueron preparados a continuación plásmidos procedentes de clones positivos y el inserto fue secuenciado para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas y para asegurar que no fueran introducidos cambios aminoacídicos adicionales.

15 Los análogos N54 y N61 fueron construidos utilizando el método 2 de estrategia de PCR con solapamiento. El iniciador (opuesto) 3' contenía secuencias que introdujeron un codón terminador seguido de un sitio de restricción Xba I:

GATCCTCTAGAGTTGCTCTCTGGACAG

(SEC. ID. N° 4).

20 El iniciador de reacción delantero 5':

CAACAAGCTTGCGCCGCCATGGGGG (SEC. ID. N° 5) tenía un sitio de restricción Hind III seguido de una secuencia Kozak aguas arriba del codón iniciador (ATG) de la Epo. Fue llevada a cabo una estrategia de PCR de alta fidelidad utilizando ADN Polimerasa ULTma Perking Elmer y reactivos acompañantes; 10 µl de tampón PCR 10X, 3 µl de 1 mM de dNTPs, 5 pmol de cada iniciador y agua en un volumen final de 100 µl. Fueron añadidas 0,5 unidades de polimerasa ULTma después de que la mezcla de la PCR alcanzara los 94°C. A continuación, las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo durante 5 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos. Fueron realizados 25 ciclos subsiguientes a 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos.
30 Fueron cortadas bandas del producto de tamaños correctos procedentes de un gel de agarosa después de tener lugar la electroforesis.

Los productos resultantes de la PCR para cada análogo fueron limpiados utilizando el kit Qiagen gel extraction. El ADN purificado fue digerido en un digesto de restricción de 100 µl con las enzimas de restricción Hind III y Xba I (Boehringer Mannheim) a 37°C durante 1 hora. Los digestos fueron purificados de nuevo en gel y el fragmento digerido fue ligado a continuación al vector pDSRα2 digerido con Hind III y Xba I.
35

El ADN ligado fue precipitado con 2 volúmenes de etanol en 0,3 M de NaOAc, pH 5.2, en presencia de ARNt portador y transformado en *E. Coli*. Los análogos de la Epo fueron sometidos inicialmente a escrutinio por medio de PCR de colonias, con el fin de identificar clones conteniendo el inserto de ADN de tamaño y tipo correctos. Con este procedimiento, células conteniendo plásmidos fueron colocadas en tubos de PCR en presencia de los iniciadores delantero y opuesto de la Epo. A continuación, la mezcla fue sometida a PCR utilizando las condiciones de reacción anteriormente descritas. Después, los plásmidos procedentes de clones positivos fueron preparados y el inserto del análogo de la Epo fue secuenciado para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas y para asegurar que no fueran introducidos cambios aminoacídicos adicionales.
45

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 283 139 T3

TABLA 1

Análogos de la eritropoyetina poseyendo sitios para cadenas de carbohidratos ligadas a N

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

Análisis de la adición de carbohidratos

Los constructos para los análogos hiperglicosilados de la Epo que fueron insertados dentro del vector de expresión pDSR α 2 fueron transfectados en células COS. Los sobrenadantes procedentes de las células COS transfectadas fueron analizados por medio de western blot, con el fin de determinar si el análogo de la Epo expresado y secretado contenía carbohidratos adicionales. Las muestras fueron cargadas directamente en pocillos de geles SDS-PAGE, a continuación analizadas por medio de inmunoblot utilizando el anticuerpo monoclonal 9G8A (Elliott *et al.* (1996) Blood 87:p2714). Fueron comparadas las movilidades de las muestras del análogo con las de las muestras conteniendo rHuEpo. La Figura 1 muestra una disminución en la movilidad de los análogos N53 y N61 si se compara con los análogos N4 (cuatro cadenas de carbohidratos) y N47 (cinco cadenas de carbohidratos). La movilidad es consistente con la presencia de seis cadenas de carbohidratos para el análogo N53 y siete cadenas de carbohidratos para el análogo N61. Los datos de todos los análogos hiperglicosilados son mostrados en la Tabla 2.

Bioensayos in vitro

Medios acondicionados por células COS o CHO expresando rHuEpo o análogos fueron sometidos a ensayo para determinar la estimulación de la captación de 3H-timidina por las células UT7-Epo (Komatsu *et al.*, Blood 82, 456). Las células UT7-Epo responden a la Epo y expresan receptores para la Epo humana sobre su superficie celular. Células UT7-Epo fueron cultivadas en medio de Crecimiento (Medio Dulbecco Modificado por Iscove 1X con L-glutamina, 25 mM de tampón HEPES y 3024 mg/L de bicarbonato sódico, pero sin alfa-tioglicerol o beta-mercaptoetanol (GIBCO) /10% v/v Suero Bovino Fetal/1% v/v solución de L-glutamina-Penicilina-Streptomycin (Irvine Scientific)/1 Unidad/mL de rHuEpo) hasta conseguir aproximadamente 3x10⁵ células/mL. Las células fueron recolectadas por me-

ES 2 283 139 T3

dio de centrifugado (aprox. 500xG), lavadas dos veces con solución salina tamponada con fosfato y resuspendidas en una concentración de 5×10^4 células/mL en medio de Ensayo (Medio RPMI 1640 1X, sin L-glutamina (Gibco)/1% L-glutamina/4% suero bovino fetal). Las muestras de la prueba o de la Epo estándar (rHuEpo), 100 μ L diluidas en medio de ensayo al menos 5 veces, fueron añadidas a los pocillos en una placa de microtítulo de 96 pocillos. A continuación, fueron añadidas 50 μ L de célula suspendidas (5000 células/pocillo) y las placas fueron incubadas en un incubador humidificado a 37°C y a un 5% de CO₂. Después de 72 horas, fueron añadidas 50 μ L de metil-3H-Timidina (1 mCi/mL; 20 Ci/mMol) con dilución 1:100 en medio de ensayo. Las células fueron incubadas durante 4 horas más a 37°C y a un 5% de CO₂. Las células marcadas fueron recolectadas en filtros de fibra de vidrio, lavadas con agua desionizada seguido de 2-propanol, secadas y contadas. La actividad fue determinada comparando la respuesta determinada para cada análogo con la de la rHuEpo estándar. La actividad biológica específica fue determinada a continuación por medio de la división de la actividad *in vitro* entre la concentración de cada análogo, según es determinado en el inmunoensayo (Elliott *et al.* (1996) Blood 87:p2714). Los resultados son mostrados en la Tabla 2.

TABLA 2

ANÁLOGO	Número de Cadenas de Carbohidratos ligadas a N	Actividad In Vitro **
rHuEpo	3	+++
N49	4	+++
N50	4	+++
N51	5*	+++
N52	3 – 4	+++
N53	6	++
N54	4	NT
N55	4	+++
N56	4	+++
N57	3 – 4	+++
N58	4	+++
N59	5	++
N60	4 – 5	+++
N61	6 -7	NT

* contiene 1-2 cadenas ligadas a O

** La actividad in vitro es relativa a la actividad rHuEpo

+++ La actividad es equivalente a la de rHuEpo

++ La actividad es 25-75% de la rHuEpo

NT No testado

Ejemplo 2

Preparación de Eritropoyetina Humana Recombinante y de Análogos Hiperglicosilados de la Eritropoyetina

La eritropoyetina humana recombinante (rHuEpo) utilizada para los experimentos aquí descritos fue expresada por células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un plásmido recombinante portando el gen de la eritropoyetina humana. El producto recombinante fue recuperado del medio condicionado y fue purificado esencialmente conforme es descrito por Lai *et al. supra*. El preparado de la rHuEpo resultante posee predominantemente las isoformas de 9 a 14 ácidos siálicos, conforme es determinado por medio de enfoque isoelectrónico.

Los análogos hiperglicosilados recombinantes de la eritropoyetina fueron expresados en células CHO transfectadas con un plásmido recombinante portando el gen del análogo de la Epo, conforme es descrito en WO91/05867

ES 2 283 139 T3

y WO94/09257, incorporados aquí a modo de referencia. Los análogos hiperglicosilados fueron purificados de los sobrenadantes del cultivo, conforme es descrito más abajo.

Concentración y diafiltrado del medio condicionado

5 Fue recolectado medio condicionado (libre de suero) procedente de tres recolecciones sucesivas (5-8 días cada una) de la línea celular CHO transfectada, fue filtrado a través de un filtro de 0,45 μm , concentrado alrededor de treinta veces y diafiltrado en 10 mM de Tris, 20 μm de CuSO_4 , pH 7.0, utilizando un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial (Millipore) con una membrana de corte de peso molecular 10.000. El medio diafiltrado (DFM) fue filtrado 10 (0,45 μm) una segunda vez y fue almacenado a -20°C hasta su utilización para purificación.

Purificación

15 Todos los procedimientos fueron llevados a cabo a una temperatura de 2 a 8°C .

Cromatografía de intercambio aniónico (10)

El DFM clarificado fue aplicado a una columna Q-Sefarosa de Flujo Rápido (Pharmacia, 6 cm x 18 cm) equilibrada en 10 mM de bis Tris propano (BTP), pH 7.0 y lavada con dos volúmenes de columna de 10 mM de BTP para eluir 20 todas las especies no unidas. Fueron utilizados los siguientes gradientes dependiendo de si el análogo hiperglicosilado poseía cuatro, cinco o seis cadenas de carbohidratos ligadas a N. Todos los tampones utilizados en esta fase contienen 1 mM de glicina, 20 μm de CuSO_4 , 6 M de urea, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepstatina. Para análogos con 25 cuatro cadenas de carbohidratos ligadas a N el gradiente fue de 10 mM de ácido acético, 0,1 mM de NaCl hasta 500 mM de ácido acético, 5 mM de NaCl en 49 volúmenes de columna, con un volumen de dos columnas mantenido en condiciones de alta salinidad. Para análogos con cinco cadenas de carbohidratos ligadas a N el gradiente fue de 0,7 M 25 de ácido acético, 7 mM de NaCl hasta 1,0 M de ácido acético, 12 mM de NaCl en 30 volúmenes de columna, con un volumen de dos columnas mantenido en condiciones de alta salinidad. Para análogos con seis cadenas de carbohidratos ligadas a N el gradiente fue de 1,0 M de ácido acético, 10 mM de NaCl hasta 1,5 M de ácido acético, 20 mM de NaCl 30 en 50 volúmenes de columna, con un volumen de dos columnas mantenido en condiciones de alta salinidad. Después de realizado el gradiente, la columna fue lavada con dos volúmenes de columna de 10 mM de BTP, pH 7.0 y la fracción alta de isoforma fue eluída con 0,6 M de NaCl, 100 mM de BTP, pH 7.0.

Cromatografía de Fase Reversa (C4)

35 La tira con alta salinidad procedente de la columna de Q-Sefarosa (1Q) fue aplicada a una columna de fase reversa Vydac C4 (30 μ de partícula, 4 cm x 18 cm), equilibrada en etanol 20%, 10 mM de BTP, pH 7.0 y eluída de la columna con un gradiente de volumen de treinta columnas, hasta etanol 94% tamponado en 10 mM de BTP, pH 7.0. El pico de 40 producto reunido, eluyendo en aproximadamente etanol 60%, fue diluido con cuatro volúmenes de 10 mM de BTP, pH 7.0, con el fin de minimizar la posibilidad de agregación en presencia del etanol.

Cromatografía de Intercambio Aniónico (20)

El eluído diluido procedente de la columna de fase reversa fue aplicado a una segunda columna Q-Sefarosa de Flujo Rápido (Pharmacia, 3 cm x 9 cm), equilibrada con 10 mM de BTP, pH 7.0. La columna fue lavada con tampón 45 equilibrante y el análogo hiperglicosilado de la Epo fue eluído con 0,6 M de cloruro de sodio, 20 mM de citrato de sodio, pH 6.0.

La proteína purificada fue intercambiada en 20 mM de NaPO_4 , pH 6.0, 140 mM de NaCl por medio de centricon (corte de peso molecular 10.000), seguido de su paso a través de un filtro de 0,2 μm y de almacenamiento a una 50 temperatura de 2 a 8°C .

Ejemplo 3

Bioactividad *in vivo* de la rHuEpo y de los Análogos de la rHuEpo conteniendo cuatro, cinco y seis Cadenas de Carbohidratos ligadas a N

La actividad *in vivo* de análogos de la Epo conteniendo cuatro, cinco y seis cadenas de carbohidratos ligadas a N fue comparada con la de la rHuEpo en el bioensayo del ratón policitémico exhipóxico. Este ensayo cuantifica 60 la incorporación de ^{59}Fe a las células rojas sanguíneas recién sintetizadas como una medida del incremento de la eritropoyesis en ratones, en respuesta a una muestra prueba administrada exógenamente. El ensayo, llevado a cabo conforme es descrito más abajo, es una modificación del método de Cotes y Bangham (Nature 191, 1065 (1961)).

En este ensayo ratones hembra BDF_1 son precondicionados primeramente por medio de la exposición a condiciones de bajo nivel de oxígeno en una cámara hipobárica (0,4-0,5 atm.) durante aproximadamente 18 horas al día durante 65 14 días. Para compensar las condiciones de bajo nivel de oxígeno los ratones responden estimulando la eritropoyesis con el fin de incrementar el número de células rojas sanguíneas y, de esta forma, la capacidad relativa de transportar oxígeno. Después de terminar la exposición hipobárica final, se permitió que los ratones permanecieran a presión ambiental durante aproximadamente 72 horas antes de la administración de las muestras de la prueba, a través de in-

yección intraperitoneal. A presión ambiental los ratones son relativamente policitémicos y responden disminuyendo la producción de eritropoyetina endógena y el ritmo de eritropoyesis. Cinco días después de la administración de la muestra son inyectados intravenosamente en la vena de la cola de 0,2 a 0,3 μCi de $^{59}\text{FeCl}_3$ en 0,2 mL. Cuarenta y ocho horas después los animales son sacrificados y es determinado el incremento en la eritropoyesis producido por las muestras de la prueba, por medio de la medición de la cantidad de ^{59}Fe incorporado a una muestra de 0,5 mL de sangre completa.

Es mostrado en la Figura 3 un ejemplo de los resultados obtenidos cuando fueron testados en este ensayo la rHuEpo y cinco análogos diferentes de la Epo, conteniendo cuatro, cinco o seis cadenas de carbohidratos ligadas a N. Cada muestra fue sometida a ensayo en seis o siete diluciones diferentes dentro de un rango de concentración adecuado. Todas las muestras fueron diluidas en solución salina tamponada con fosfato conteniendo albúmina de suero bovino 0,5%, y fueron administrados 0,4 mL de cada dilución a cinco ratones precondicionados. Cuarenta y ocho horas después de la administración del ^{59}Fe fue medida la cantidad incorporada en 0,5 mL de sangre por medio de conteo gamma. Los resultados para cada una de las muestras son ploteados como el porcentaje de ^{59}Fe incorporado contra el log de las dosis administradas.

Conforme es mostrado en la Figura 3, los cinco análogos hiperglicosilados de la Epo testados en este ensayo fueron más potentes que la rHuEpo. Además, la potencia de cada análogo dependió directamente del número de cadenas de carbohidratos ligadas a N, siendo los análogos con un incremento en el número de cadenas de carbohidratos los que mostraron la mayor actividad. De esta forma, el análogo N53 -el cual contiene seis cadenas de carbohidratos ligadas a N- fue el análogo más potente. El análogo N47, el cual contiene cinco cadenas de carbohidratos ligadas a N, fue a su vez más potente que los análogos conteniendo cuatro cadenas ligadas a N. Las potencias de los tres análogos conteniendo cuatro cadenas de carbohidratos ligadas a N (N4, N18 y N50) fueron aproximadamente iguales entre sí y fueron mayores que las de la rHuEpo.

En este experimento las dosis de la rHuEpo y de los análogos conteniendo cuatro, cinco o seis cadenas de carbohidratos ligadas a N requeridas para producir una incorporación del 40% de ^{59}Fe fueron de 10.700 ng, 640 ng, 140 ng y 38 ng, respectivamente. Basándose en la cantidad de material requerido para producir este nivel de eritropoyesis, los análogos de la Epo conteniendo cuatro, cinco o seis cadenas de carbohidratos ligadas a N son 17 veces, 77 veces y 280 veces más potentes que la rHuEpo.

Ejemplo 4

IV Farmacocinéticas de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 en Ratas y Perros Beagle

Fueron realizados dos estudios por separado en ratas y perros con el fin de comparar los parámetros farmacocinéticos del análogo de la Epo N47 y de la rHuEpo.

En los estudios con ratas, fue inyectado intravenosamente 1 μCi ($\sim 0,1 \mu\text{g}$ de péptido/kg) del análogo de la Epo N47- ^{125}I o de la eritropoyetina humana recombinante ^{125}I (Amersham) dentro de una cánula carotídea implantada quirúrgicamente en ratas macho normales Sprague-Dawley pesando entre 314 y 363 g. En distintos momentos después de su administración fueron recolectados 0,3 mL de sangre y el suero fue preparado por medio de centrifugado. Fue determinado entonces el nivel de la rHuEpo ^{125}I o del análogo de la Epo N47 ^{125}I en 0,1 mL de cada muestra de suero, seguido de un incubado durante la noche a 4°C con etanol 90%. La proteína precipitada con el etanol en cada muestra de suero fue recolectada por medio de centrifugado y fue contada la radioactividad en un contador gamma. Son mostradas en la Figura 4 la concentración de suero resultante contra las curvas farmacocinéticas en el tiempo. Cada punto representa una media de grupo de cinco ratas en el grupo del análogo N47 y de seis ratas en el grupo de la rHuEpo. Fueron determinados para cada rata los parámetros farmacocinéticos utilizando el análisis de regresión no lineal PCNONLIN 4.0 (Statistical Consultants, 1992) y se realizó un promedio con los resultados de cada grupo. Los resultados son mostrados en la Tabla 3.

TABLA 3

Comparación de IV Parámetros Farmacocinéticos del N47 y de la rHuEpo en Ratas

Muestra de la Prueba	Vida media		V_a (mL/kg)	Desaparición en suero (mL/kg-hora)
	α (horas)	β (horas)		
N47 (n = 5 ratas)	0,57±0,49	6,9±0,3	33±5	4,8±1,2
rHuEpo (n=6 ratas)	0,18±0,03	2,5±0,2	36±6	17,7±3,4

a Los resultados son presentados como el promedio del grupo \pm SD para cinco ratas en el grupo del N47 y para seis ratas en el grupo de la rHuEpo.

ES 2 283 139 T3

En los estudios con perros, perros Beagle normales pesando entre 7,8 y 9,5 kg recibieron una inyección intravenosa en bolo de $\sim 29\mu\text{Ci}$ de rHuEpo ^{125}I o de N47 ^{125}I ($\sim 0,1\mu\text{g}$ del péptido/kg) dentro de la vena cefálica. En distintos momentos, a lo largo de 24 horas después de la administración, fueron recogidos aproximadamente de 1 a 2 mL de sangre y fue preparado el suero. Fue determinada la concentración de la rHuEpo ^{125}I y del N47 ^{125}I en 0,1 mL de suero, y fueron calculados los parámetros farmacocinéticos conforme es descrito más arriba. La concentración de suero contra las curvas farmacocinéticas en el tiempo para los estudios del perro son mostradas en la Figura 5. Los puntos de tiempo son las medias por grupo de dos animales en cada grupo. Los parámetros farmacocinéticos son resumidos en la Tabla 4.

TABLA 4

Comparación de IV Parámetros Farmacocinéticos del N47 y de la rHuEpo en Perros

Muestra de la Prueba	Vida media		V_a (mL/kg)	Desaparición en suero (mL/kg-hora)
	α (horas)	β (horas)		
N47	0,34	25,0	55,9	2,4
rHuEpo	0,40	7,2	60,8	8,4

a Los resultados presentados son los parámetros promedio para los dos perros de cada grupo.

En ambos estudios, el de la rata y el del perro, la rHuEpo y el análogo de la Epo N47 exhibieron una desaparición en suero bifásica. La desaparición en las ratas fue alrededor de 3,7 veces más rápida para la rHuEpo que para el análogo de la Epo N47, y la vida media β fue alrededor de 2,8 veces más larga para el análogo de la Epo N47 que para la rHuEpo. Los parámetros farmacocinéticos en los estudios con perro fueron consistentes por lo general con los observados en rata. En los perros la desaparición de la rHuEpo fue 3,5 veces más rápida que la del análogo de la Epo N47, y la vida media β fue 3,5 veces más larga para el análogo de la Epo N47 comparada con la de la rHuEpo.

Ejemplo 5

Respuesta a dosis del hematocrito después de la administración de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47

Estudios de Respuesta a dosis del Hematocrito tres veces por semana (TIW)

Fueron comparados los efectos biológicos *in vivo* de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 en ratones normales después de la administración de un rango de dosis, intraperitonealmente o por medio de inyección intravenosa, tres veces por semana a lo largo de hasta seis semanas. Las determinaciones del hematocrito fueron realizadas dos veces por semana por medio de sangrado retroorbital.

Ratones normales CD1 pesando aproximadamente 30 g (10-13 ratones por grupo) fueron inyectados intraperitonealmente tres veces por semana durante un total de seis semanas con rHuEpo (sobre el rango de dosificación de $0,625-10\mu\text{g}$ de péptido/kg/dosis), con análogo de la Epo N47 (sobre el rango de dosificación de $0,156-1,25\mu\text{g}$ de péptido/kg/dosis) o con vehículo de control. El vehículo de control y diluyente para los distintos preparados de dosificación de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 fue solución salina tamponada con fosfato (PBS), conteniendo 0,025% de albúmina sérica de ratón. Fueron determinados como base los hematocritos de todos los ratones y, dos veces por semana después de esto, por medio de sangrados retroorbitales. Al finalizar el experimento fue recolectado el suero procedente de todos los animales y fue sometido a análisis para determinar los anticuerpos al producto inyectado por medio de un ensayo de radioinmunoprecipitación de solución. Los datos del hematocrito procedentes de animales a los que se juzgó negativos para neutralizar anticuerpos fueron utilizados para análisis subsiguiente.

Conforme es mostrado en la Figura 6 tanto la rHuEpo como el análogo de la Epo N47 producen un incremento en el hematocrito dependiendo de la dosis en el estudio de seis semanas, aunque el análogo N47 promueve un incremento mayor en el hematocrito si se compara con la rHuEpo en una concentración dada. En este experimento el análogo de la Epo N47 es alrededor de 3 a 4 veces más potente cuando es dosificado tres veces por semana por medio de inyección intraperitoneal.

Los estudios de respuesta a dosis de la rHuEpo y del análogo N47 fueron llevados a cabo por medio de inyección intravenosa tres veces por semana, utilizando procedimientos similares a los de la inyección intraperitoneal. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la administración intraperitoneal y, en particular, los estudios confirmaron adicionalmente que el análogo de la Epo N47 poseía una potencia mayor que la rHuEpo cuando era administrado tres veces por semana.

ES 2 283 139 T3

Con el fin de comparar y cuantificar mejor la actividad biológica de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 a la hora de elevar el hematocrito de ratones normales, fueron analizados también los resultados de los experimentos por medio de diagramas de potencia relativa. En cada experimento fue determinada la actividad de la rHuEpo o del análogo N47 en cada dosificación sumando el incremento en el hematocrito a lo largo de los primeros 38 días del estudio por medio de suma trapezoidal, con el fin de obtener el área bajo la curva (AUC). A continuación, éste fue ploteado contra el log de dosificación en μg de péptido/kg/semana. La diferencia de potencia entre los compuestos administrados a través de la misma o de diferentes rutas de administración o frecuencias en la dosificación, puede ser determinada midiendo la distancia entre las líneas relevantes de log-respuesta a dosis. La Figura 7 resume los datos de potencia relativa para todos los experimentos realizados comparando la actividad de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47, administrados a través de dos rutas diferentes (intraperitoneal e intravenosa), y con dos calendarios de dosificación diferentes.

Conforme es mostrado en la Figura 7, cuando es administrado tres veces por semana el análogo de la Epo N47 posee la misma potencia cuando es administrado por ruta intravenosa o por la intraperitoneal, y fue 3,6 veces más potente que la rHuEpo inyectado intraperitonealmente tres veces por semana.

Estudios de Respuesta a dosis del Hematocrito una vez por semana (OW)

Fueron realizadas comparaciones de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 a la hora de elevar el hematocrito en ratones normales con una dosificación de una vez por semana, por medio de ruta de administración intraperitoneal o intravenosa, durante seis semanas.

Ratones normales CD1 pesando aproximadamente 30 g (8-10 ratones por grupo) fueron inyectados intravenosamente una vez por semana durante un total de seis semanas con concentraciones variables de rHuEpo o del análogo de la Epo N47, preparados en PBS conteniendo 0,025% de albúmina sérica de ratón, o con vehículo de control (PBS con 0,025% de albúmina sérica de ratón). La dosis del análogo varió de 6,25 a 25 μg de péptido/kg/dosis y la dosis de rHuEpo varió de 25 a 200 μg /kg/dosis. Fueron determinados como base los hematocritos de todos los ratones y, dos veces por semana después de ello, por medio de sangrados retrorbitales. Al finalizar el experimento fue recolectado el suero procedente de todos los animales y fue sometido a ensayo para determinar los anticuerpos al producto inyectado por medio de una radioinmunoprecipitación de solución. Los datos procedentes de los animales a los que se juzgó negativos para neutralizar anticuerpos fueron utilizados para análisis subsiguiente.

Conforme es mostrado en la Figura 8, mientras que tanto la rHuEpo como el análogo N47 pueden elevar el hematocrito de ratones normales cuando son dosificados una vez por semana, la dosis requerida de rHuEpo para producir una respuesta fue significativamente mayor que la requerida del análogo N47. Por ejemplo, en este experimento 25 μg de péptido/kg/semana de N47 elevaron el hematocrito de ratones en 41,2 puntos en seis semanas, mientras que la misma dosis de rHuEpo produjo únicamente una elevación del hematocrito de 12,5 puntos.

Los estudios de respuesta a dosis de la rHuEpo y del análogo N47 fueron realizados por medio de inyección intraperitoneal una vez por semana, utilizando procedimientos similares a los descritos más arriba. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los resultados para la administración intravenosa y confirmaron adicionalmente la mayor potencia del análogo N47 en comparación con la rHuEpo cuando son administrados una vez por semana.

Para cuantificar la diferencia de actividad entre la rHuEpo y el análogo N47 cuando cada uno de ellos es dosificado una vez por semana, fueron generados diagramas de potencia relativa con todos los experimentos relevantes, según es descrito más arriba. Conforme es mostrado en la Figura 7, cuando es administrado una vez por semana el análogo N47 posee la misma potencia cuando es inyectado por ruta intravenosa que cuando lo es por ruta intraperitoneal. El análogo 47 es aproximadamente 14 veces más potente que la rHuEpo cuando cada uno de ellos es administrado una vez por semana.

Además, los diagramas de respuesta a dosis-log en la Figura 6 ilustran también lo siguiente: (1) Una dosis dada del análogo N47 administrada una vez por semana (QW) es aproximadamente tan efectiva como la misma dosis semanal total de rHuEpo facilitada dividida en tres dosis (TIW); (2) una dosis dada de la rHuEpo administrada una vez por semana (QW) es únicamente aproximadamente un 2% tan efectiva como la misma dosis total semanal del análogo N47 facilitada dividida en tres dosis (TIW); (3) el análogo N47 es aproximadamente 4 veces más potente en ratones cuando es administrado TIW en comparación con QW.

Estudios de Respuesta a Dosis del Hematocrito una vez cada dos Semanas (EOW)

Fueron realizados también experimentos para determinar la habilidad del análogo N47 para elevar el hematocrito de ratones cuando es inyectado una vez cada dos semanas. Ratones normales CD-1 (10 ratones por grupo) fueron inyectados intravenosamente una vez por semana, o una vez cada dos semanas, durante un total de aproximadamente seis semanas, con concentraciones variables del análogo de la Epo N47 preparado en PBS conteniendo 0,025% de albúmina sérica de ratón. El análogo N47 fue administrado en cantidades de 200, 100 o 25 μg /kg/dosis una vez cada dos semanas, o con una cantidad de 12,5 μg /kg/dosis una vez por semana. Fueron determinados como base los hematocritos de todos los ratones y, dos veces por semana después de ello, por medio de sangrados retrorbitales.

Conforme es mostrado en la Figura 9, el análogo N47 puede elevar el hematocrito de ratones normales de un modo que depende de la dosificación, aún cuando es administrado dos veces al mes. Como sería de esperar, cuando es dosifi-

ES 2 283 139 T3

cado con una frecuencia menor se requiere una cantidad mayor del análogo N47 para elevar el hematocrito. Una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del análogo N47 administrado una vez cada dos semanas elevó el hematocrito hasta aproximadamente el mismo nivel en seis semanas que el conseguido por 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cuando es dosificado semanalmente.

5 Ejemplo 6

IV Farmacocinéticas del análogo de la Epo N47 y de la rHuEpo en pacientes en Diálisis Peritoneal Ambulatoria Continua (CAPD)

10 A la vista del marcado incremento en la vida media en suero del análogo de la Epo N47 en comparación con la rHuEpo en rata y perro beagle, fue de interés el determinar si podría ser observado también un incremento en humanos.

Fue llevado a cabo un estudio de diseño aleatorizado, cruzado, a doble ciego de once pacientes CAPD estables (7 hombres, 4 mujeres, de 25 a 75 años de edad). Un grupo de pacientes recibió 100 U/kg de rHuEpo (equivalente a 0,5 μg de péptido/kg) mientras que un segundo grupo de pacientes recibió 0,5 μg de péptido/kg del análogo de la Epo N47, ambos administrados como una única inyección intravenosa en bolo. Fueron sacadas muestras de sangre venosa (3 mL) a través de una cánula fijada internamente y fueron tomadas antes de la dosificación y a los 5, 10, 15, 30 minutos y a 1, 2, 5, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 60, 72 y 96 horas después del bolo intravenoso. Después de un período de 28 días de eliminación, el primer grupo de pacientes recibió una única dosis intravenosa del análogo de la Epo N47 mientras que el segundo grupo recibió una única dosis intravenosa de la rHuEpo. Fueron tomadas muestras sanguíneas de la misma forma que en el primer ciclo de tratamiento. Fueron determinados los niveles en suero de la rHuEpo y del análogo de la Epo N47 por medio de ELISA después de restar los niveles base de la Epo endógena. Los parámetros farmacocinéticos (media \pm SE) estimados después del ajuste para los efectos de diseño cruzado son mostrados en la Tabla 5. La concentración en suero AUC fue calculada utilizando la suma trapezoidal lineal. $t_{1/2z}$ es definido como: $\log(2)/K_z$, donde K_z es calculado como la ladera de la parte final de la curva de tiempo \ln (concentración de suero). La desaparición (CI) es definida como: dosis/AUC. El volumen de distribución (V_d) es definido como: CI/K.

TABLA 5

Grupo de Dosificación	AUC (ng.h/mL)	$t_{1/2z}$ (h)	CI (mL/h/kg)	Vd (mL/kg)
N47	291,0 \pm 7,6	25,3 \pm 2,2	1,6 \pm 0,3	52,4 \pm 2,0
rHuEpo	131,9 \pm 8,3	8,5 \pm 2,4	4,0 \pm 0,3	48,7 \pm 2,1

40 El promedio de vida media en suero para el análogo de la Epo N47 (25,3 h) fue tres veces más largo que el de la rHuEpo (8,5 h) y la desaparición fue 2,5 veces más rápida para la rHuEpo que para el análogo N47.

Ejemplo 7

Una Fase II del Estudio para Determinar la Dosis y el Calendario de Dosificación del Análogo de la Epo N47

Fueron iniciados estudios de escalado de dosis secuenciales, aleatorios, multicéntricos con el fin de investigar la dosis y el calendario de dosificación óptimos para el análogo N47 cuando es administrado por medio de inyección subcutánea o intravenosa, en pacientes con CRF recibiendo diálisis.

50 El calendario de dosificación es el siguiente:

Dosificación de una vez por semana: 0,075, 0,225, 0,45, 0,75, 1,5 y 4,5 μg de péptido/kg/dosis.

55 *Dosificación de tres veces por semana:* 0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,5 y 1,5 μg de péptido/kg/dosis.

60 Los estudios son llevados a cabo en dos partes: la primera parte es un estudio de escalado de dosis diseñado para evaluar la dosis del análogo N47, facilitado una vez o tres veces por semana, la cual incrementa la hemoglobina hasta alcanzar una cantidad óptima a lo largo de cuatro semanas (mayor o igual a 1 g/dL, pero inferior a 3 g/dL). La segunda parte de cada estudio es diseñada para determinar la dosis requerida (cuando es administrada una o tres veces por semana, por ruta de administración intravenosa o subcutánea) para mantener el hematocrito en la diana terapéutica.

65 Los resultados preliminares indican que la dosificación una vez por semana con el análogo N47 puede ser utilizada tanto para elevar como para mantener el hematocrito de pacientes CFR anémicos. Los resultados iniciales sugieren que las dosis preferidas para iniciar la terapia, en un calendario de dosificación de tres veces por semana, son 0,15 y 0,25 μg de péptido/kg/dosis, y con un calendario de dosificación de una vez por semana son de 0,45 y 0,75 μg de péptido/kg/dosis para ambas rutas de administración.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina para la preparación de una composición farmacéutica para elevar y mantener el hematocrito en un mamífero, en donde el análogo es para ser administrado menos frecuentemente que una cantidad molar equivalente de la eritropoyetina humana recombinante, con el fin de obtener un hematocrito diana comparable, y en donde el análogo comprende, al menos, un sitio adicional de glicosilación, en comparación con la eritropoyetina humana, en cualquiera de las posiciones 30 y 88 de la secuencia de la eritropoyetina humana, de tal forma que el análogo comprende, al menos, una cadena adicional de carbohidratos ligada a N.
- 10 2. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina es para ser administrado alrededor de dos veces por semana.
- 15 3. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina es para ser administrado alrededor de una vez por semana.
- 20 4. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina es para ser administrado alrededor de una vez cada dos semanas.
- 25 5. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina es para ser administrado alrededor de una vez al mes.
6. La utilización conforme a la reivindicación 3, en donde el análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina que ha de ser administrado se encuentra en una cantidad de alrededor de 0,075 a 4,5 ug por péptido de eritropoyetina, por kg, por dosis.
7. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el hematocrito diana es, al menos, alrededor del 30%.
- 30 8. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es para el tratamiento de un mamífero que sufre de anemia asociada a una disminución o una pérdida de la función renal.
9. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es para el tratamiento de un mamífero que sufre de anemia asociada a terapia mielosupresiva.
- 35 10. La utilización conforme a la reivindicación 9, en donde la terapia mielosupresiva comprende fármacos quimioterapéuticos o antivirales.
- 40 11. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es para el tratamiento de un mamífero que sufre de anemia asociada a pérdida de sangre excesiva.
- 45 12. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro.
13. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo es Epo Asn30 Thr32 Val87 Asn88 Thr90.
- 50 14. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo comprende dos cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N.
15. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo comprende tres cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N.
- 55 16. La utilización conforme a la reivindicación 1, en donde el análogo comprende cuatro cadenas adicionales de carbohidratos ligadas a N.

55

60

65

FIG. 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

FIG. 2

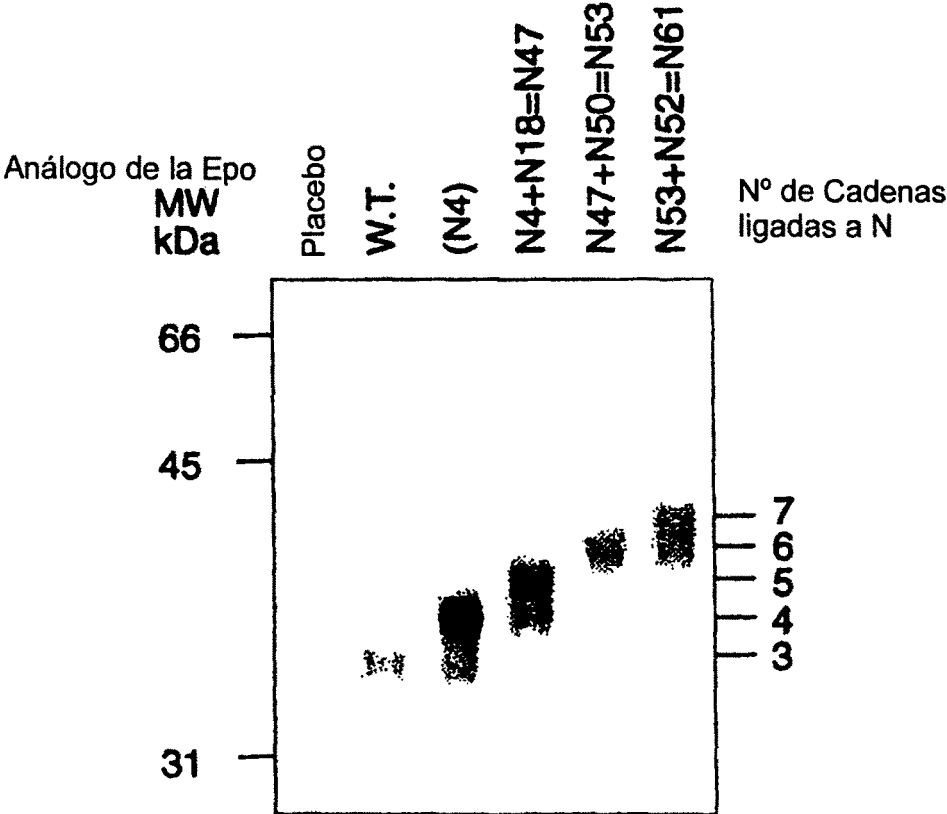
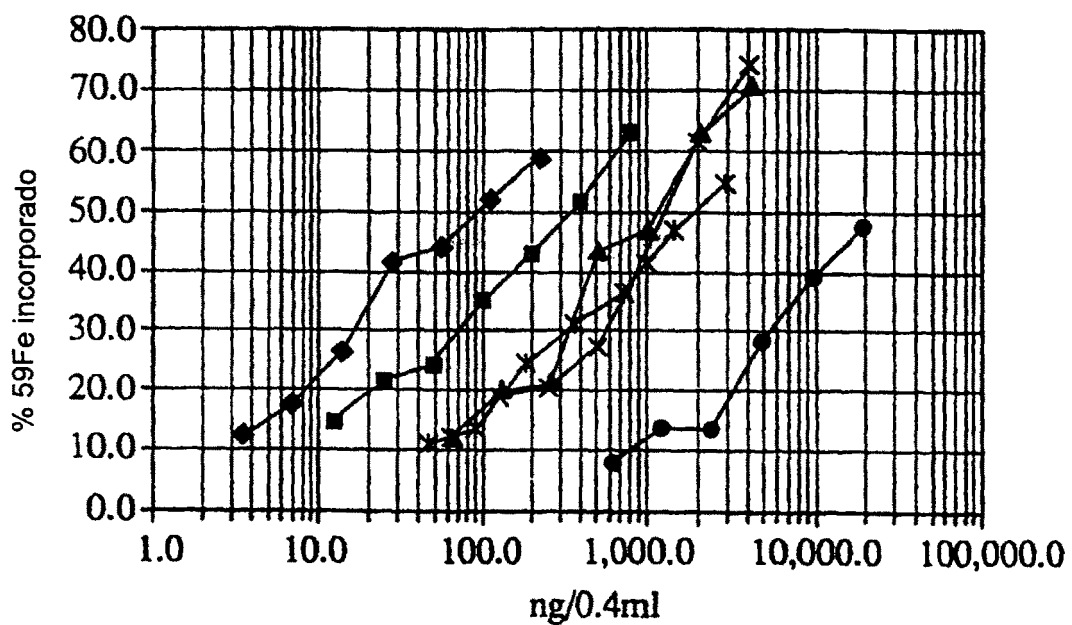


FIG. 3



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

FIG. 4

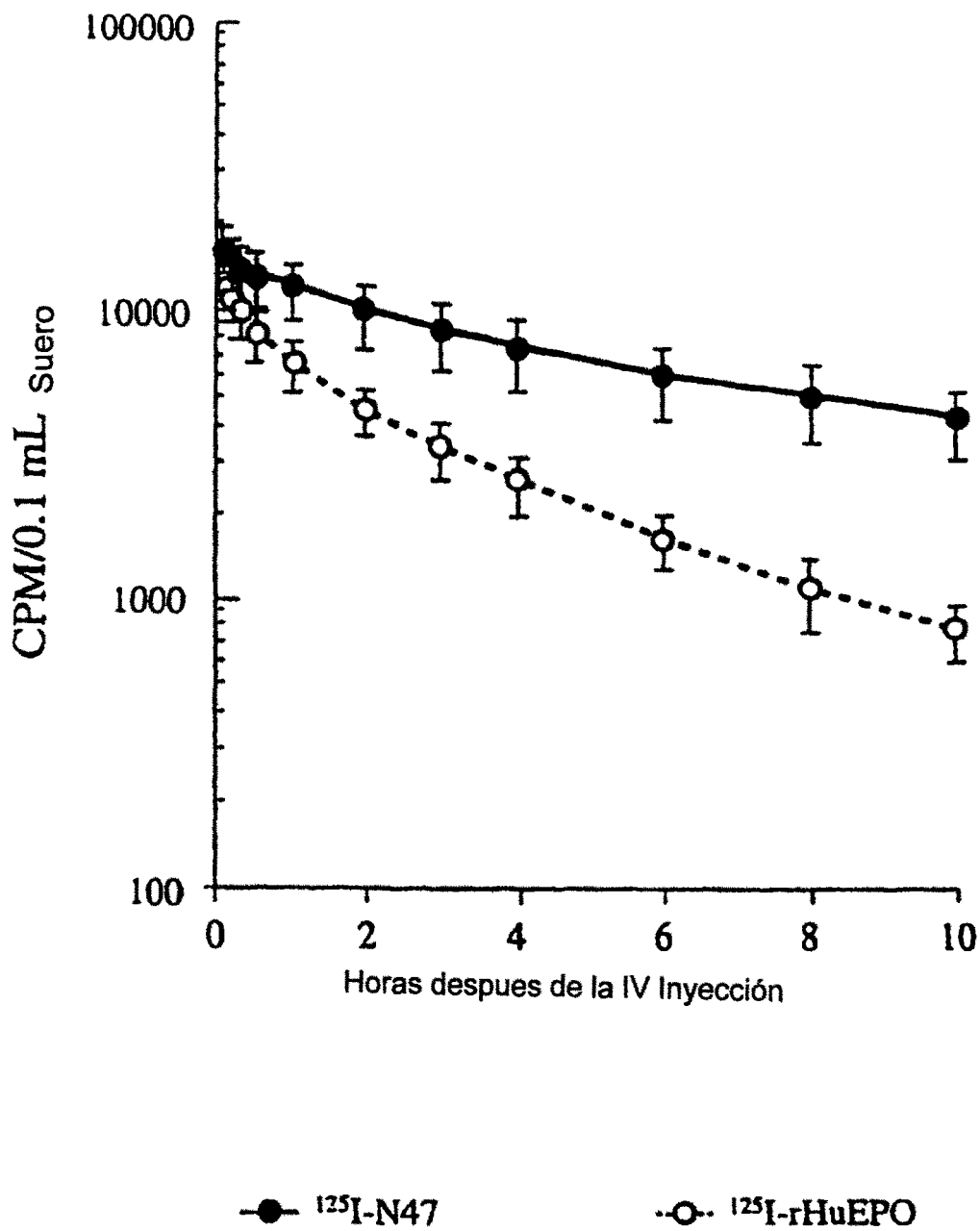


FIG. 5

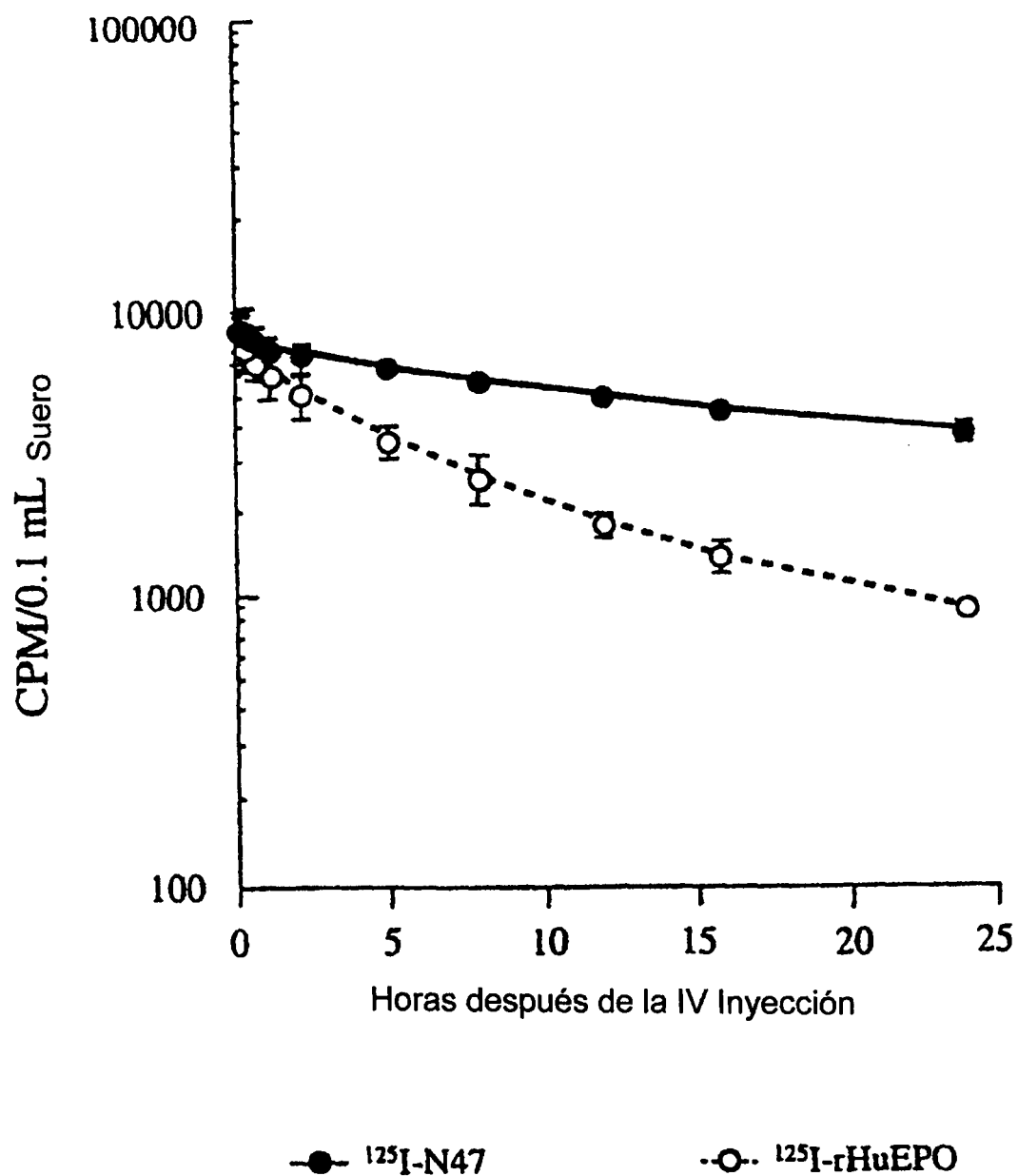
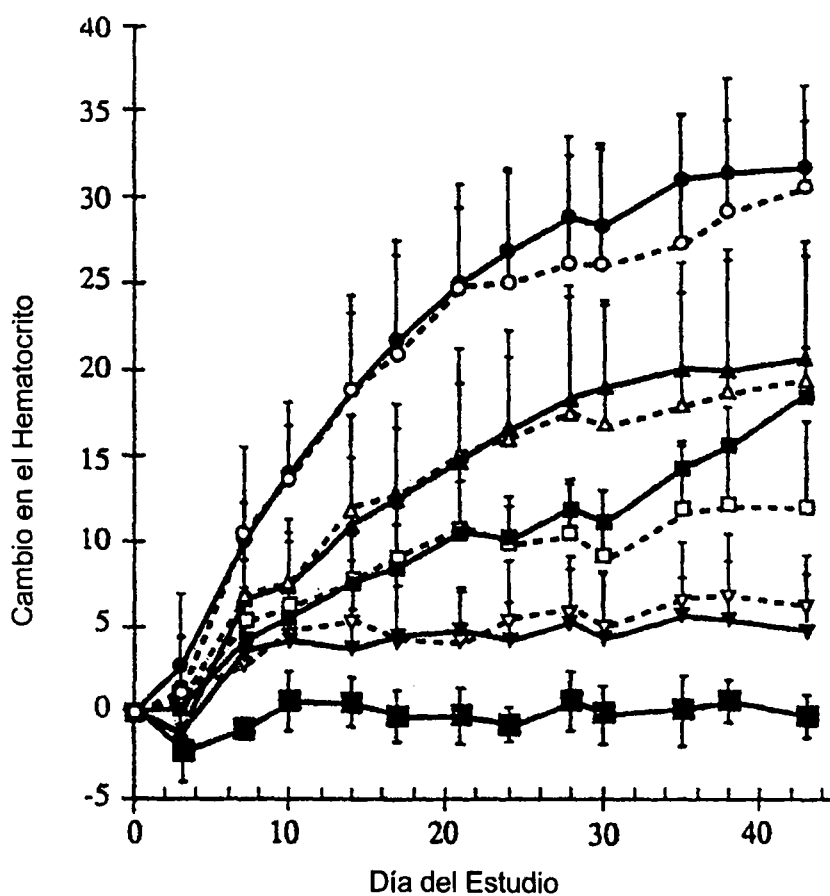
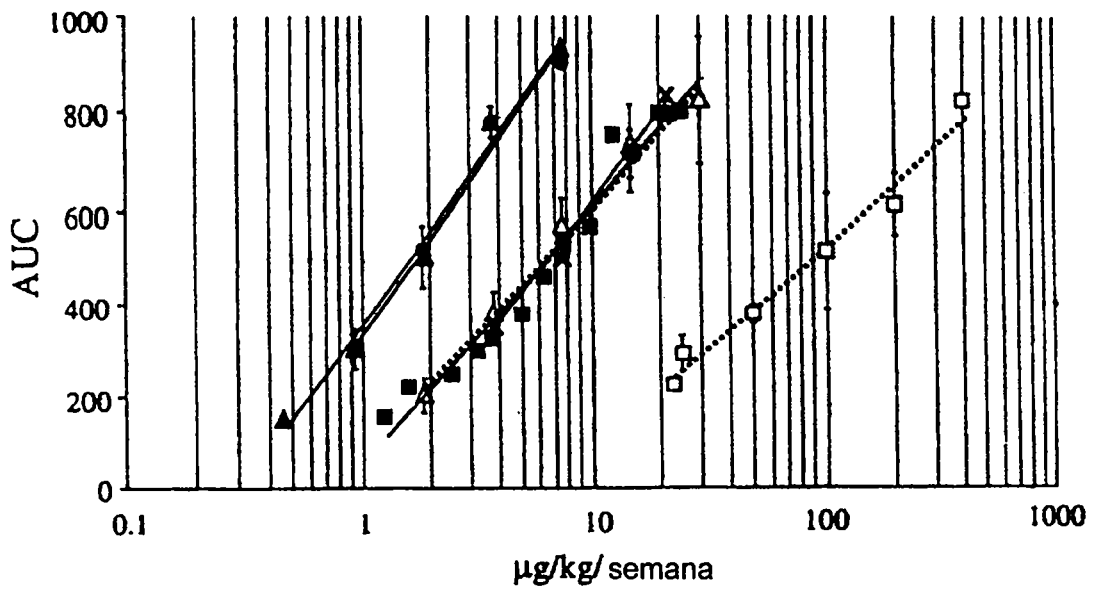


FIG. 6



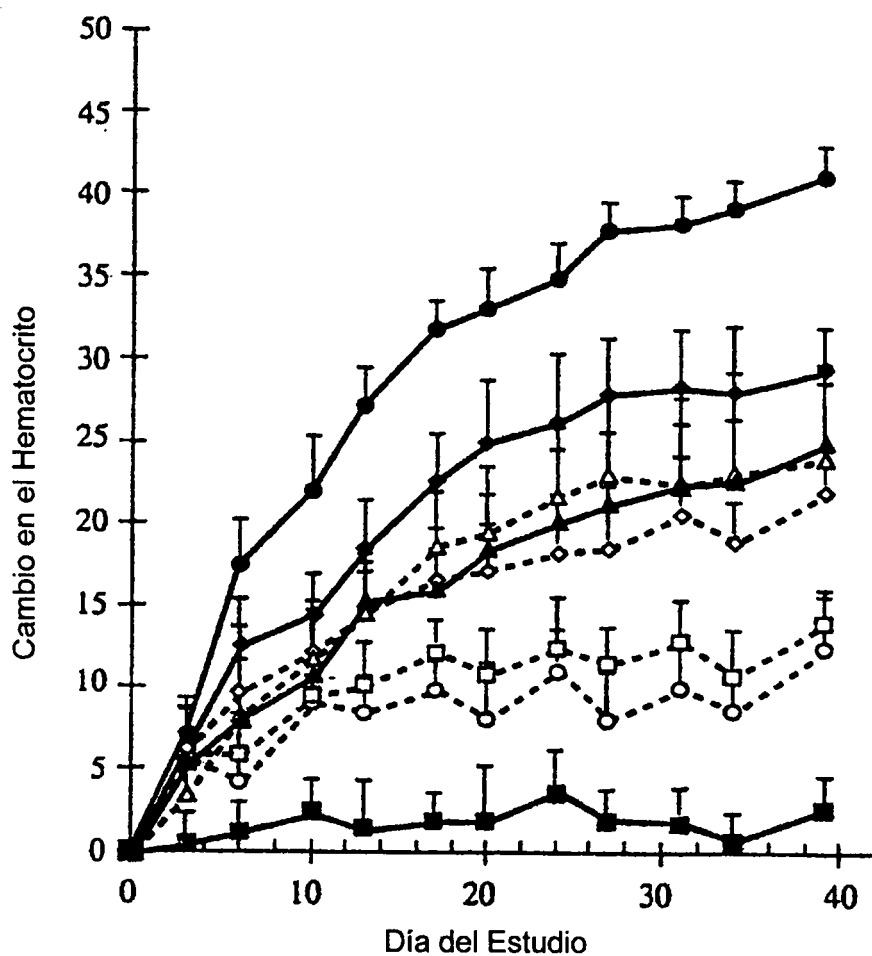
- N47 1.25 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- ▲ N47 0.625 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- N47 0.313 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- ▼ N47 0.156 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- vehículo (IV-TIW)
- rHuEPO 10 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- △ rHuEPO 2.5 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- rHuEPO 1.25 µg/kg/dosis (IP-TIW)
- ▽ rHuEPO 0.625 µg/kg/dosis (IP-TIW)

FIG. 7



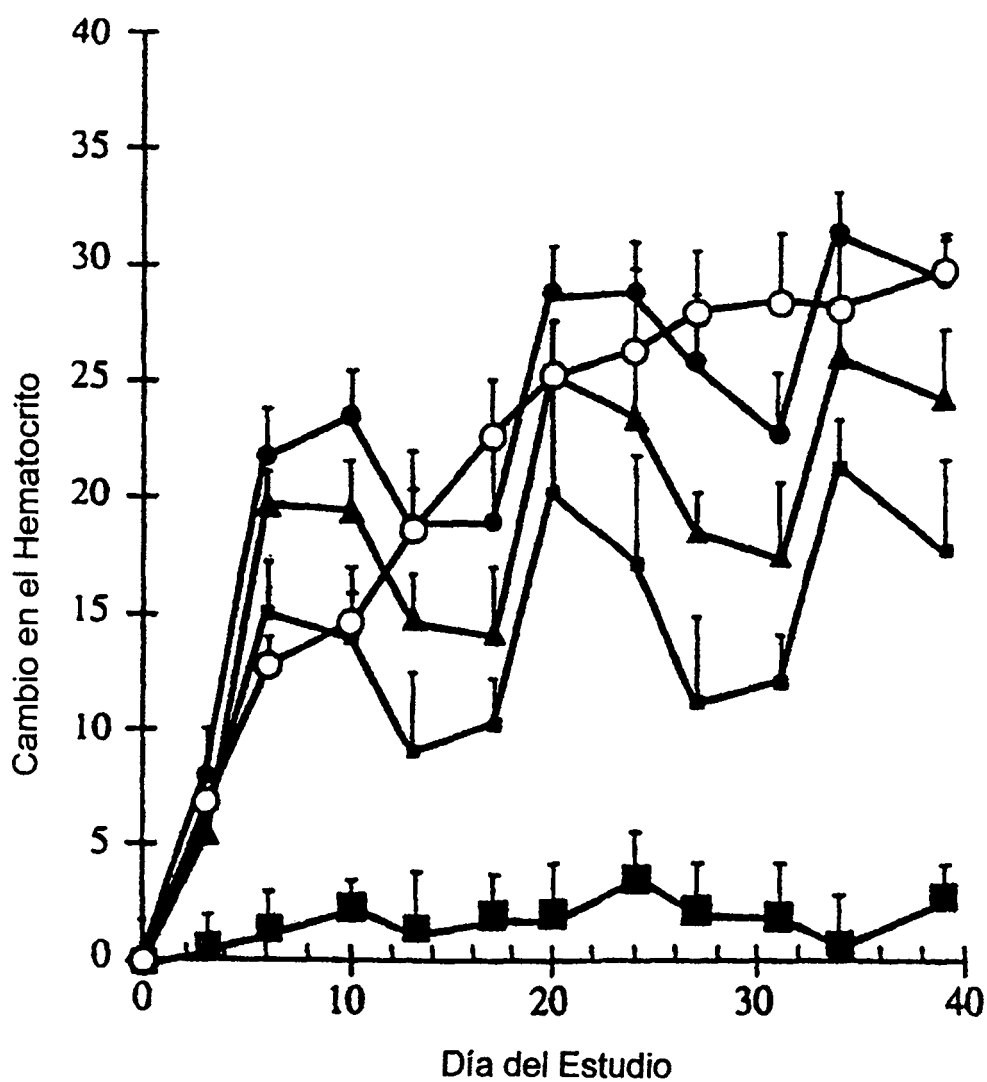
- N47 (IV TIW)
- ▲ N47 (IP TIW)
- N47 (IV QW)
- * N47 (IP QW)
- △ rHuEPO (IP TIW)
- rHuEPO (IV QW)

FIG. 8



- N47 25 µg/kg/dosis(IV-QW)
- ◆ N47 12.5 µg/kg/dosis(IV-QW)
- ▲ N47 6.25 µg/kg/dosis(IV-QW)
- vehículo(IV-QW)
- Δ· rHuEPO 200 µg/kg/dosis(IV-QW)
- ◇· rHuEPO 100 µg/kg/dosis(IV-QW)
- rHuEPO 50 µg/kg/dosis(IV-QW)
- rHuEPO 25 µg/kg/dosis(IV-QW)

FIG. 9



- N47 200 µg/kg/dosis (IV-EOW)
- ▲ N47 100 µg/kg/dosis (IV-EOW)
- N47 25 µg/kg/dosis (IV-EOW)
- N47 12.5 µg/kg/dosis (IV-QW)
- vehículo

ES 2 283 139 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Egrie C., Joan
5 Elliott G., Steven
Browne K., Jeffrey

<120> Métodos y Composiciones para la Prevención y Tratamiento de la Anemia.

10 <130> A-460

<140> 09/178.292
<141> 1998-10-23

15 <160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1
<211> 193
<212> PRT

25 <213> Humana

<220>
<221> SEÑAL

30 <222> (1)..(27)
<223> secuencia señal es residuo 1-27

<400> 1

35

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

40

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

45

50

55

60

65

ES 2 283 139 T3

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

55 Arg
 <210> 2
 60 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Humano
 65 <400> 2

atctagaagt tgctctctgg acagttcct

ES 2 283 139 T3

<210> 3

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Humano

<400> 3

10 gaagcttgcg ccacatggg ggtgcacgaa tg

<210> 4

<211> 27

15 <212> ADN

<213> Humano

<400> 4

20 gatcctctag agttgctctc tggacag

<210> 5

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Humano

30 <400> 5

caacaagctt gcgccccat ggggg

35

40

45

50

55

60

65