



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 824**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01984811 .8**

96 Fecha de presentación : **08.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1345628**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Conjugados de eritropoyetina (EPO) con polietilenglicol (PEG).**

30 Prioridad: **20.12.2000 EP 00127891**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Burg, Josef;**
Engel, Alfred;
Franze, Reinhard;
Hilger, Bernd;
Schurig, Hartmut, Ernst;
Tischer, Wilhelm y
Wozny, Manfred

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 361 824 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).

DESCRIPTION

Conjugados de eritropoyetina (EPO) con polietilenglicol (PEG)

La eritropoyesis es la producción de glóbulos rojos, que con frecuencia se produce para compensar la destrucción de células. La eritropoyesis es un mecanismo fisiológico controlado que permite disponer de suficientes glóbulos rojos para la oxigenación correcta de los tejidos. La eritropoyetina (EPO) humana natural es producida por el riñón y es el factor plasmático humoral que estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot P. y Deflandre C., C.R. Acad. Sci. 143:432, 1906; Erslev A.J. (Blood 8:349, 1953), Reissmann K.R., Blood 5:372, 1950, Jacobson L.O., Goldwasser E., Freid W. y Plzak L.F., Nature 179:6331-4, 1957. La EPO natural estimula la división y la diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos situados en la médula ósea y ejerce su actividad biológica mediante la unión a receptores situados sobre los precursores eritroides (Krantz B.S., Blood 77:419, 1991).

La eritropoyetina ha sido fabricada biosintéticamente utilizando tecnología de ADN recombinante (Egrie J.C., Strickland T.W., Lane J. *et al.* Immunobiol. 72: 213-224, 1986) y es el producto de un gen EPO humano clonado que se ha insertado y expresado en las células del tejido ovárico de hámster chino (células CHO). La estructura primaria de la forma totalmente procesada predominante de la eritropoyetina humana (hEPO) se ilustra en la fig. 1. Existen dos puentes disulfuro entre Cys⁷-Cys¹⁶¹ y Cys²⁹-Cys³³. El peso molecular de la cadena polipeptídica de la EPO sin los grupos sacáridos es de 18.236 Da. En la molécula intacta de EPO, aproximadamente 40% del peso molecular está constituido por los grupos carbohidrato que glucosilan la proteína en sitios de glucosilación en la proteína (Sasaki H., Bothner B., Dell A. y Fukuda M., J. Biol. Chem. 262:12059, 1987).

Debido a que la eritropoyetina humana resulta esencial para la formación de glóbulos rojos, la hormona resulta útil en el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción baja o defectuosa de glóbulos rojos. Clínicamente se utiliza la EPO en el tratamiento de la anemia en pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF) (Eschbach J.W., Egri J.C., Downing M.R. *et al.* NEJM 316:73-78, 1987; Eschbach J.W., Abdulhadi M.H., Browne J.K. *et al.*, Ann. Intern. Med. 111:992, 1989; Egrie J.C., Eschbach J.W., McGuire T., Adamson J.W., Kidney Intl. 33:262, 1988; Lim V.S., Degowin R.L., Zavala D. *et al.* Ann. Intern. Med. 110:108-114, 1989) y en pacientes de SIDA y de cáncer sometidos a quimioterapia (Danna R.P., Rudnick S.A., Abels R.I., en: M.B. Garnick, editor, Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker, 1990: páginas 301 a 324). Sin embargo, la biodisponibilidad de las terapéuticas de proteínas disponibles comercialmente tales como EPO se encuentra limitada por su corta vida media en el plasma y su susceptibilidad a la degradación por proteasas. Por lo tanto, se han propuesto, por ejemplo, derivados de EPO para superar dichas desventajas.

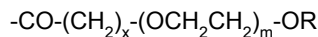
Las rutas comunes para obtener proteínas pegiladas rinde mezclas de proteínas monopegiladas y oligopegiladas. Además, el compuesto polietilenglicol (PEG) se une en varias posiciones de las proteínas dependiendo de la cantidad y reactividades de los grupos reactivos disponibles sobre la superficie de la proteína. Este tipo de mezcla puede resultar en limitaciones graves: el PEG puede unirse en posiciones que interactúan con el receptor específico de la proteína y reducir drásticamente o incluso anular la eficacia terapéutica. Para resolver esta desventaja, resulta necesaria la separación y purificación de los ingredientes activos de este tipo de mezcla, o una ruta sintética selectiva para evitar su formación. Resulta evidente que evitar cualquier formación de mezclas facilita recibir un ingrediente farmacéutico activo puro en términos de un único isómero posicional a rendimientos esencialmente más altos. La separación de los isómeros posicionales de las mezclas de PEG-proteína puede incluso resultar imposible con las herramientas comunes a escala de producción.

Se mencionan ejemplos de mezclas de PEG-proteínas en las solicitudes de patente internacional WO n° 00/32772, WO n° 97/03106 y WO n° 00/42175. La patente WO n° 00/32772 se refiere a compuestos eritropoyéticos no glucosilados derivatizados con polímero y a métodos de preparación de estas proteínas que implican la utilización de un procedimiento de modificación de aldehído sin moléculas conectoras. La patente WO n° 97/03106 da a conocer poli(etilenglicol) y polímeros relacionados monosustituídos con ácidos propiónicos o butanoicos y derivados funcionales para aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo la utilización de ésteres de succimidilo para producir conjugados de proteínas. La patente WO n° 00/42175 se refiere a métodos de preparación de proteínas solubles que presentan cisteínas libres en los que una célula huésped se expone a un agente bloqueante de cisteína. Las proteínas solubles producidas por los métodos seguidamente pueden modificarse para incrementar su efectividad. Entre dichas modificaciones se incluyen la unión de un grupo PEG para formar proteínas pegiladas.

Se han propuesto varios métodos para la modificación selectiva de polipéptidos producidos recombinantemente.

La solicitud de patente europea n° EP 651.761 da a conocer la modificación selectiva de polipéptidos producidos recombinantemente en grupos terminales reactivos de carbono α . La primera etapa en el método es formar un polipéptido producido recombinantemente de manera que se encuentre protegido en el grupo terminal reactivo de carbono α por un grupo protector añadido biológicamente. El grupo protector añadido biológicamente

- preferentemente es un aminoácido, péptido y/o polipéptido que contiene por lo menos un sitio que puede cortarse enzimática o químicamente, y preferentemente presenta una secuencia que no se encuentra presente en la secuencia del polipéptido deseado. Tras su formación, el polipéptido protegido biológicamente se hace reaccionar con agentes protectores químicos con el fin de proteger los grupos de cadena lateral, y después se corta con un reactivo de corte específico para el grupo protector añadido biológicamente. De esta manera se produce un polipéptido que presenta un grupo amino N-terminal no protegido y grupos reactivos de cadena lateral protegidos. Los grupos amino N-terminales no protegidos modificados con un agente modificador para formar un polipéptido modificado N-terminalmente y de cadenas laterales protegidas. A continuación se desprotege para formar un polipéptido modificado N-terminalmente. La patente EP nº 651.761 enseña que puede unirse cualquier secuencia de aminoácidos a modo de grupo protector añadido biológicamente. Sin embargo, en los sistemas de expresión de mamífero, la EPO se expresa con una secuencia de señal de líder que se corta con una peptidasa de señal con el fin de proporcionar la EPO madura procesada. Dichas peptidasas de señal reconocen únicamente residuos aminoácidos restringidos en el sitio de corte P1' y P3' (R.E. Dalbey *et al.* Protein Sci. 6:1129, 1997. En conclusión, un péptido protector añadido biológicamente debe construirse a partir de una secuencia de aminoácidos N-terminal de por lo menos tres aminoácidos para el corte de la secuencia de señal, seguido de una secuencia de aminoácidos para la eliminación enzimática o química del grupo protector. En el caso de que las secuencias de reconocimiento de tanto la peptidasa de señal como la proteasa de corte sean idénticas o estrechamente relacionadas, la secuencia del grupo protector añadido biológicamente puede reducirse a unos cuantos aminoácidos.
- Además, se consiguió la modificación N-terminal selectiva mediante ligación quimioselectiva a una macromolécula diana funcionalizada con aldehído (o cetona) (solicitud de patente europea nº EP 788.375; Gaertner H.F., Offord R.E., Bioconjugate Chem. 7(1):38-44, 1996). Sin embargo, este método únicamente funciona para serinas o treoninas N-terminales.
- La modificación selectiva en la alanina N-terminal se ha demostrado mediante transaminación de la alanina en piruvato (solicitudes de patente europea nº EP 964.705 y nº EP 605.963). La desventaja de dicho método es que el derivado de EPO que se forma muestra una actividad *in vitro* reducida. Además, los agentes de transformación Cu²⁺/ácido glioxílico/NaOAc probablemente producen reacciones secundarias dentro de la molécula de EPO.
- También se demostró la modificación N-terminal específica de sitio mediante incorporación mediada por transglutaminasa de derivados poli(etilenglicol) (Sato H., Yamamoto K., Hayashi E., Takahara Y., Bioconjugate Chem. 11(4):502-509 (2000)). Sin embargo, este método mostró únicamente rendimientos bajos y requiere la incorporación de un péptido etiqueta en el extremo N-terminal y por lo tanto modifica la estructura polipeptídica.
- La modificación con reactivos de marcaje basados en glioxililo también permite la modificación N-terminal selectiva (Zhao Z.G., Im J.S., Clarke D.F., Bioconjugate Chem. 10:424-430, 1999), pero se restringe a las cisteínas.
- La patente WO nº 00/32772 da a conocer agentes farmacéuticos para el tratamiento de anemias con compuestos eritropoyéticos no glucosilados derivatizados con polímero que muestran estabilidad y bioactividad *in vivo*. También se proporcionan métodos para preparar dichas proteínas derivatizadas que implican la utilización de un procedimiento de modificación de aldehído sin moléculas conectoras.
- La patente WO nº 97/03106 da a conocer ésteres activos de ácidos PEG y polímeros relacionados que presentan un único grupo de ácido propiónico o butanoico y sin enlaces éster. También se dan a conocer conjugados con proteínas, enzimas, polipéptidos, fármacos, pigmentos, etc.
- La patente WO nº 98/32466 se refiere a la unión de un grupo polietilenglicol (PEG) a una molécula diana. Además, se da a conocer un procedimiento para la PEGilación covalente directa de un sustrato, que comprende la reacción de PEG halogenado con el sustrato, en el que el halógeno o el PEG halogenado actúa como grupo saliente en la reacción de PEGilación.
- La patente WO nº 00/42175 se refiere a métodos de preparación de proteínas solubles que presentan cisteínas libres en los que una célula huésped se expone a un agente bloqueante de cisteína. Las proteínas solubles producidas por los métodos dados a conocer pueden modificarse para incrementar su efectividad. Entre dichas modificaciones se incluyen la unión de un grupo PEG para formar proteínas pegiladas.
- La presente invención proporciona un conjugado de eritropoyetina, comprendiendo dicho conjugado una glucoproteína eritropoyetina que presenta un grupo α -amino N-terminal y que presenta la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y seleccionada de entre el grupo que consiste de eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación; uniendo covalentemente dicha glucoproteína a un grupo poli(etilenglicol) de fórmula:



formando el -CO del grupo poli(etilenglicol) un enlace amida con dicho grupo α -amina N-terminal, en el que R es alquilo inferior; x es 2 ó 3, y m presenta un valor entre aproximadamente 450 y aproximadamente 1.350.

En comparación con la EPO no modificada (es decir, EPO sin PEG unido) y los conjugados convencionales de PEG-EPO, los presentes conjugados presentan una vida media circulante y tiempo de residencia plasmática incrementados, un nivel reducido de eliminación y una actividad clínica *in vivo* incrementada. Los conjugados de la presente invención presentan los mismos usos que la EPO. En particular, los conjugados de la presente invención resultan útiles en el tratamiento de pacientes mediante la estimulación de la división y diferenciación de progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea de la misma manera que se utiliza la EPO para tratar pacientes.

La presente invención proporciona conjugados, comprendiendo dichos conjugados una glucoproteína eritropoyetina que presenta un grupo α -amino N-terminal y que presenta la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y seleccionada de entre el grupo que consiste de eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación; encontrándose dicha glucoproteína unida covalentemente a un grupo poli(etilenglicol) de fórmula:



formando el -CO -CO (es decir, el carbonilo) del grupo poli(etilenglicol) un enlace amida con dicho grupo α -amino N-terminal, en el que R es alquilo inferior, x es 2 ó 3, y m presenta un valor de entre aproximadamente 450 y aproximadamente 1.350; es decir, m se selecciona de manera que el peso molecular del conjugado menos el de la glucoproteína eritropoyetina es de entre aproximadamente 20 kDa (kilodaltons) y aproximadamente 60 kDa.

Se ha encontrado que los conjugados de la presente invención pueden utilizarse de la misma manera que la EPO no modificada. Sin embargo, los conjugados de la presente invención presentan una vida media circulante y un tiempo de residencia plasmática incrementados, una eliminación reducida y una actividad clínica *in vivo* incrementada. En virtud de estas propiedades mejoradas, los conjugados de la presente invención pueden administrarse semanalmente en lugar de las tres veces semanas para la EPO no modificada. Se espera que la frecuencia de administración reducida resulte en un cumplimiento mejorado por parte del paciente, conduciendo a resultados mejorados del tratamiento, así como a una mejor calidad de vida del paciente. En comparación con los conjugados convencionales de EPO ligada a poli(etilenglicol), se ha encontrado que los conjugados que presenta el peso molecular y la estructura conectora de los conjugados de la presente invención presentan propiedades mejoradas de potencia, estabilidad, área bajo la curva (AUC) y vida media circulante.

La expresión "grupo α -amino N-terminal" se refiere al residuo amino N-terminal de un péptido, es decir, el extremo de un péptido o cadena proteica que presenta un aminoácido con un grupo α -amino (NH_2 -) libre.

El término "eritropoyetina" o "EPO" se refiere a una glucoproteína que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la fig. 1 (SEC ID n° 1) o en la fig. 2 (SEC ID n° 2), preferentemente en la fig. 1, o a una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la misma, las propiedades biológicas de la cual se refieren a la estimulación de la producción de glóbulos rojos y a la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos presentes en la médula ósea. Tal como se utiliza en la presente memoria, dichos términos incluyen aquellas proteínas modificadas deliberadamente, tal como, por ejemplo, mediante mutagénesis sitio-dirigida o accidentalmente mediante mutaciones. Entre dichos términos también se incluyen análogos que presentan entre 1 y 6 sitios adicionales para la glucosilación, análogos que presentan por lo menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi-terminal de la glucoproteína, en el que el aminoácido adicional incluye por lo menos un sitio de glucosilación, y análogos que presentan una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación. Entre dichos términos se incluyen eritropoyetina humana tanto natural como producida mediante recombinación.

La expresión "EPO intermediaria" se refiere a un derivado de glucoproteína eritropoyetina con una extensión N-terminal. Preferentemente, la extensión de aminoácidos comprende una secuencia de señal de secreción opcionalmente seguida de una etiqueta de purificación, por ejemplo una etiqueta histidina (tal como se describe en, por ejemplo, H.M. Sassenfeld, Trends in Biotechnol. 8:88-93, 1990), seguido de una secuencia de reconocimiento enzimático para la digestión de una proteína, seguida de la secuencia de aminoácidos de glucoproteína eritropoyetina definida posteriormente.

La expresión "EPO modificada" se refiere a una EPO intermediaria de la que se ha escindido la señal de secreción, por ejemplo formando una glucoproteína EPO que se extiende en el extremo N-terminal con un sitio de corte

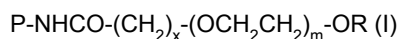
proteolítico, por ejemplo la secuencia APPRIEGR, es decir APPRIEGR-EPO (SEC ID nº 3), o APP, es decir APP-EPO (SEC ID nº 4) o APPGAAHY, es decir APP-GAAHY-EPO (SEC ID nº 5), o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma (ver también las figuras 3, 4 y 5).

- 5 La expresión "EPO modificada protegida" se refiere a una EPO modificada, que se produce mediante acilación de los grupos ϵ -amino con grupos protectores químicos, por ejemplo mediante citraconilación.

La expresión "EPO protegida" se refiere al derivado de EPO que se obtiene tras el corte proteolítico de la EPO modificada protegida, es decir, la EPO en la que los grupos ϵ -amino han sido modificados con grupos protectores químicos y en los que existe un grupo α -amino N-terminal libre.

La expresión "secuencia homóloga de aminoácidos" se refiere a que las secuencias de aminoácidos correspondientes presentan una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 80% con las secuencias de corte proteolítico correspondientes o con los aminoácidos correspondientes de la eritropoyetina mostrados en la fig. 1 ó 2, y a que muestran la actividad biológica requerida (cortables por la proteasa correspondiente o que presentan la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos en el caso de los compuestos de eritropoyetina pegilados tal como se define en la descripción y en las reivindicaciones). Preferentemente, la homología es de 90%, más preferentemente de 95%.

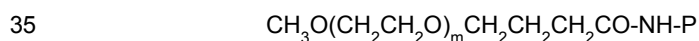
- 20 Los conjugados de eritropoyetina de la presente invención pueden representarse con la fórmula 1:



en la que x, m y R son tal como se ha indicado anteriormente. En la fórmula I, P es el residuo de una glucoproteína eritropoyetina indicada en la presente memoria (es decir, sin el grupo α -amino N-terminal que forma un enlace amida con el carbonilo mostrado en la figura 1), que presenta la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos.

En una realización preferente de la presente invención R es metilo. Preferentemente, m presenta un valor entre aproximadamente 550 y aproximadamente 1.000, más preferentemente de entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750.

En la realización más preferente de la presente invención R es metilo y m presenta un valor entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750, es decir, el conjugado definido anteriormente que presenta la fórmula:



en la que m presenta un valor entre 650 y 750 y P es tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, m presenta un valor medio de aproximadamente 730.

Preferentemente, la glucoproteína de los conjugados tal como se ha definido anteriormente es una eritropoyetina humana. La eritropoyetina humana y proteína análogas tal como se ha definido anteriormente pueden expresarse mediante la activación de genes endógenos. Las glucoproteínas de eritropoyetina preferentes son aquéllas mostradas en la fig. 1 ó 2, más preferentemente aquéllas mostradas en la fig. 1.

Además, P puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de residuos de eritropoyetina humana y análogos de la misma que presentan entre 1 y 6 sitios adicionales de glucosilación. Tal como se explica en detalle posteriormente, la preparación y purificación de EPO son bien conocidas de la técnica. El término "EPO" se refiere a la proteína natural o recombinante, preferentemente la humana, tal como se obtiene a partir de cualquier fuente convencional tal como tejidos, síntesis de proteínas, o el cultivo celular de células naturales o recombinantes. Cualquier proteína que presente la actividad de la EPO, tal como muteínas o proteínas modificadas de otra manera, se encuentra comprendida. La EPO recombinante puede prepararse mediante la expresión en líneas celulares de CHO, BHK, COS, HeLa o PER C6 u otras líneas celulares apropiadas de origen animal o humano, mediante tecnología de ADN recombinante o mediante activación de genes endógenos. La expresión de proteínas, incluyendo la EPO, mediante activación de genes endógenos es bien conocida de la técnica y se da a conocer, por ejemplo, en las patentes US nº 5.733.761, nº 5.641.670 y nº 5.733.746, y en las publicaciones de patente internacional nº WO 93/09222, nº WO 94/12650, nº WO 95/31560, nº WO 90/11354, nº WO 91/06667 y nº WO 91/09955.

Las especies preferentes de EPO para la preparación de productos de glucoproteína de eritropoyetina son las especies de EPO humana. Más preferentemente, la especie de EPO es la EPO humana que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la fig. 1 ó 2, más preferentemente la secuencia de aminoácidos indicada en la fig. 1.

60

En una realización, P puede ser el residuo de un análogo de glucoproteína que presente entre 1 y 6 sitios adicionales para la glucosilación. La glucosilación de una proteína con uno o más grupos oligosacáridos se produce en sitios específicos a lo largo de un esqueleto polipeptídico y afecta en gran medida a las propiedades físicas de la proteína, tales como la estabilidad, secreción, localización subcelular y actividad celular de la proteína. La glucosilación habitualmente es de dos tipos. Los oligosacáridos O-ligados se unen a residuos de serina o treonina y los oligosacáridos N-ligados se unen a residuos de asparagina. Un tipo de oligosacárido que se encuentra en oligosacáridos tanto N-ligados como O-ligados es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que es una familia de aminoazúcares que contiene 9 ó más átomos de carbono. El ácido siálico habitualmente es el residuo terminal en los oligosacáridos tanto N-ligados como O-ligados y, debido a que porta una carga negativa, proporciona propiedades de ácido a la glucoproteína. La eritropoyetina humana, que presenta 165 aminoácidos, contiene tres cadenas oligosacáridas N-ligadas y una O-ligada que comprenden aproximadamente 40% del peso molecular total de la glucoproteína. La glucosilación N-ligada se produce en los residuos de asparagina situados en las posiciones 24, 38 y 83, y la glucosilación O-ligada, en un residuo serina situado en la posición 126. Las cadenas oligosacáridas se encuentran modificadas con residuos terminales de ácido siálico. La eliminación enzimática de todos los residuos de ácido siálico de la eritropoyetina glucosilada resulta en la pérdida de actividad *in vivo* pero no de la actividad *in vitro* debido a que la sialilación de la eritropoyetina impide su unión, y posterior eliminación, por parte de la proteína ligante hepática.

Entre las glucoproteínas de la presente invención se incluyen análogos de la eritropoyetina humana con uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana que resultan en un incremento del número de sitios para la unión de ácido siálico. Pueden generarse análogos de glucoproteína mediante mutagénesis sitio-dirigida que presenten adiciones, deleciones o sustituciones de residuos aminoácidos que incrementen o alteren los sitios disponibles para la glucosilación. Los análogos de glucoproteína que presenten niveles de ácido siálico superiores a los observados en la eritropoyetina humana se generan mediante la adición de sitios de glucosilación que no alteren la conformación secundaria o terciaria necesaria para la actividad biológica. Las glucoproteínas de la presente invención también incluyen análogos que presentan niveles incrementados de unión de carbohidratos en un sitio de glucosilación que habitualmente implica la sustitución de uno o más aminoácidos en estrecha proximidad a un sitio N-ligado u O-ligado. Las glucoproteínas de la presente invención también incluyen análogos que presentan uno o más aminoácidos que se extienden a partir del extremo carboxi-terminal de la eritropoyetina y que proporcionan por lo menos un sitio adicional de carbohidrato. Las glucoproteínas de la presente invención también incluyen análogos que presentan una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación. Dicha reorganización del sitio de glucosilación implica la deleción de uno o más sitios de glucosilación en la eritropoyetina humana y la adición de uno o más sitios de glucosilación no naturales. El incremento del número de cadenas de carbohidrato en la eritropoyetina, y por lo tanto el número de ácidos siálicos en cada molécula de eritropoyetina puede proporcionar propiedades ventajosas, tales como una solubilidad incrementada, una mayor resistencia a la proteólisis, una inmunogenicidad reducida, una vida media en suero incrementada y una actividad biológica incrementada. Los análogos de eritropoyetina con sitios de glucosilación adicionales se dan a conocer en mayor detalle en la solicitud de patente europea nº 640 619, de Elliot, publicada el 1 de marzo de 1995.

En una realización preferente, las glucoproteínas de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye por lo menos un sitio adicional de glucosilación tal como, aunque sin limitarse a ellas, las eritropoyetinas que comprenden la secuencia de eritropoyetina humana modificada con una modificación seleccionada de entre las siguientes:

Asn³⁰Thr³²;
 Asn⁵¹Thr⁵³;
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; y
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

La notación utilizada en la presente memoria para las modificaciones de la secuencia de aminoácidos se refiere a que la posición o posiciones de la proteína no modificada correspondiente (por ejemplo hEPO de las figs. 1 y 2) indicada por el número o números superíndices se modifica por la del aminoácido o aminoácidos que preceden inmediatamente al número o números superíndices respectivos.

- 5 La glucoproteína también puede ser un análogo que presente una secuencia de aminoácidos que incluya una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación. La reorganización puede comprender una delección de cualquiera de los sitios de carbohidrato N-ligados en la eritropoyetina humana y una adición de un sitio de carbohidrato N-ligado en la posición 88 de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana. Preferentemente la glucoproteína es un análogo seleccionado de entre el grupo que consiste de Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO y Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que presenta entre uno y seis átomos de carbono. Entre los ejemplos de grupos de alquilo inferior se incluyen metilo, etilo e isopropilo. De acuerdo con la presente invención R es cualquier alquilo inferior. Los conjugados en los que R es metilo resultan preferentes.

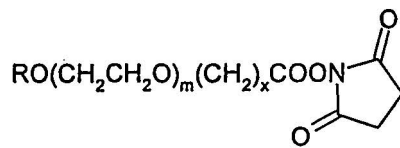
- 15 El símbolo "m" representa el número de residuos de óxido de etileno (OCH₂CH₂) en el grupo de poli(óxido de etileno). Una única unidad de óxido de etileno del PEG presenta un peso molecular de aproximadamente 44 daltons. De esta manera, el peso molecular del conjugado (que excluye el peso molecular de la EPO) depende del número "m". En los conjugados de la presente invención, "m" presenta un valor entre aproximadamente 450 y aproximadamente 1.350 (correspondiente a un peso molecular de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 60 kDa), preferentemente de entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750 (correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 30 kDa), más preferentemente de aproximadamente 730. El número m se selecciona de manera que el conjugado resultante de la presente invención presente una actividad fisiológica comparable a la de la EPO no modificada, siendo dicha actividad igual, superior o una fracción de la actividad correspondiente de la EPO no modificada. Un peso molecular de "aproximadamente" un número determinado se refiere a que se encuentra comprendida dentro de un intervalo razonable de dicho número según se determine mediante técnicas analíticas convencionales. El número "m" se selecciona de manera que el peso molecular de la cadena de poli(etilenglicol) unida covalentemente a la glucoproteína eritropoyetina sea de entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 60 kDa, y es preferentemente de aproximadamente 32 kDa.

- 30 Las etapas del método para la preparación de los compuestos anteriormente indicados implica formar una glucoproteína eritropoyetina de única copia recombinante o una parte de la misma, de manera que la glucoproteína de única copia se encuentre protegida con uno o más grupos protectores añadidos biológicamente a la α -amina N-terminal. A continuación, puede hacerse reaccionar la eritropoyetina recombinante con un agente protector para proteger selectivamente los grupos amino de cadena lateral reactiva e impedir de esta manera la modificación de grupos amino de cadena lateral por el reactivo de pegilación. La glucoproteína eritropoyetina puede cortarse con por lo menos un reactivo de corte específico para el grupo protector biológico, formando un grupo amino de carbono α reactivo del aminoácido terminal no protegido. El grupo amino de carbono α reactivo del aminoácido terminal no protegido puede modificarse con un reactivo de pegilación. A continuación, la glucoproteína eritropoyetina terminalmente modificada de cadena lateral protegida se desprotege en los grupos de cadena lateral para formar una glucoproteína eritropoyetina recombinante terminalmente modificada (=pegilada).

- 40 Por lo tanto, la invención también se refiere a un procedimiento que comprende:

- a) la expresión y preferentemente la fermentación libre de suero, de una proteína EPO recombinante que comprende una extensión peptídica N-terminal que comprende un sitio de corte proteolítico, b) la protección de los grupos ϵ -amino, c) el corte proteolítico de la extensión peptídica N-terminal, d) la pegilación del grupo ϵ -amino N-terminal, e) la desprotección de los grupos ϵ -amino de la glucoproteína eritropoyetina, f) en la que opcionalmente después de cada una de las etapas anteriormente indicadas puede realizarse una etapa de purificación.

- 50 La invención también se refiere al procedimiento anteriormente indicado, en el que la EPO recombinante comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos mostradas en las figuras 1 a 5. Los grupos ϵ -amino pueden protegerse mediante una citraconilación y el grupo α -amino N-terminal puede pegilarse con:



(II)

en la que R, m y x son tal como se ha definido anteriormente.

En mayor detalle, las etapas anteriormente indicadas pueden llevarse a cabo de la manera siguiente:

5

A) Expresión, fermentación y purificación de la EPO modificada:

Los métodos de clonación y expresión de EPO y las moléculas relacionadas con EPO son conocidos de la técnica. La eritropoyetina humana (EPO) es una glucoproteína humana que estimula la formación de los eritrocitos. Se describen su preparación y aplicación terapéutica en detalle en, por ejemplo, las patentes US nº 5.547.933 y nº 5.621.080, EP nº B 0 148 605; Huang S.L., Proc. Natl. Acad. Sci. 2708-2712, 1984, EP nº B 0 205 564, EP nº B 0 209 539 y EP nº B 0 411 678, así como Lai P.H. *et al.*, J. Biol. Chem. 261:3116-3121, 1986, y Sasaki H. *et al.*, J. Biol. Chem. 262:12059-12076, 1987. La eritropoyetina para usos terapéuticos puede producirse por medios recombinantes (patentes EP nº B 0 148 605, EP nº B 0 209 539, y Egrie J.C., Strickland T.W., Lane J. *et al.* Immunobiol. 72: 213-224, 1986).

10

15

Los métodos para la expresión y preparación de la eritropoyetina en medio libre de suero se describen en, por ejemplo, la patente WO nº 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996, y en la publicación de patente europea nº 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992. Además de las publicaciones mencionadas anteriormente, es conocido que puede llevarse a cabo una fermentación libre de suero de células CHO recombinantes que contienen un gen EPO. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente EP nº A 0 513 738, EP nº A 0 267 678, y en una forma general, en Kawamoto T. *et al.*, Analytical Biochem. 130:445-453, 1983, solicitud de patente EP nº A 0 248 656, Kowar J. y Franek F., Methods in Enzymology 421:277-292, 1986, Bavister B., Exp. Zoology 271:45-51, 1981, solicitudes de patente EP nº A 0 481 791, EP nº A 0 307 247, EP nº A 0 343 635 y WO nº 88/00967.

20

25

Los métodos de purificación de la eritropoyetina y derivados de la misma también son conocidos de la técnica.

En la solicitud de patente EP nº A 0 267 678, se describen una cromatografía de intercambio iónico en sefarsa S, una HPLC preparativa de fase inversa en una columna C₈, y una cromatografía de filtración en gel, para la purificación de EPO producida en cultivo libre de suero tras la diálisis. A este respecto, la etapa de cromatografía de filtración en gel puede sustituirse por la cromatografía de intercambio iónico en sefarsa S-fast flow. También se propone realizar una cromatografía de pigmentos en una columna de azul de trisacrilo antes de la cromatografía de intercambio iónico.

30

Se describe un procedimiento para la purificación de la EPO recombinante en Nobuo I. *et al.*, J. Biochem. 107:352-359, 1990. En este procedimiento, sin embargo, se trata la EPO con una solución de Tween[®] 20, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, etilmaleimida, pepstatina A, sulfato de cobre y ácido oxámico antes de las etapas de purificación. Algunas publicaciones, incluyendo la patente WO nº 96/35718 de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996, da a conocer un procedimiento para la preparación de eritropoyetina en un procedimiento de fermentación libre de suero (EPOsf).

35

B) Reacción con un agente protector para proteger selectivamente grupos amino de cadena lateral reactivos: Preparación de EPO modificada protegida

Los agentes protectores químicos adecuados forman enlaces en aminas de cadena lateral no protegidas y son menos estables y diferentes de aquellos enlaces en el extremo N-terminal. Se conoce un gran número de agentes protectores químicos (ver, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP nº 651.761). Resultan preferentes los anhídridos cíclicos de ácido dicarboxílico tales como los anhídridos maleico o citraconílico.

40

La citraconilación es el método preferente en el caso de que las propiedades del polipéptido o proteína de fusión diana (en la presente memoria denominado EPO modificada) acepten condiciones ligeramente alcalinas para la protección y condiciones ácidas para la desprotección (Dixon H.B.F. y Perham R.N., Biochem. J. 109(2):312-14, 1968; Atassi M.Z., Habeeb, A.F.S.A., Methods Enzymol. 25(parte B):546-53, 1972).

45

Opcionalmente, la EPO modificada protegida puede purificarse antes de llevar a cabo la etapa siguiente.

Corte proteolítico de EPO modificada protegida: Preparación de EPO protegida

Las proteasas adecuadas para el corte de las proteínas de fusión se indican en Carter P., Site-specific proteolysis of fusion proteins, en: Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes, ACS, Washington DC, páginas 181 a 193, 1990. Dichas proteasas requieren una estrecha especificidad para cortar selectivamente en su secuencia de reconocimiento y no en otros sitios en la secuencia de la proteína diana. Son ejemplos el factor Xa, que corta en IEGR↓, y la enteroquinasa, que corta en DDDDK↓. Además, se informa de que la enteroquinasa corta DDDDK↓AP, lo que indica especificidad en el sitio P1' y P2' para las interleuquinas (P. Carter). Sin embargo, la enteroquinasa no resulta preferente en el caso de que deban introducirse agentes protectores químicos para proteger los grupos ε-amino de cadena lateral de las lisinas. En este caso, el enzima ya no funcionaría en el sitio de corte deseado.

Entre otras, la proteasas de IgA resulta útil, cortando preferentemente en PP↓XP (X = T, S, A). La secuencia de XP permite que resulte adecuada para las interleuquinas y la eritropoyetina (EP nº 513073). Otra proteasa adecuada es la variante BPN' de la subtilisina (Genenase™, Genencor Int. Inc.), que corta en HY↓.

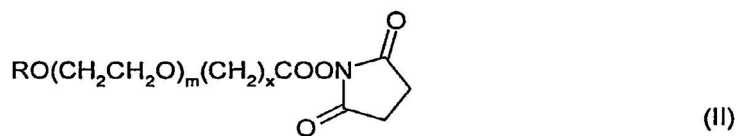
Opcionalmente, la proteína EPO protegida puede purificarse en esta etapa.

D) Modificación con un reactivo de pegilación.

La EPO humana contiene nueve grupos amino libres, el grupo amino amino-terminal más los grupos ε-amino de 8 residuos de lisina. En el caso de que el reactivo de pegilación sea un compuesto SBA de fórmula II, se ha encontrado que a pH 7,5, a una proporción de proteína:PEG de 1:3 y a una temperatura de reacción de entre 20°C y 25°C, se produce una mezcla de especies monopegiladas, dipegiladas y cantidades traza de especies tripegiladas en la reacción con EPO. La EPO pegilada puede administrarse en forma de una mezcla, o en forma de las diferentes especies pegiladas separadas mediante cromatografía de intercambio catiónico. Mediante la manipulación de las condiciones de reacción (por ejemplo la proporción de reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteínas, el tiempo de reacción, etc.), pueden modificarse las cantidades relativas de las diferentes especies pegiladas.

Mediante la utilización de los procedimientos especificados en la presente memoria para la EPO protegida, únicamente se pega el grupo α-amino N-terminal de la alanina N-terminal de la EPO protegida. Debido a la protección de todos los grupos ε-amino de las cadenas laterales de la lisina, no se forman EPOs protegidas mediante dipegilación u oligopegilación.

El compuesto de fórmula I puede prepararse a partir de material polimérico conocido:



en la que R y m son tal como se ha indicado anteriormente, mediante la condensación del compuesto de fórmula II con la glucoproteína eritropoyetina de la etapa c). Los compuestos de fórmula II en la que x es 3 son alfa-alcoxi inferior, ésteres succinimidilo de ácido butírico de poli(etilenglicol) (alcoxi inferior-PEG-SBA). Los compuestos de fórmula II en la que x es 2 son alfa-alcoxi inferior, succinimidil-ésteres de ácido butírico de poli(etilenglicol) (alcoxi inferior-PEG-SBA). Puede utilizarse cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción indicada anteriormente, el éster succinimidilo ejemplificado es un grupo saliente que provoca la formación de amida. La utilización de ésteres succinimidilo tales como los compuestos de fórmula II para producir conjugados con proteínas se da a conocer en la patente US nº 5.672.662, publicada el 30 de septiembre de 1997 (Harris *et al.*).

La reacción de pegilación puede llevarse a cabo en una proporción molar de 1:5 (EPO a reactivo PEG-SBA) hasta una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. El reactivo de pegilación preferente es un metoxi-PEG-SBA, que es un compuesto de fórmula II en la que R es metilo, x es 3, y m presenta un valor entre 650 y 750 (media de aproximadamente 730, correspondiente a un peso molecular medio de aproximadamente 32 kDa, el reactivo metoxi-PEG-SBA se encuentra disponible comercialmente: Shearwater Polymers, Inc.).

La purificación del producto de reacción a partir de la mezcla de reacción puede llevarse a cabo mediante purificación cromatográfica convencional tal como se describe en los Ejemplos.

E) Desprotección de grupos ε-amino (grupos amino de cadena lateral):

5 El corte de los agentes de protección puede conseguirse mediante métodos convencionales (ver anteriormente). En el caso de la descitraconilación, la desprotección de la proteína puede llevarse a cabo mediante agitación de la solución a un pH bajo, por ejemplo 2,5, durante 5 horas a temperatura ambiente. La reacción puede detenerse mediante ajuste del pH a 4,5 con hidróxido sódico y se almacenó la solución bajo congelación a -20°C hasta el momento de la purificación.

10 La purificación del producto de reacción a partir de la mezcla de reacción puede llevarse a cabo mediante purificación cromatográfica convencional tal como se describe en los Ejemplos.

15 La actividad específica de EPO o de conjugados de EPO según la presente invención puede determinarse mediante diversos ensayos conocidos de la técnica. La actividad biológica de las proteínas EPO purificadas de la presente invención permite que la administración de la proteína EPO mediante inyección en pacientes humanos resulte en que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos en comparación con grupos de sujetos no inyectados o de control. La actividad biológica de las proteínas EPO o fragmentos de las mismas obtenidos y purificados según la presente invención puede someterse a ensayo mediante métodos según Annable *et al.*, Bull. Wld. Hlth. Org. 47:99-112, 1972, Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997 (2).
20 Otro ensayo biológico para determinar la actividad de la proteína EPO, el ensayo de ratón normocitémico, se describe en el Ejemplo 4.

25 Los conjugados según la presente invención pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva en pacientes del mismo modo en que se administra la EPO. La cantidad terapéuticamente efectiva es aquella cantidad de conjugado necesaria para la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos. La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencia sometida a factores tales como el tipo exacto de condición bajo tratamiento, la condición del paciente bajo tratamiento, así como los demás ingredientes en la composición. Por ejemplo, pueden administrarse entre 0,01 y 10
30 pg por kg de peso corporal, preferentemente entre 0,1 y 3 pg por kg de peso corporal, por ejemplo una vez a la semana.

La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas correspondientes que comprenden un conjugado tal como se ha indicado anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen el conjugado pueden formularse a una concentración que resulte efectiva para la administración por diversos medios en un paciente humano que experimenta trastornos sanguíneos caracterizados por una producción baja o defectuosa de glóbulos rojos. Las cantidades terapéuticamente efectivas medias del conjugado pueden variar y en particular deben basarse en las recomendaciones y prescripción de un
40 médico cualificado.

Los productos de glucoproteína eritropoyetina preparados según la presente invención pueden prepararse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, se han descrito composiciones apropiadas en las patentes
45 WO n° 97/09996, n° 97/40850, n° 98/58660 y n° 99/07401. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden formularse en tampón de fosfato sódico/potásico 10 mM a pH 7 que contenga un agente de tonicidad, por ejemplo cloruro sódico 132 mM. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener un conservante. La composición farmacéutica puede contener diferentes cantidades de eritropoyetina, por ejemplo 10 a 10.000 pg/ml, por ejemplo 50 pg/ml ó 400 pg/ml.

50 Preferentemente, la composición farmacéutica comprende un conjugado tal como se ha definido anteriormente, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado para mantener el pH de la solución dentro de un intervalo de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo la composición comprende entre aproximadamente 10 pg y
55 aproximadamente 10.000 pg de conjugado de eritropoyetina en cada ml, entre 10 y 200 mmoles/l de sulfato, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mmoles/l de fosfato, pH 6,0 a 6,5, opcionalmente CaCl₂ hasta 1 mM, y opcionalmente entre aproximadamente 1% y 5% de un poliol. Son ejemplos de composiciones adecuadas:

- 60 a) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0,
b) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2,

- c) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3%, pH 6,2,
- d) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3%,
- 5 CaCl₂ 7,5 pM, pH 6,2,
- e) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, arginina 50 mM, sulfato sódico 100 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 6,2, y
- f) 50 pg/ml ó 400 pg/ml de conjugado de eritropoyetina, arginina 50 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3%, CaCl₂ 1 mM, pH 6,2.

10 Una composición preferente adicional puede comprender entre 10 y 10.000 pg/ml de eritropoyetina, preferentemente entre 25 y 2.500 pg/ml de eritropoyetina, y

- a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó
- 15 b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó
- c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3% (p/v), pH 6,2 ó
- d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3% (p/v), metionina 10 mM, F68 plurónico al 0,01% (p/v), pH 6,2 ó
- e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3% (p/v), pH 6,2 ó
- 20 f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3% (p/v), metionina 10 mM, F68 plurónico al 0,01% (p/v), pH 6,2.

25 En la realización más preferente, las composiciones comprenden una cantidad de proteína eritropoyetina de 50, 100, 400, 800 ó 2.500 pg/ml. Las composiciones más preferentes comprenden fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3% (p/v), metionina 10 mM, F68 plurónico al 0,01% (p/v), pH 6,2 ó arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3% (p/v), metionina 10 mM, F68 plurónico al 0,01% (p/v), pH 6,2.

30 Los conjugados de la presente invención resultan especialmente útiles para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento o profilaxis de enfermedades correlacionadas con la anemia en los pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), SIDA y para el tratamiento de pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia.

35 La invención también se refiere a la utilización de un conjugado tal como se ha definido anteriormente para la preparación de medicamentos, especialmente para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento o profilaxis de enfermedades correlacionadas con la anemia en pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), SIDA o para el tratamiento de pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia.

40 Una realización adicional de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de trastornos que implican anemia en los pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), SIDA y en pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia, que comprende la etapa de administrar en un paciente un conjugado, tal como se ha indicado anteriormente.

45 La invención se refiere también a compuestos tal como se ha definido anteriormente, para el tratamiento de enfermedades que se asocian a la anemia en los pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), SIDA y en los pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia.

Otro aspecto de la presente invención comprende los compuestos anteriormente indicados en el caso de que se hayan preparado mediante un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

50 Una realización adicional de la invención se refiere a glucoproteínas de eritropoyetina que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las figs. 1 y 2, que presentan una extensión peptídica N-terminal que representa un sitio de corte proteolítico, que opcionalmente comprenden una etiqueta N-terminal de purificación. Son ejemplos de dichos péptidos APPRIEGR-EPO, APP-EPO y APPGAAHY-EPO (ver también las figuras 3 a 5). Una realización de la invención se refiere a glucoproteínas de eritropoyetina que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las figuras 3 a 5.

55 La invención se entenderá mejor haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que ilustran, aunque sin limitación, la invención descrita en la presente memoria.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1: expresión, fermentación y purificación de EPO modificada****(1) Expresión de constructos de EPO modificados****5 a) Reactivos**

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos bioquímicos utilizados se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania), y todos los reactivos de cultivo celular, de Gibo-BRL (Eggenstein, Alemania).

b) Clonación del constructo de expresión de EPO de tipo salvaje.

10 Para la expresión estable en células de ovario de hámster chino (CHO), se modificaron vectores de expresión eucariótica estándares tales como pcDNA3 (Invitrogen BV, Groningen, Países Bajos), pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) mediante la sustitución del gen *neo* codificante de la resistencia a G418 con el gen codificante de la deshidrofolato reductasa (DHFR) de ratón (Crouse *et al.*, J. Biol. Chem. 257:7887-7897, 1982), el nivel de expresión del cual se encuentra controlado por el promotor temprano del virus 40 del simio (SV40) y su señal de poliadenilación tardía. En el caso de pcDNA3, el vector resultante se denominó p11382 (M. Tacke *et al.* Hepatology 26:1626-1633, 1997).

15 El fragmento codificante de eritropoyetina de tipo salvaje puede obtenerse según los métodos conocidos de la técnica, por ejemplo tal como describen Jacobs K. *et al.*, Nature 313:806-10, 1985. Preferentemente, el fragmento codificante se amplifica utilizando los cebadores EPO-EcoRI 5'-GAGCCTGAATTCACCACC y EPO-Sall 5'-AGGTGGGTCCGACCTGGTCATCTGTCCCCTG. Se digirió el fragmento de PCR con EcoRI y Sall (los sitios se encuentran subrayados en las secuencias de los cebadores) y se clonaron en el sitio de clonación múltiple del fragmento de vector pCI-dhfr predigerido. Por lo tanto, la expresión del gen EPO se encuentra bajo el control de la región intensificadora/promotora inmediata-temprana del citomegalovirus (CMV) humano, un intrón quimérico optimizado para la expresión regulada y la señal de poliadenilación tardía de SV40.

25

c) Clonación del constructo de expresión APPRIEGR-EPO

Se construyó el péptido APPRIEGR en forma de fragmento NarI de ADN a partir de dos oligonucleótidos hibridados, APPRIE-GRfor: 5'-CGCCCCCCCCGAATCGAGGGCCG, y APPRIEGRrev: 5'-CGCGGCCCTCGATTCGGGGGGGG (los restos del sitio de NarI se encuentran subrayados), y se clonaron entre la secuencia de señal N-terminal y la región codificante de la EPO madura.

30

d) Clonación del constructo de expresión APP-EPO

Se construyó el péptido APP en forma de fragmento NarI de ADN a partir de dos oligonucleótidos hibridados, APPfor: 5'-CGCCCCCCC y APPrev: 5'-CGGGGGGGG (los restos del sitio de NarI se encuentran subrayados), y se clonaron entre la secuencia de señal N-terminal y la región codificante de la EPO madura.

35

e) Clonación del constructo de expresión APPGAAHY-EPO

Se construyó el péptido APPGAAHY en forma de fragmento NarI de ADN a partir de dos oligonucleótidos hibridados, APP-GAAHYfor: 5'-CGCCCCCCCCGCGCCGCCCACTA, y APPGAAHYrev: 5'-CGTAGT GGGCGGC GCCGG GGGGGG (los restos del sitio de NarI se encuentran subrayados), y se clonaron entre la secuencia de señal N-terminal y la región codificante de la EPO madura.

40

f) Procedimientos de cultivo celular

45 La línea celular mutagenizada CHO/dhfr⁻ (ATCC n° CRL-9096) deficiente en el gen del enzima dhfr se obtuvo de la American Type Tissue Collection (Manassas, VA, USA). Las células no transfectadas se cultivaron en α -MEM, suero de feto bovino (FCS) al 5% dializado y glutamina 2 mM. Las células se transfectaron con los plásmidos de EPO utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6. Las células transfectadas se seleccionaron en nucleósidos con deficiencia de α -MEM (α -MEM) suplementado con FCS al 10% dializado y glutamina 2 mM. Se aislaron colonias individuales mediante FACS, se expandieron y los sobrenadantes de cultivo se sometieron a ensayo para la producción y secreción de EPO mediante ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Los niveles de expresión de EPO se incrementaron varias veces mediante la amplificación de los genes de dhfr y de EPO en medio de cultivo que contenía concentraciones incrementadas de metotrexato (MTX, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,

50

USA).

(2) Fermentación

5 A continuación se describe la fermentación y purificación de una EPO modificada.

Preparación del inóculo y fermentación

10 Se obtuvo un vial del Cell Bank, originado a partir de una línea celular CHO productora de EPO modificada (línea celular huésped: ATCC nº CRL-9096, deficiencia en el gen del enzima dhfr) de la fase vapor del tanque de almacenamiento en nitrógeno líquido. Las células se transfirieron a matraces giratorios de vidrio y se cultivaron en un medio tamponado con hidrogenocarbonato en un incubador de CO₂ humidificado. Los medios libres de suero típicos utilizados para la preparación del inóculo y la fermentación se dan a conocer en la solicitud de patente europea nº 513 738, de Koch, publicada el 12 de junio de 1992, o en la patente WO nº 96/35718, de Burg, publicada el 14 de

15 noviembre de 1996, y contienen como medio, por ejemplo, DMEM/F12 (por ejemplo de JRH Biosciences/Hazleton Biologics, Denver, US, nº de orden 57-736) y además hidrogenocarbonato sódico, L-glutamina, D-glucosa, insulina recombinante, selenita sódica, diaminobutano, hidrocortisona, sulfato de hierro (II); asparaginasa, ácido aspártico, serina y un estabilizador para las células de mamífero, tales como, por ejemplo, alcohol polivinílico, metilcelulosa, polidextrano, polietilenglicol, Pluronic F68, expansor del plasma poligelina (HEMACCEL[®] o polivinilpirrolidona

20 (patente WO nº 96/35718).

Los cultivos se comprobaron microscópicamente para la ausencia de microorganismos contaminantes, y se determinaron las densidades celulares. Dichos ensayos se llevaron a cabo en cada etapa de división.

25 Tras el periodo inicial de crecimiento, se diluyó el cultivo celular con medio fresco hasta la densidad celular inicial y se sometió a otro ciclo de crecimiento. Se repitió este procedimiento hasta obtener un volumen de cultivo de aproximadamente 2 l en cada matraz giratorio de vidrio. Tras aproximadamente 12 duplicaciones, se disponía de 1 a 5 litros de dicho cultivo, que seguidamente se utilizaron como inóculo para el fermentador 101 del inóculo.

30 Tras 3 a 5 días, se pudo utilizar el cultivo en el fermentador 101 a modo de inóculo para el fermentador 1001 de inóculo.

Tras 3 a 5 días adicionales de cultivo, pudo utilizarse el cultivo en el fermentador 1001 a modo de inóculo para un fermentador de producción 10001.

35 Recolección y separación celular

Se utilizó un procedimiento de realimentación por lotes, es decir, tras alcanzar la densidad celular deseada, se recolectó aproximadamente 80% del cultivo. Se repuso el cultivo restante con medio de cultivo fresco y se cultivó hasta la próxima recolección. Una serie de producción consistía de un máximo de 10 recolecciones consecutivas: 9 recolecciones parciales y 1 recolección total al final de la fermentación. La recolección tuvo lugar cada 3 a 4 días.

40 El volumen de recolección determinado se transfirió a un recipiente enfriado. Las células se separaron mediante centrifugación o filtración y se descartaron. El sobrenadante que contenía la EPO modificada de la etapa de centrifugación se filtró en línea y se recogió en un segundo recipiente enfriado. Cada recolección se procesó separadamente durante la purificación. A continuación se explica un procedimiento de purificación típico de la

45 proteína EPO modificada.

(3) Purificación de las EPOs modificadas

Un procedimiento típico para la purificación de la proteína EPO se da a conocer en la patente WO nº 96/35718, de Burg, publicada el 14 de noviembre de 1996. El procedimiento de purificación resulta aplicable a las EPOs

50 modificadas y se explica a continuación:

(1) Cromatografía en azul de sefarosa

El azul de sefarosa (Pharmacia) consiste de perlas de sefarosa en la superficie de las cuales se ha unido covalentemente pigmento Cibracron azul. Debido a que la EPO modificada se une más fuertemente al azul de sefarosa que a la mayor parte de los contaminantes no proteicos e impurezas proteicas, puede enriquecerse en EPO modificada en esta etapa. La elución de la columna de azul de sefarosa se lleva a cabo incrementando la

55 concentración salina así como el pH.

Se rellena la columna con azul de sefarosa, se regenera con NaOH y se equilibra con tampón de equilibración (cloruro sódico/cálcico y acetato sódico). Se carga el sobrenadante de fermentador acidificado y filtrado. Tras completarse la carga, se lava la columna en primer lugar con un tampón similar al tampón de equilibración que contiene una concentración más alta de cloruro sódico y seguidamente con un tampón de base Tris. El producto se eluye con un tampón de base Tris que contiene NaCl 1 M y se recoge en una única fracción.

(2) Cromatografía en butil-Toyopearl

El butil-Toyopearl 650 C (Toso Haas) es una matriz basada en poliestireno a la que se acoplan covalentemente residuos de butilo alifático. Debido a que la EPO modificada se une más fuertemente a este gel que la mayor parte de las impurezas, puede eluirse con un tampón que contiene isopropanol.

La columna se empaqueta con butil-Toyopearl 650 C, se regenera con NaOH, se lava con un tampón de base Tris y se equilibra con un tampón de base Tris que contiene isopropanol.

El eluido de azul de sefarosa se ajusta a la concentración de isopropanol en el tampón de equilibración de la columna y se carga en la misma. A continuación, se lava la columna con tampón de equilibración con una concentración incrementada de isopropanol. Se eluye el producto con tampón de elución (tampón de base Tris con un contenido elevado de isopropanol) y se recoge en una única fracción.

(3) Cromatografía de hidroxapatito-ultrogel

El hidroxapatito UltrogelTM (Biosepra) consiste de hidroxapatito que se incorpora en una matriz de agarosa para mejorar las propiedades mecánicas, la EPO modificada presenta una afinidad baja para el hidroxapatito y por lo tanto puede eluirse a concentraciones de fosfato más bajas que las impurezas proteicas.

Se rellena la columna con hidroxapatito-Ultrogel y se regenera con un tampón de fosfato potásico/cloruro cálcico y NaOH seguido de un tampón de base Tris. A continuación, se equilibra con un tampón de base Tris que contiene una cantidad reducida de isopropanol y cloruro sódico.

El eluido que contiene la EPO modificada de la cromatografía en butilo-Toyopearl se diluye con tampón de base Tris y se carga en la columna. A continuación, se lava la columna con tampón de equilibración y un tampón de base Tris sin isopropanol ni cloruro sódico. El producto se eluye con un tampón de base Tris que contiene una concentración reducida de fosfato potásico y se recoge en una única fracción.

El eluido de la columna de hidroxapatito-Ultrogel se concentra y se somete a diafiltración frente a tampón de citraconilación. La concentración/diafiltración se llevó a cabo con un sistema LabScaleTM TFF de Millipore dotado de una membrana Pellicon XL de Millipore de 10 kDa de corte.

EJEMPLO 2: Citraconilación de EPO modificada, corte proteolítico y purificación de la EPO protegida.

Se ajustó la solución de EPO modificada a pH 8,5-9,0 y se agitó a temperatura ambiente. Se añadió anhídrido citracónico (Merck 8.41321.0100) lentamente a la solución bajo agitación en alícuotas; se mantuvo un pH de 9,0 mediante la adición de NaOH 0,5 N con un pH-stat. La cantidad total de anhídrido citracónico corresponde a un exceso molar de 5 veces respecto a los grupos ϵ -amina de las lisinas en la EPO modificada. Tras completar la adición de anhídrido citracónico, se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó el anhídrido citracónico residual mediante la adición de solución de etanolamina 2 M, ajustada a pH 9,0.

Se llevó a cabo el corte de la EPO protegida modificada mediante la adición de la proteasa de corte. En el caso del constructo indicado en el Ejemplo 1(1c), se añadió factor Xa (Roche Molecular Biochemicals, número de orden 602388) a la EPO modificada 1:100 (p/p) y se agitó a temperatura ambiente durante varias horas. Se controló el avance del corte tomando muestras y realizando ensayos para identificar los productos de corte. En caso de una tasa de división excesivamente baja, puede incrementarse la cantidad de proteasa.

En caso de aplicar otras proteasas, tales como la proteasa de IgA (preparada tal como se describe en la patente EP nº 513.073) y la GenenaseTM (Genencor Int. Inc.), se lleva a cabo el procedimiento de la manera correspondiente.

La eliminación de la proteasa de la mezcla de reacción se lleva a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en SuperdexTM 75 pg (Pharmacia) o mediante RP-HPLC.

El material Superdex 75 pg consiste de perlas de agarosa y de dextrano entrecruzados. Tras el empaquetamiento, la columna se regeneró con NaOH y se equilibró con un sistema de tampón fosfato con cloruro sódico 100 mM.

La mezcla de reacción de la etapa anterior se concentró a 10 mg/ml en un sistema Labscale™ TFF de Millipore dotado de una membrana Pellicon XL de Millipore de 10 kDa de corte. Se aplicó aproximadamente 1% a 5% del volumen de columna de esta solución a la columna en una etapa. Se llevó a cabo la cromatografía en el sistema de tampón de equilibración. Se recogió el producto en fracciones que se agruparon de acuerdo con su pureza según el análisis mediante rpHPLC analítica.

Las fracciones agrupadas se concentraron a 7-8 mg/ml en un sistema Labscale™ TFF de Millipore dotado de una membrana Pellicon XL de Millipore de 10 kDa de corte.

10 **EJEMPLO 3: Preparación de EPO pegilada N-terminalmente**

La reacción de pegilación se llevó a cabo en una proporción molar de 1:5 (EPO protegida a reactivo PEG-SBA) hasta una concentración final de proteínas de 5 mg/ml. El reactivo de pegilación utilizado era un metoxi-PEG-SBA, que es un compuesto de fórmula II en la que R es metilo, x es 3, y m presenta un valor entre 650 y 750 (media de aproximadamente 730, correspondiente a un peso molecular medio de aproximadamente 32 kDa).

15 Se disolvió PEG de 30 kDa-SBA (Shearwater Polymers, Inc.) en HCl 1 mM. Se añadió suficiente tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,5, para alcanzar una concentración final de fosfato de 20 mM en la mezcla de reacción. Se añadió EPO protegida (aproximadamente 3 mg/ml en la mezcla de reacción) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente (20°C a 25°C). Tras 2 horas, se detuvo la reacción mediante ajuste del pH a 2,5 con ácido.

20 La descitraconilación de la proteína se llevó a cabo mediante agitación de la solución a un pH de 2,5 durante 5 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante ajuste del pH a 4,5 con hidróxido sódico y la solución se almacenó bajo congelación a -20°C hasta el momento de la purificación.

25 La separación de la EPO pegilada N-terminalmente (PEG-A1-EPO) del exceso de reactivos, productos secundarios de reacción y EPO no pegilada se llevó a cabo mediante cromatografía en SP-sefarosa FF (Pharmacia). El material de SP-sefarosa consiste de grupos sulfopropilo (SP) que se encuentran unidos covalentemente a la superficie de las perlas de sefarosa. La columna se rellena con SP-sefarosa y se regenera con ácido fosfórico y NaOH, y se equilibra con un tampón de acetato sódico.

30 La mezcla de reacción de la etapa anterior se diluye 1:5 con tampón de acetato sódico, pH 3, y se aplica a la columna de SP-sefarosa. La columna se lava con tampón de equilibración para eliminar el exceso de reactivos y los productos secundarios de reacción. Seguidamente se realiza un lavado con NaCl 100 mM. A continuación, se eluye el PEG-A1-EPO con NaCl 200 mM. El producto se recoge en fracciones que se agrupan de acuerdo con su pureza según se determina mediante cromatografía de alto rendimiento de exclusión por tamaño. La EPO no pegilada que queda en la columna se eluye con NaCl 750 mM.

35 A continuación, la fracción de PEG-A1 EPO se concentra hasta ~4,5-7,5 mg/ml y se somete a diafiltración en el tampón de almacenamiento, fosfato potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. La concentración/diafiltración se llevó a cabo con un sistema Labscale™ TFF de Millipore dotado de una membrana Pellicon XL Biomax de Millipore de 10 kDa de corte. La PEG-A1 EPO concentrada se filtra a esterilidad y se almacena bajo congelación a -20°C.

EJEMPLO 4: Actividad *in vivo* de PEG-A1-EPO determinada mediante el ensayo en ratones normocitémicos

40 El bioensayo en ratones normocitémicos es conocido de la técnica (Pharm. Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2)) y se conoce un método a partir de la monografía de la eritropoyetina de Ph. Eur. BRP. Las muestras se diluyeron con BSA-PBS. En ratones sanos normales de 7 a 15 semanas de edad se administraron s.c. 0,2 ml de la solución de PEG-A1-EPO de los Ejemplos 1 a 3, solución de EPO y tampón a modo de control. Durante un periodo de 6 días se extrajo sangre mediante punción de la vena de la cola y se diluyó de manera que hubiera 1 µl de sangre en 1 ml de una solución de tinción de naranja de acridina 0,15 µmolar. El tiempo de tinción fue de 3 a 10 minutos. Se llevaron a cabo los recuentos de reticulocitos microfluorimétricamente en un citómetro de flujo mediante análisis del histograma de fluorescencia roja. Los recuentos de reticulocitos se proporcionan en términos de números absolutos (por cada 30.000 células sanguíneas analizadas). Para la obtención de los datos presentados, cada grupo consistía de 5 ratones cada día, y los ratones se sangraron únicamente una vez.

Se muestran los resultados en la Tabla 1.

Los resultados muestran la actividad superior y la vida media prolongada de las especies de PEG-A1-EPO, indicadas por las cantidades significativamente incrementadas de reticulocitos y el desplazamiento del máximo del recuento de reticulocitos con la misma dosis por ratón (100 ng) en comparación con los resultados con la EPO derivada a partir de células CHO.

Tabla 1

	EPO	PEG-A1-EPO	Tampón de control
72h	2404	2911	857
96h	1814	3713	697
120h	901	no medida	701
144h	536	3424	708

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 [0118]

Figura 1: Estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos).

Figura 2: Estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos).

10

Figura 3: Estructura primaria y secuencia de ácidos nucleicos correspondiente de la APPRIEGR-EPO. La secuencia de aminoácidos subrayada corresponde a la secuencia de la señal de secreción; la línea ondulada, a la secuencia de aminoácidos específica del sitio de corte proteolítico.

15

Figura 4: Estructura primaria y secuencia de ácidos nucleicos correspondiente de la APP-EPO. La secuencia de aminoácidos subrayada corresponde a la secuencia de la señal de secreción; la línea ondulada, a la secuencia de aminoácidos específica del sitio de corte proteolítico.

20

Figura 5: Estructura primaria y secuencia de ácidos nucleicos correspondiente de la APPGAAHY-EPO. La secuencia de aminoácidos subrayada corresponde a la secuencia de la señal de secreción; la línea ondulada, a la secuencia de aminoácidos específica del sitio de corte proteolítico.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 [0119]

- <110> Hoffmann-La Roche AG
- <120> Conjugados de eritropoyetina
- <130> Case 20805
- <160> 5
- 30 <170> Patent In versión 3.1
- <210> 1
- <211> 165
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 35 <400> 1

ES 2 361 824 T3

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

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His
 20 25 30
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe
 35 40 45

ES 2 361 824 T3

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

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

5 <213> CHO/dhfr-

<400> 3

ES 2 361 824 T3

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

<210> 4

<211> 169

<212> PRT

5 <213> CHO/dhfr-

<400> 4

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

<210> 5

<211> 174

<212> PRT

5 <213> CHO/dhfr-

<400> 5

Ala Pro Pro Gly Ala Ala His Tyr Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp
 1 5 10 15
 Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn
 20 25 30
 Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr
 35 40 45
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val
 50 55 60
 Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp
 85 90 95

Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser
			100					105					110		
Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser
		115					120					125			
Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp
	130					135					140				
Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	Arg	Gly	Lys
145					150					155					160
Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	Arg		
				165					170						

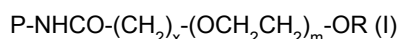
REIVINDICACIONES

1. Conjugado, comprendiendo dicho conjugado una glucoproteína eritropoyetina que presenta un grupo α -amino N-terminal y que presenta la actividad biológica *in vivo* de causar que las células de médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos, y seleccionado de entre el grupo que consiste de eritropoyetina humana y análogos de la misma, que presenta la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación o una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación, en el que la reorganización comprende una delección de cualquiera de los sitios de carbohidrato N-ligado en la eritropoyetina humana y/o una adición de la posición 88 del sitio de carbohidrato N-ligado de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana, estando dicha glucoproteína unida covalentemente a un grupo poli(etilenglicol) de fórmula:



- formando el -CO del grupo poli(etilenglicol) un enlace amida con dicho grupo α -amino N-terminal, en el que R es un grupo alquilo lineal o ramificado que presenta entre 1 y 6 átomos de carbono, x es 2 ó 3, y m presenta un valor entre aproximadamente 450 y aproximadamente 1.350.

2. Conjugado según la reivindicación 1, de fórmula:



- en la que x, m y R son tal como se define en la reivindicación 1, y P es el residuo de la glucoproteína sin el grupo α -amino N-terminal que forma un enlace amida con el grupo poli(etilenglicol).

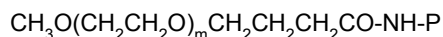
3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R es metilo.

4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que m presenta un valor entre 550 y 1.000.

5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que m presenta un valor entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750.

6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R es metilo y m presenta un valor entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750.

7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que presenta la fórmula:



- en la que m presenta un valor entre 650 y 750, y P es tal como se define en la reivindicación 2.

8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la glucoproteína es una eritropoyetina humana.

9. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la glucoproteína eritropoyetina humana se expresa mediante la activación de un gen endógeno.

10. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la glucoproteína presenta la secuencia mostrada en la fig. 1 ó en la fig. 2.

11. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la glucoproteína presenta la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glucosilación.

12. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la glucoproteína presenta la secuencia de la eritropoyetina humana modificada con una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste de:

5
 10
 15
 20

Asn³⁰ Thr³²;
 Asn⁵¹ Thr⁵³;
 Asn⁵⁷ Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹ Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸ Asn⁶⁹ Thr⁷¹;
 Val⁶⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Gly⁸⁹ Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ Thr⁹²;
 Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹ Thr⁷¹ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 Asn⁶⁹ Ile⁹⁰ Thr⁹¹;
 Ser⁶⁷ Asn⁸⁹ Ile⁹⁰ Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶ Thr¹³⁸;
 Asn¹³⁸ Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; y
 Pro¹²⁴ Thr¹²⁵.

13. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la glucoproteína presenta la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante una reorganización de por lo menos un sitio de glucosilación.

25 14. Conjugado según la reivindicación 13, en el que la reorganización comprende la delección de cualquiera de los sitios de glucosilación N-ligada en la eritropoyetina humana y la adición de un sitio de glucosilación N-ligado en la posición 88 de la secuencia de la eritropoyetina humana.

30 15. Conjugado según la reivindicación 14, en el que la glucoproteína presenta la secuencia de la eritropoyetina humana modificada con una modificación seleccionada de entre el grupo que consiste de:

Gln²⁴ Ser⁶⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰;
 Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰; y
 Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰.

35 16. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 17. Utilización de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la preparación de medicamentos.

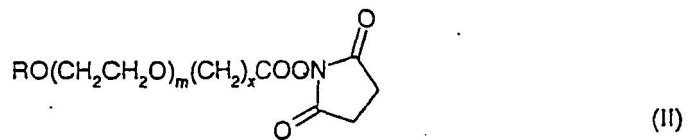
18. Procedimiento para la preparación de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende:

- 45 a) la expresión, y preferentemente la fermentación libre de suero, de una proteína EPO recombinante que comprende una extensión peptídica N-terminal que comprende una secuencia de corte proteolítico
 b) la protección de los grupos ε-amino,
 c) el corte proteolítico de la extensión peptídica N-terminal,
 d) la pegilación del grupo α-amino N-terminal,
 e) la desprotección de los grupos ε-amino de la glucoproteína eritropoyetina,
 50 f) en el que opcionalmente tras cada una de las etapas anteriormente indicadas puede realizarse una etapa de purificación.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la EPO recombinante comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste de las secuencias de aminoácidos mostradas en las figs. 1 a 5.

20. Procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, en el que, en la etapa b), los grupos ϵ -amino se protegen mediante una citraconilación.

5 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que el grupo α -amino N-terminal se pegila con:



en la que R, m y X son tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

10 22. Compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para la utilización en el tratamiento de enfermedades que se asocian a anemia en pacientes de insuficiencia renal crónica (CRF), SIDA y en pacientes de cáncer sometidos a quimioterapia.

Fig. 1

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

Fig. 2

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

Fig. 3

```

GGAATTCACCACCATGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CCTTAAGTGGTGGTACCCACGTGCTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGACAGGGA
      M G V H E C P A W L W L L L S L -
GCTGTCGCTCCCTCTGGGCTCCCAGTCTGCGGCCCGCCCGGAATCGAGGGCCGCGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CGACACGGAGGGAGACCCGAGGGTCAGGACCCGCGGGGGGGGCTTAGCTCCCGGCGCG
L S L P L G L P V L G A P P R I E G R A -
CCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGAGGCCAAGGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGTGGTGGGAGTAGACACTGTCGGCTCAGGACCTCTCCATGGAGAACCTCCGGTTCT
P P R L I C D S R V L E R Y L L E A K E -
GGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCGGCTCTTATAGTGTGCCGACACGACTTGTGACGTGAACTTACTCTTATAGTGACA
A E N I T T G C A E H C S L N E N I T V -
CCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGGTCTGTGGTTTCAATTAAGATACGGACCTTCTCCTACCTCCAGCCCGTCTCCGGCA
P D T K V N F Y A W K R M E V G Q Q A V -
AGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGGAAGCTGTCTGCGGGGCCAGGCCCTGTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCTTCAGACCGTCCCGACCGGGACGACAGCCTTCGACAGGACGCCCGGGTCCGGGACAA
E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L L -
GGTCAACTCTTCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCACTGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCAGTTGAGAAGGGTCGGCACCCCTCGGGACGTCGACGTACACCTATTTCCGGCAGTCACC
V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S G -
CCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCCGGCTCTGGGAGCCAGAAGGAAGCCATCTCCCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGAAGGTCGGAGTGGTGAACGAAGCCGAGACCCCTCGGGTCTTCTTCGGTAGAGGGG
L R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P -
TCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCTCAGCAACATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGTCTACGCCGGAGTCGACGAGGTGAGGCTTGTAGTGACGACTGTGAAAGGCGTTTGA
P D A A S A A P L R T I T A D T F R K L -
CTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GAAGGCTCAGATGAGGTTAAAGGAGGCCCTTTGACTTCGACATGTGTCCCTCCGGAC
F R V Y S N F L R G K L K L Y T G E A C -
CAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTCGAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 629
GTCCTGTCCCCTGTCTACTGGTCCAGCTG
R T G D R *

```

Fig. 4

```

GGAATTCACCACCATGGGGGTGCACGAATGCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CCTTAAGTGGTGGTACCCCACGTGCTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGACAGGGA
      M G V H E C P A W L W L L L S L -
GCTGTGCTCCCTCTGGGCCTCCAGTCTGGGCGCCCCCGCCCCACCACGCCTCAT
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CGACAGCGAGGGAGACCCGGAGGGTCAGGACCCGCGGGGGGGCGGGTGGTGGGAGTA
      L S L P L G L P V L G A P P A P P R L I -
CTGTGACAGCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GACACTGTGCGGCTCAGGACCTCTCCATGGAGAACCTCCGGTCTCCTCCGGCTTTATAGT
      C D S R V L E R Y L L E A K E A E N I T -
GACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCAGACACCAAAGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CTGCCCAGACGACTTGTGACGTGAACTTACTCTTATAGTGACAGGGTCTGTGGTTTCA
      T G C A E H C S L N E N I T V P D T K V -
TAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
ATTAAGATACGGACCTTCTCCTACCTCCAGCCCGTGTCCGGCATCTTCAGACCGTCCC
      N F Y A W K R M E V G Q Q A V E V W Q G -
CCTGGCCCTGTGTGCGAAGCTGTCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTTTCCCA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GGACCGGGACGACAGCCTTCGACAGGACGCCCGGTCCGGGACAACCAAGTTGAGAAGGGT
      L A L L S E A V L R G Q A L L V N S S Q -
GCCGTGGGAGCCCTGCAGTGCATGTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTTCGACGCTCAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CGGCACCCTCGGGGACGTGACGTACACCTATTTGCGCAGTCACCGAAGCGTGGAGTG
      P W E P L Q L H V D K A V S G L R S L T -
CACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCTC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GTGAGACGAAGCCGAGACCCTCGGGTCTTCCCTCGGTAGAGGGGAGGTCTACGCCGGAG
      T L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S -
AGCTGCTCCAATCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCGGCAAACCTTCCGAGTCTACTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCGACGAGGTGAGGCTTGTAGTGACGACTGTGAAAGGCGTTTGAGAAGGCTCAGATGAG
      A A P L R T I T A D T F R K L F R V Y S -
CAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCTGCAGGACAGGGGACAG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GTTAAAGGAGGCCCTTTGACTTCGACATGTGTCCCTCCGGACGTCTGTCCCTGTG
      N F L R G K L K L Y T G E A C R T G D R -
ATGACCAGGTCGAC
601 -----+----- 614
      TACTGGTCCAGCTG
      *

```

Fig. 5

```

GGAATTCACCACCATGGGGGTGCACGAATGTCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CCTTAAGTGGTGGTACCCCCACGTGCTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGACAGGGA
      M G V H E C P A W L W L L L S L -
GCTGTGCTCCCTCTGGGCCTCCAGTCCTGGGCGCCCCCGGCGCCGCCACTACGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CGACAGCGAGGGAGACCCGGAGGGTCAGGACCCGCGGGGGGGCCGCGGCGGGTGTGCG
      L S L P L G L P V L G A P P G A A H Y A -
CCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAGAGGTACCTCTTGAGGCCAAGGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGGTGGTGCAGTAGACACTGTGCGCTCAGGACCTCTCCATGGAGAACCTCCGGTTCCT
      P P R L I C D S R V L E R Y L L E A K E -
GGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCGGCTCTTATAGTGTGCCCGACACGACTTGTGACGTGGAACCTTACTCTTATAGTGACA
      A E N I T T G C A E H C S L N E N I T V -
CCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGCGGCAGCAGGCCGT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGGTCTGTGGTTTCAATTAAGATAACGACCTTCTCCTACCTCCAGCCCGTCCGCGCA
      P D T K V N F Y A W K R M E V G Q Q A V -
AGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGGAAGCTGTCTGCGGGGCCAGGCCCTGTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCTTCAGACCGTCCCGACCGGGACGACAGCCTTCGACAGGACGCCCCGGTCCGGGACAA
      E V W Q G L A L L S E A V L R G Q A L L -
GGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCAGTTGAGAAGGGTCGGCACCCCTCGGGACGTCGACGTACACCTATTTCCGCAGTCACC
      V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S G -
CCTTCGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGAAGCGTCGGAGTGGTGAGACGAAGCCGAGACCCTCGGGTCTTCCTTCGGTAGAGGGG
      L R S L T T L L R A L G A Q K E A I S P -
TCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTTCCGCAAACCT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGTCTACGCCGGAGTCGACGAGGTGAGGCTTGTAGTGACGACTGTGAAAGGCGTTTGA
      P D A A S A A P L R T I T A D T F R K L -
CTTCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GAAGGCTCAGATGAGGTAAAGGAGGCCCTTTCGACTTCGACATGTGTCCCCTCCGGAC
      F R V Y S N F L R G K L K L Y T G E A C -
CAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 629
GTCCTGTCCCCTGTCTACTGGTCCAGCTG
      R T G D R * -

```