



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 651**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03790911 .6**
96 Fecha de presentación : **20.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1536823**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Utilización de la eritropoyetina.**

30 Prioridad: **29.08.2002 EP 02019100**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

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

72 Inventor/es: **Lehmann, Paul;**
Roeddiger, Ralf y
Walter-Matsui, Ruth

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 364 651 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

Utilización de la eritropoyetina

5 La presente invención se refiere a una nueva utilización de la eritropoyetina, especialmente el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes.

10 Se conocen diversas enfermedades en las cuales el metabolismo del hierro no es normal. En algunas anemias, no se puede formar suficiente sangre debido a una falta global de hierro en el organismo. Otra situación metabólica relacionada con el hierro es la hemocromatosis, en la cual la concentración global de hierro en el organismo es superior a la normal, lo cual provoca diversas situaciones tales como, por ejemplo, la destrucción de órganos.

15 Las alteraciones en la distribución del hierro se diferencian de la hemocromatosis y la anemia descritas anteriormente porque la concentración global de hierro en el organismo es normal. Por un lado, el hierro se acumula en diversos órganos y puede provocar lesiones e incluso la destrucción de dichos órganos. Por otro lado, la utilización del hierro, que se encuentra presente en cantidades normales, para la formación de sangre está alterada provocando efectos secundarios comparables a los asociados a la anemia.

20 Hasta ahora, no era conocido que los pacientes afectados de diabetes presentan una elevada probabilidad de presentar alteraciones en la distribución del hierro. Las alteraciones en la distribución del hierro pueden diagnosticarse mediante varios parámetros de los utilizados habitualmente en el diagnóstico del estado del metabolismo férrico. En base a la determinación de la ferritina y del receptor soluble de la transferrina es posible evaluar si la concentración global de hierro en un paciente diabético es normal. En este caso, una concentración disminuida de hemoglobina en los reticulocitos es un indicador de alteraciones en la distribución del hierro. Otro
25 indicador es una concentración elevada de forma continua o prolongada de la proteína C-reactiva (CRP) en pacientes afectados de diabetes y que presentan una concentración global de hierro normal. Se ha descrito un método para el diagnóstico de las alteraciones en la distribución del hierro en el póster presentado por P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf y R. Roeddiger en el congreso anual de la AACC/CSCC, celebrado entre el 29 de julio y el 2 de agosto de 2001 en Chicago, Illinois.

30 Hasta ahora, no se ha sugerido ningún tratamiento para los pacientes con diabetes afectados de alteraciones en la distribución del hierro. El problema en el que se centra la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un tratamiento para las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes para minimizar o suprimir las desventajas anteriormente mencionadas. De forma sorprendente, se ha hallado que la eritropoyetina posee un efecto beneficioso
35 en las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes. Por lo tanto el problema se soluciona, según la presente invención, dando a conocer la eritropoyetina para la utilización en el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes.

40 A no ser que se especifique lo contrario, se establecen las definiciones siguientes para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la invención en el presente documento.

45 El término "alquilo inferior", tal como se utiliza en la presente invención, significa un grupo alquilo lineal o ramificado que posee entre uno y seis átomos de carbono. Como ejemplos de grupos alquilo inferior se incluyen metilo, etilo e isopropilo, preferentemente metilo.

El término "alcoxi inferior", tal como se utiliza en la presente invención, significa un grupo R'-O- en el que R' es un alquilo inferior, tal como se ha descrito previamente.

50 El término "alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes" se refiere a una alteración en la distribución del hierro que se produce en pacientes afectados de diabetes mellitus no insulino dependiente. La alteración en la distribución del hierro, por ejemplo, puede tener las características descritas previamente. Particularmente, la alteración en la distribución del hierro se caracteriza por los parámetros siguientes: concentración de receptor soluble de la transferrina [mg/l] dividida por la concentración logarítmica de ferritina [pg/l] inferior a 3,5 con una concentración simultánea de proteína C-reactiva superior a 5 mg/l.

55 El término "eritropoyetina" o "proteína eritropoyetina" se refiere a una proteína con la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea, seleccionada del grupo formado por eritropoyetina humana y análogos tal como se definen más adelante.

60 El término "eritropoyetina pegilada (Peg-EPO ó PEG-EPO)" se refiere a una proteína eritropoyetina unida covalentemente a entre uno y tres derivados polietileno, tal como se describe más adelante.

Descripción de los dibujos:

65 Figura 1: Estructura primaria de la EPO humana (165 aminoácidos) (nº de identificación de secuencia: 1).

Figura 2: Estructura primaria de la EPO humana (166 aminoácidos) (nº de identificación de secuencia: 2).

De forma más detallada, la presente invención se refiere a la utilización de la eritropoyetina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes mellitus no insulino dependiente.

La presente invención es especialmente útil para la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden eritropoyetina como principio farmacéuticamente activo. El término "eritropoyetina" o "proteína eritropoyetina" o "EPO" es como sigue: particularmente los términos se refieren a una glicoproteína, por ejemplo eritropoyetina humana, por ejemplo que posee la secuencia de aminoácidos establecida en el (nº de identificación de secuencia: 1) o (nº de identificación de secuencia: 2) o una secuencia de aminoácidos substancialmente homóloga a las mismas, cuyas actividades biológicas están relacionadas con la producción de hematíes y la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritroides de la médula ósea. Tal como se utiliza en la presente invención, estos términos incluyen aquellas proteínas modificadas de forma deliberada mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida o de forma accidental a través de mutaciones. Estos términos también incluyen análogos que poseen entre 1 y 6 sitios adicionales de glicosilación, análogos que poseen al menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi-terminal de la glicoproteína, en los que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación, y análogos que poseen una secuencia de aminoácidos que incluye un reordenamiento de al menos un lugar de glicosilación. Estos términos incluyen tanto la eritropoyetina humana natural como la producida mediante técnicas recombinantes. En una realización preferente de la presente invención, la proteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.

Tal como se especifica en detalle más adelante, la preparación y purificación de la EPO es bien conocida en la técnica. Por eritropoyetina se entiende la proteína natural o recombinante, preferentemente humana, por ejemplo epoetina alfa o epoetina beta, tal como se obtienen a partir de cualquier fuente convencional tales como tejidos, síntesis de proteínas o cultivos celulares con células naturales o recombinantes. Se abarca cualquier proteína que posea la actividad de la eritropoyetina, tales como muteínas o proteínas modificadas de cualquier otra forma. En una realización preferente de la presente invención, la proteína eritropoyetina es epoetina alfa o epoetina beta. La EPO recombinante puede prepararse mediante la expresión en las líneas celulares CHO-, BHK- ó HeLa, mediante tecnología de ADN recombinante o mediante activación de genes endógenos. La expresión de proteínas, incluyendo la activación de genes endógenos, es bien conocida en la técnica y se da a conocer, por ejemplo en las patentes US nº 5.733.761, 5.641.670, y 5.733.746 y en las publicaciones de patente internacional nº WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955. Es preferente la utilización, tal como se ha definido previamente, en la que la proteína eritropoyetina es expresada mediante activación de genes endógenos. Las especies preferentes de EPO para la preparación de glicoproteínas eritropoyetina son las especies de EPO humana. Más preferentemente, las especies de EPO son las EPO humanas que poseen la secuencia de aminoácidos establecida en el nº de identificación de secuencia: 1 o nº de identificación de secuencia: 2, más preferentemente la secuencia de aminoácidos del nº de identificación de secuencia: 1. Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención se refiere a la utilización, tal como se ha descrito más arriba, en la que la proteína eritropoyetina posee la secuencia de aminoácidos del nº de identificación de secuencia: 1 o nº de identificación de secuencia: 2.

Además, la eritropoyetina puede ser un análogo glicoproteína que posea entre 1 y 6 sitios adicionales de glicosilación. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización, tal como se ha descrito más arriba, en la que la proteína eritropoyetina posee la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación. La glicosilación de una proteína con uno o más grupos oligosacárido, se produce en ubicaciones específicas a lo largo del esqueleto polipeptídico y afecta de forma importante propiedades físicas de la proteína tales como la estabilidad, secreción, localización subcelular y actividad biológica de la proteína. La glicosilación es habitualmente de dos tipos. Los oligosacáridos unidos mediante un enlace O-glicosídico se unen a los residuos serina o treonina y los oligosacáridos unidos mediante un enlace N-glicosídico se unen a los residuos de asparagina. Un tipo de oligosacárido que se encuentra tanto en oligosacáridos unidos mediante enlace O-glicosídico como N-glicosídico es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que es una familia de amino azúcares que contiene 9 o más átomos de carbono. El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal tanto de los oligosacáridos unidos mediante enlace N-glicosídico como O-glicosídico y, dado que lleva una carga negativa, confiere propiedades ácidas a la glicoproteína. La eritropoyetina humana, que posee 165 aminoácidos, contiene tres cadenas de oligosacáridos unidas mediante enlace N-glicosídico y una unida mediante enlace O-glicosídico, lo que supone aproximadamente el 40% del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación mediante enlaces N-glicosídicos se produce en los residuos de asparagina ubicados en las posiciones 24, 38 y 83 y la glicosilación mediante enlace O-glicosídico se produce en el residuo de serina ubicado en la posición 126. Las cadenas de oligosacáridos se modifican con residuos de ácido siálico terminales. La eliminación enzimática de los residuos de ácido siálico de la eritropoyetina glicosilada da lugar a la pérdida de la actividad *in vivo* pero no de la actividad *in vitro* dado que la sialización evita la unión y la aclaración subsiguiente por la proteína de unión hepática.

El término "eritropoyetina" incluye análogos de la eritropoyetina humana con uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana que provocan un incremento en el número de sitios de unión del ácido siálico. Estos análogos glicoproteicos pueden generarse mediante mutagénesis dirigida con la adición, eliminación o

substitución de residuos de aminoácidos que incrementen o alteren los sitios disponibles para la glicosilación. Los análogos glicoproteicos que poseen niveles de ácido siálico superiores a los hallados en la eritropoyetina humana se generan mediante la adición de sitios de glicosilación que no alteran la conformación secundaria y terciaria necesarias para la actividad biológica. Las glicoproteínas de la presente invención también incluyen análogos que poseen niveles aumentados de unión de carbohidratos a un sitio de glicosilación lo que habitualmente supone la substitución de uno o más aminoácidos próximos al sitio de enlace N-glicosídico u O-glicosídico. Las glicoproteínas de la presente invención también incluyen análogos que poseen uno o más aminoácidos que se extienden desde el extremo carboxi terminal de la eritropoyetina y que proporcionan al menos un sitio adicional de glicosilación. Las proteínas eritropoyetina de la presente composición también incluyen análogos que poseen una secuencia de aminoácidos que incluye un reordenamiento de al menos un sitio de glicosilación. Dichos reordenamientos de los sitios de glicosilación suponen la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la eritropoyetina humana y la adición de uno o más sitios de glicosilación que no existen de forma natural. Incrementar el número de cadenas de carbohidrato de la eritropoyetina, y por lo tanto incrementar el número de ácidos siálicos por molécula de eritropoyetina puede proporcionar propiedades ventajosas tales como un aumento de la solubilidad, una mayor resistencia a la proteólisis, una disminución de la inmunogenicidad, un incremento de la vida media y un incremento de la actividad biológica. Los análogos de la eritropoyetina con sitios adicionales de glicosilación se dan a conocer con mayor detalle en la Solicitud de patente europea 640 619, concedida a Elliot y publicada el 1 de Marzo de 1995.

En una realización preferente, la composición farmacéutica de la presente invención comprende proteínas eritropoyetina con una secuencia de aminoácidos que incluye al menos un sitio adicional de glicosilación tales como, pero sin quedar limitado a, eritropoyetinas que comprende la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante una modificación seleccionada entre las siguientes:

Asn³⁰Thr³²,
 Asn⁵¹Thr⁵³,
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹,
 Asn⁶⁹Thr⁷¹,
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹,
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰,
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰,
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰,
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²,
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²,
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰,
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰,
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹,
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹,
 Asn³⁶Thr¹³⁸,
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰,
 Thr¹²⁵, y
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

La notación utilizada en la presente invención para la modificación de la secuencia de aminoácidos quiere decir que la o las posiciones de la proteína no modificada correspondiente (por ejemplo hEPO del n° de identificación de secuencia: 1 o n° de identificación de secuencia: 2) indicadas por el número o números superíndice se cambia al aminoácido o aminoácidos que preceden inmediatamente al número o números superíndice correspondientes.

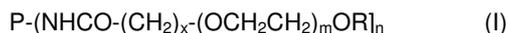
La proteína eritropoyetina también puede ser un análogo que posee al menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi terminal de la glicoproteína, de forma que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación. El aminoácido adicional también puede comprender un fragmento de polipéptido derivado del extremo carboxi terminal de la gonadotrofina coriónica humana. Preferentemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado del grupo formado por (a) eritropoyetina humana que posee la secuencia de aminoácidos Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln, extendiéndose desde el extremo carboxi; (b) el análogo en (a) que comprende además Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; y (c) el análogo en (a) que comprende además Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO.

La proteína eritropoyetina también puede ser un análogo que posee una secuencia de aminoácidos que incluye un reordenamiento de al menos un sitio de glicosilación. El reordenamiento puede comprender una eliminación de cualquiera de los sitios carbohidrato con enlace N-glicosídico de la eritropoyetina humana y una adición de un sitio carbohidrato con enlace N-glicosídico en la posición 88 de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana. Preferentemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado del grupo formado por Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO; y Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰ EPO. Un análogo adicional es la darbepoetina alfa. Una proteína eritropoyetina preferente en la utilización descrita previamente es la darbepoetina alfa.

De forma más particular, la proteína eritropoyetina de la presente composición farmacéutica, tal como se ha descrito previamente, también puede incluir derivados pegilados de la misma. Los derivados pegilados de la eritropoyetina y su preparación son conocidos en la técnica y han sido descritos por ejemplo en WO 01/02017, EP-A-1064951, EP-A-539.167, EP-A-605.963, WO 93/25212, WO 94/20069, WO 95/11924, Patente US nº 5.56, EP-A-584.876, WO 92/16555, WO 94/28024, WO 97/04796, patentes US nº 5.359.030 y 5.681.811, patente US nº 4.179.337, patente japonesa, WO 98/32466, patente US nº 5.324.650. Preferentemente, en la utilización previamente descrita, la proteína eritropoyetina está pegilada. Una realización preferente de eritropoyetina pegilada se refiere a los derivados, tal como se describen más adelante.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización previamente descrita, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina, tal como se ha descrito previamente, que posee al menos un grupo aminoácido libre y que posee la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea y que se selecciona del grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que poseen una secuencia de eritropoyetina humana modificada por la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación o un reordenamiento de al menos un sitio de glicosilación; estando dicha eritropoyetina unida covalentemente a n grupos polietilenglicol de fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ con el grupo $-\text{CO}$ (es decir carbonilo) de cada polietilenglicol formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en el que R es un alquilo inferior; x es 2 ó 3; m es entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900; n es entre 1 y 3; y n y m se escogen de manera que el peso molecular del conjugado menos el de la proteína eritropoyetina está entre 20 y 100 kDa. Esta invención proporciona además composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados descritos en los cuales el porcentaje de conjugados en los cuales n es 1 es al menos del noventa por ciento, preferentemente al menos del noventa y dos por ciento, más preferentemente del noventa y seis por ciento de todos los conjugados de la composición.

De forma más específica los conjugados anteriores pueden representarse por la fórmula (I)

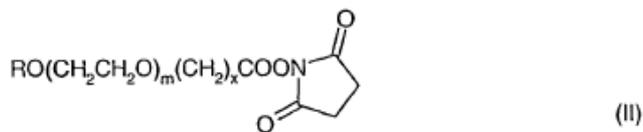


en la que P es el residuo de una proteína eritropoyetina tal como se describe en la presente invención (es decir, sin el o los grupos aminoácido que forman un enlace amida con el carbonilo mostrado en la fórmula I), que posee la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea; y en la que R es un alquilo inferior; x es 2 ó 3; m es entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900; n es entre 1 y 3; y n y m se seleccionan de manera que el peso molecular del conjugado menos la glicoproteína eritropoyetina está entre 20 kDa y 100 kDa. De acuerdo con la presente invención, R es cualquier alquilo inferior. Son preferentes los conjugados en los que R es metilo.

El símbolo "m" representa el número de residuos de óxido de etileno (OCH_2CH_2) en el grupo poli(óxido de etileno). Una sola subunidad de PEG (polietilenglicol) del óxido de etileno posee un peso molecular de aproximadamente 44 Da. Por lo tanto, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) dependen del número "m". En los conjugados de la presente invención, "m" es entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900 (lo que corresponde a un peso molecular entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 40 kDa), preferentemente entre aproximadamente 650 y aproximadamente 750 (lo que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 30 kDa). El número m se selecciona de manera que el conjugado resultante de la presente invención posea una actividad fisiológica comparable a la de la EPO no modificada, pudiendo ser dicha actividad la misma, superior o una parte de la actividad correspondiente de la EPO no modificada. Un peso molecular de "aproximadamente" un determinado número significa que se halla dentro de una franja razonable alrededor de dicho número, tal como se determina mediante técnicas analíticas convencionales. El número "m" se selecciona de manera que el peso molecular de cada grupo polietilenglicol unido covalentemente a la glicoproteína eritropoyetina está entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 40 kDa, y es preferentemente de aproximadamente 30 kDa.

En los conjugados de la presente invención, el número "n" es el número de grupos polietilenglicol unidos covalentemente a los grupos amino libres (incluyendo grupos amino-ε de un aminoácido lisina y/o grupos amino amino-terminales) de una proteína eritropoyetina a través de un enlace o enlaces amida. Los conjugados de la presente invención pueden tener uno, dos o tres grupos PEG por molécula de EPO. "n" es un número entero de valor entre 1 y 3, preferentemente "n" es igual a 1 ó 2, y más preferentemente "n" es igual a 1. Un conjugado preferente de los conjugados descritos anteriormente comprende compuestos en los que x es igual a 2, m está entre 650 y 750, n es igual a 1 y R es un grupo metilo.

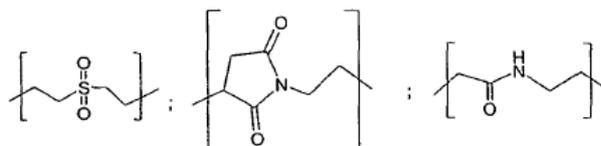
El compuesto de fórmula (I) puede prepararse a partir del material polimérico conocido:



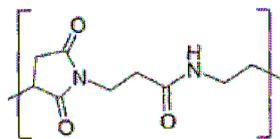
en el cual R y m son tal como se ha descrito anteriormente, mediante la condensación del compuesto de fórmula II con la glicoproteína eritropoyetina. Los compuestos de fórmula (II) en los cuales x es igual a 3 son los alfa-alcoxi inferior, succinimidil ésteres de ácido butírico de polietilenglicol (alcoxi inferior-PEG-SBA). Los compuestos de fórmula (II) en los cuales x es igual a 2 son los alfa-alcoxi inferior, succinimidil ésteres de ácido propiónico de polietilenglicol (alcoxi inferior-PEG-SPA). Se puede utilizar cualquier método convencional para hacer reaccionar un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción descrita anteriormente, el éster succinimidilo utilizado como ejemplo es un grupo saliente que provoca la formación de la amida. El uso de los ésteres succinimidilo tales como los compuestos de la fórmula II para producir conjugados con proteínas se dan a conocer en la Patente US nº 5.672.662, publicada el 30 de Septiembre de 1997 (Harris, y otros).

La EPO humana contiene nueve grupos amino libres, el grupo amino terminal más los grupos ε-amino de los 8 residuos lisina. Se ha observado que cuando se combina el reactivo de pegilación con un compuesto SBA de fórmula II, a un pH de 7,5, una relación proteína: PEG de 1:3, y una temperatura de reacción entre 20 y 25°C, se produce una mezcla de especies mono-pegiladas, di-pegiladas y pequeñas cantidades de especies tri-pegiladas. Cuando el reactivo de pegilación es un compuesto SPA de fórmula II, con condiciones de reacción similares excepto una relación proteína:PEG de 1:2, se produce principalmente la especie mono-pegilada. La EPO pegilada puede administrarse como una mezcla, o en forma de especies pegiladas diferentes separadas mediante cromatografía de intercambio catiónico. Manipulando las condiciones de reacción (por ejemplo la relación entre reactivos, el pH, la temperatura, la concentración de proteína, el tiempo de reacción, etc.) puede modificarse la cantidad relativa de las diferentes especies pegiladas.

Una realización adicional preferente de la presente invención se refiere a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina tal como se ha definido anteriormente que posee al menos un grupo amino libre y que posee la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea y seleccionada del grupo formado por proteína eritropoyetina humana y análogos de la misma que poseen la estructura primaria de la proteína eritropoyetina modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación; estando dicha proteína eritropoyetina unida covalentemente a entre uno y tres grupos alcoxi inferior-polietilenglicol, estando cada grupo polietilenglicol unido covalentemente a la proteína eritropoyetina a través de un enlazador de fórmula -C(O)-X-S-Y- formando el C(O) del enlazador formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, siendo X -(CH₂)_k- ó -CH₂(OCH₂-CH₂)_k-, siendo k entre 1 y 10, siendo Y

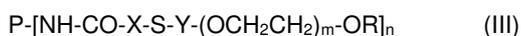


35 6



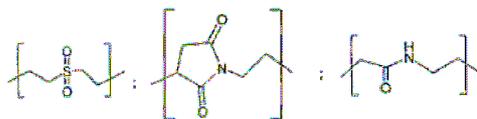
estando el peso molecular medio de cada grupo polietilenglicol entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 40 kDa y el peso molecular del conjugado entre aproximadamente 51 kDa y aproximadamente 175 kDa.

Las especies de eritropoyetina también pueden representarse por la fórmula (III)

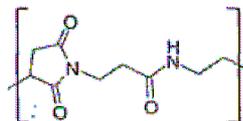


en la que R puede ser cualquier alquilo inferior. Un alquilo inferior preferente es metilo. X puede ser -(CH₂)_k- ó -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, en la que k es entre 1 y aproximadamente 10. Preferentemente, k es entre 1 y aproximadamente 4, más preferentemente, k es 1 ó 2. De forma más preferente, X es -(CH₂)₂-.

50 En la fórmula 1, Y es



6



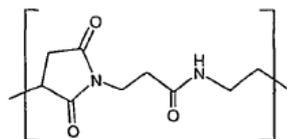
5

preferentemente



10

más preferentemente



15

En la fórmula (III), el número m se selecciona de manera que el conjugado resultante de fórmula (III) posee una actividad comparable a la EPO no modificada, cuya actividad puede ser igual, superior o una parte de la actividad correspondiente de la EPO no modificada. m representa el número de residuos de óxido de etileno en la unidad de PEG. Una sola subunidad PEG de fórmula $-(OCH_2CH_2)-$ posee un peso molecular de aproximadamente 44 Da. Por lo tanto, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número m. Un peso molecular de "aproximadamente" un número determinado significa que se halla dentro de un intervalo razonable alrededor de dicho número determinado mediante técnicas analíticas convencionales, m es un número entero entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900 (lo que corresponde a un peso molecular entre 20 y 40 kDa), preferentemente m se encuentra entre aproximadamente 550 y aproximadamente 800 (aproximadamente entre 24 y 35 kDa); y más preferentemente m se encuentra entre 650 y aproximadamente 700 (entre aproximadamente 29 y aproximadamente 31 kDa).

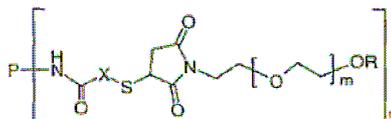
20

25

30

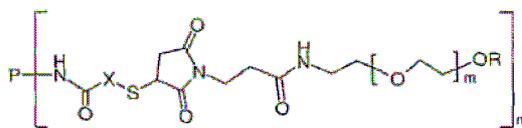
En la fórmula (III), el número n es el número de grupos ε-amino de los aminoácidos lisina de una proteína eritropoyetina unida covalentemente a una unidad de PEG a través de un enlace amida. Un conjugado de la presente invención puede poseer una, dos o tres unidades de PEG por molécula de EPO. n es un número entero entre 1 y 3, preferentemente n es 1 ó 2, y más preferentemente n es 1.

Las proteínas eritropoyetina preferentes de la fórmula (III) se representan por las fórmulas:



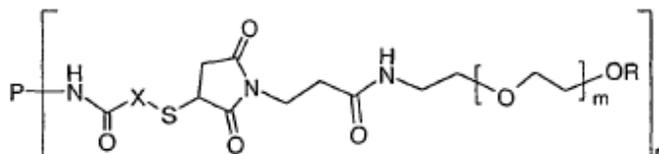
35

y



En la realización más preferente de la presente invención, un conjugado de eritropoyetina se representa por la fórmula:

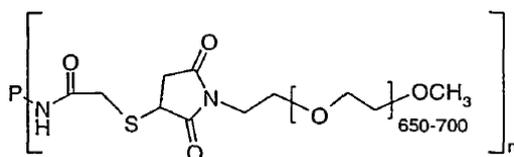
5



siendo en la fórmula anterior n un número entero entre 1 y 3; m un número entero entre 450 y 900; R un alquilo inferior; X $-(CH_2)_k-$ ó $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, y P el residuo de la proteína eritropoyetina sin el grupo o grupos amino que forman un enlace amida con X.

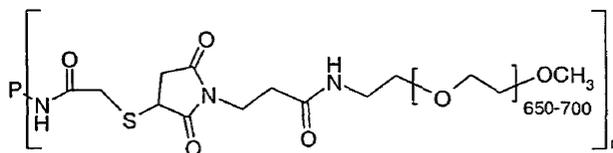
10

Otros productos glicoproteína eritropoyetina preferentes se representan por las fórmulas:

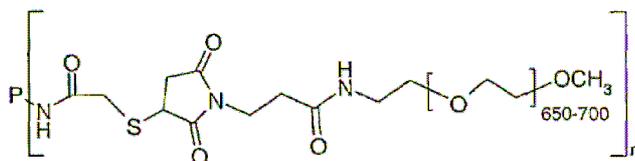


y

15



Los productos glicoproteína eritropoyetina más preferentes se representan por la fórmula:



20

Estas proteínas eritropoyetina pueden prepararse

25

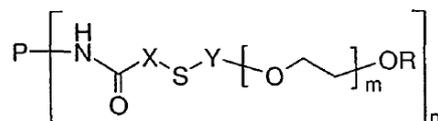
(a) haciendo reaccionar de forma covalente el grupo ϵ -amino de un aminoácido lisina de una proteína eritropoyetina representada por la fórmula $P-[NH_2]_n$, con un reactivo bifuncional representado por la fórmula, $Z-CO-X-S-Q$, formando un producto intermedio con un enlace amida representado por la fórmula:



30

en la que P es una proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma el enlace amida; n es un número entero entre 1 y 3; Z es un grupo reactivo, por ejemplo éster carboxílico-NHS; X es $-(CH_2)_k-$ ó $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, siendo k entre 1 y aproximadamente 10; y Q un grupo protector, como un alcoilo, por ejemplo acetilo.

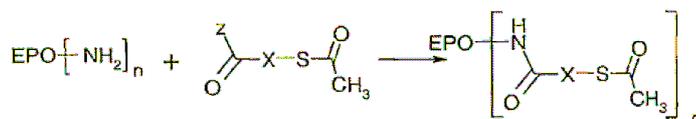
- (b) haciendo reaccionar de forma covalente el producto intermedio con un enlace amida de la etapa (a) con un derivado polietilenglicol activado representado por la fórmula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, formando un producto glicoproteína eritropoyetina representado por la fórmula:



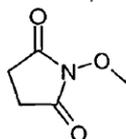
5 en la que W es un forma reactiva sulfidrido de Y; m es un número entero entre aproximadamente 450 y aproximadamente 900; R es un alquilo inferior; e Y es tal como se ha definido anteriormente.

10 En esta realización, el reactivo bifuncional es preferentemente N-succinimidil-S-acetilpropionato o N-succinimidil-S-acetilacetato, Z es preferentemente N-hidroxisuccinimida, y el derivado polietilenglicol activado $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ se selecciona preferentemente del grupo formado por yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona y metoxi-PEG-maleimida.

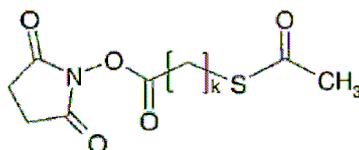
15 De forma más detallada, las proteínas eritropoyetina de fórmula (III) pueden prepararse enlazando covalentemente los grupo tiol de la EPO ("activación") y acoplado la EPO activada resultante con un derivado polietilenglicol (PEG). La primera etapa para la preparación de EPO pegilada según la presente invención comprende la unión covalente de los grupos tiol a través de los grupos NH_2 de la EPO. Esta activación de la EPO se realiza con reactivos bifuncionales que poseen un grupo tiol protegido y un grupo reactivo adicional, tales como ésteres activos (por ejemplo succinimidiléster), anhídridos, ésteres de ácidos sulfónicos, halogenuros de ácidos carboxílicos y de ácidos sulfónicos, respectivamente. El grupo tiol está protegido pro grupos conocidos en la técnica, por ejemplo grupos acetilo. Estos reactivos bifuncionales son capaces de reaccionar con los grupos amino- ξ de los aminoácidos lisina formando un enlace amida. La primera etapa de la reacción se representa del modo siguiente:



25 EPO, n y X son tal como se ha definido anteriormente y Z es un grupo reactivo conocido en la técnica, por ejemplo un sustituyente N-hidroxisuccinimida (NHS) de fórmula:

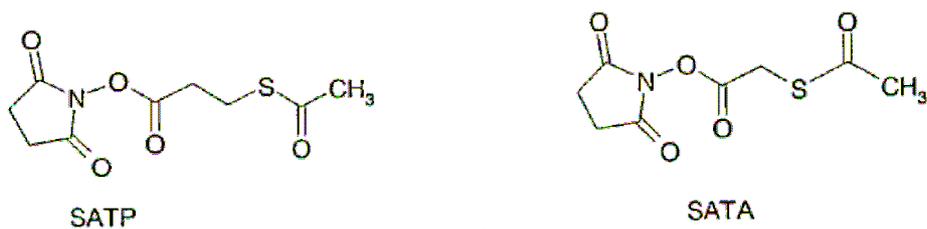


30 En una realización preferente, la activación de los grupos amino- ϵ de la lisina se realiza haciendo reaccionar reactivos bifuncionales que poseen un grupo succinimidilo. Los reactivos bifuncionales pueden poseer diferentes especies separadoras, por ejemplo grupos $-(CH_2)_k-$ ó $-CH_2-(O-CH_2-CH_2-)_k-$, en los que k es entre 1 y aproximadamente 10, preferentemente entre 1 y aproximadamente 4 y más preferentemente 1 ó 2, y de forma más preferente 1. Son ejemplos de estos reactivos N-succinimidil-S-acetilpropionato (SATP) y N-succinimidil-S-acetilacetato (SATA)

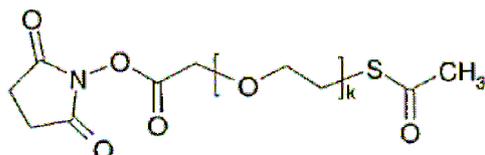


éster NHS de ácido acetilalquil-carboxílico, como

40



ó

éster NHS del ácido 2-(acetilthio)-(etoxy)_k-acético

5

siendo k tal como se ha definido anteriormente.

La obtención de reactivos bifuncionales ya es conocida en la técnica. En el documento DE-3924705 se describen precursores de ésteres NHS de ácido 2-(acetilthio)-(etoxy)_k-acético, mientras que la derivatización para obtener el compuesto acetilthio se describe en March, J., *Advanced Organic Chemistry* ("Química orgánica avanzada"), McGraw-Hill, 1977, 375-376. El SATA es un producto disponible comercialmente (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos y Pierce, Rockford, IL).

El número de grupos tiol que hay que añadir a una molécula de EPO puede seleccionarse ajustando los parámetros de la reacción, es decir, la concentración de proteína (EPO) y la proporción entre proteína/reactivo bifuncional. Preferentemente, la EPO se activa creando un enlace covalente a partir de entre 1 y 5 grupos tiol por cada molécula de EPO, más preferentemente de entre 1,5 y 3 grupos tiol por molécula de EPO. Estos márgenes se refieren a la distribución estadística del grupo tiol en la población de proteínas EPO.

La reacción se lleva a cabo, por ejemplo, en una solución tampón acuosa, pH 6,5-8,0, por ejemplo en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional puede añadirse en DMSO. Una vez finalizada la reacción, preferentemente tras 30 minutos, se detiene la reacción mediante la adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional puede separarse por métodos ya conocidos en la técnica, por ejemplo por diálisis o filtración en columna. El promedio de grupos tiol añadidos a la EPO puede determinarse mediante métodos fotométricos, descritos por ejemplo en Grasetti, D.R. y Murray, J.F., en *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41-49 (1967).

La reacción anterior se continúa con el enlace covalente de un derivado de polietilenglicol (PEG) activado. Los derivados PEG adecuados son moléculas PEG activadas que tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 24 y aproximadamente 35 kDa y más preferentemente aproximadamente 30 kDa.

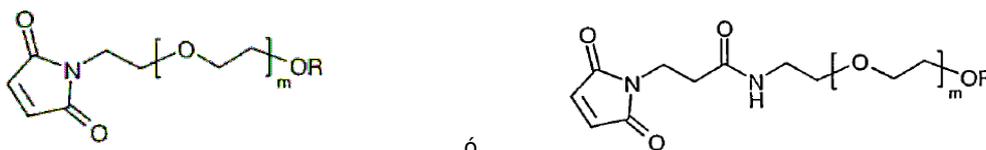
Los derivados PEG activados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M. y otros, *J. Bioconj. Chem.* (1996), 7, página 363 y siguientes para el caso de la PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son adecuadas para la obtención de compuestos de la fórmula 1. Son ejemplos de compuestos PEG reactivos el yodo-acetil-metoxi-PEG y la metoxi-PEG-vinilsulfona:



ó

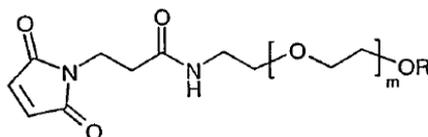
El uso de estas sustancias activadas con yodo es conocido en la técnica y se describe por ejemplo en Hermanson, G.T., en *Bioconjugate Techniques* ("Técnicas de bioconjugación"), Academic Press, San Diego (1996), páginas 147-148.

Las especies PEG se activan de forma más preferente con maleimida utilizando una (alcoxi inferior-PEG-maleimida), como por ejemplo la metoxi-PEG-maleimida (peso molecular 30.000; Shearwater Polymers, Inc.). La estructura de las alcoxi inferior-PEG-maleimidadas es la siguiente:



ó

en las que R y m tienen los significados definidos anteriormente, preferentemente



5

La reacción de acoplamiento con las alcoxi inferior-PEG-maleimidadas tiene lugar después de haber eliminado "in situ" el grupo protector del tiol en una solución tampón acuosa, por ejemplo fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2. La eliminación del grupo protector puede efectuarse, por ejemplo, con hidroxilamina en DMSO a 25°C, pH 6,2, durante aproximadamente 90 minutos. Para la modificación con PEG, la proporción entre EPO activada/alcoxi inferior-PEG-maleimida debe situarse entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 1:6, preferentemente 1:4. La reacción puede detenerse mediante la adición de cisteína y la reacción de los grupos tiol (-SH) restantes con N-metilmaleimida o con otros compuestos adecuados capaces de formar enlaces disulfuro. Debido a la reacción de los grupos tiol activos restantes con un grupo protector, por ejemplo la N-metilmaleimida o cualquier otro grupo protector adecuado, las glicoproteínas EPO de los conjugados de esta invención pueden contener dichos grupos protectores. En general, el procedimiento aquí descrito generará una mezcla de moléculas con grupos tiol en diferentes cantidades y protegidos por números distintos de grupos protectores, en función del número de grupos tiol activados que tenga la glicoproteína que no se hayan conjugado con la PEG-maleimida.

20

Mientras que la N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se emplea para bloquear los grupos tiol restantes de la proteína pegilada, los compuestos disulfuro conducirán, mediante una reacción de intercambio intermolecular sulfuro/disulfuro, a una unión mediante puentes disulfuro con el reactivo bloqueante. Los reactivos bloqueantes preferentes para este tipo de reacción de bloqueo son la glutatona oxidada (GSSG), la cisteína y la cistamina. Mientras que en el caso de la cisteína no se introduce carga neta adicional en la proteína pegilada, el uso de los reactivos bloqueantes GSSG o cistamina implica una carga negativa o positiva adicional.

25

La purificación subsiguiente de los compuestos de fórmula (III), incluyendo la separación de las especies EPO mono-, di- y tri-pegiladas, puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo cromatografía en columna.

30

Los derivados de eritropoyetina pegilada contienen preferentemente por lo menos un noventa por ciento de conjugados mono-PEG. Normalmente los conjugados mono-PEG de las glicoproteínas eritropoyetina son deseables porque suelen tender a poseer una actividad mayor que los conjugados di-PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG y la proporción entre las especies mono- y di-PEG puede controlarse cargando fracciones más amplias en torno al pico de elución para disminuir el porcentaje de mono-PEG o bien fracciones menos amplias para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Los conjugados con aproximadamente un noventa por ciento de mono-PEG constituyen un buen equilibrio entre rendimiento y actividad. A veces puede ser deseable obtener composiciones en las que por ejemplo por lo menos el noventa y dos por ciento o por lo menos el noventa y seis por ciento de los conjugados sean especies mono-PEG (n igual a 1). En una realización de la presente invención, el porcentaje de conjugados en los que n es 1 se sitúa entre el noventa y el noventa y seis por ciento.

35

40

Las composiciones farmacéuticas que comprenden eritropoyetina pegilada son conocidas en la técnica y se describen por ejemplo en la solicitud de patente internacional WO 01/87329. Las composiciones pueden contener entre 10 y 10.000 µg de una proteína eritropoyetina por ml, tal como se ha definido anteriormente. Las composiciones contienen preferentemente entre 10 y 1.000 µg, por ejemplo 10, 50, 100, 400, 800 ó 2.500 µg por ml. Además, las composiciones pueden contener entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, entre 10 y 200 mmol/l de sulfato, entre 10 y 50 mmol/l de fosfato, pH entre 6,0 y 6,5. Esta composición puede contener metionina hasta 20 mM, entre un 1 y un 5% de un poliol (peso/volumen), hasta un 0,1% de pluronic F68 (peso/volumen) y opcionalmente CaCl₂ hasta 1 mM. Un ejemplo de esta composición contiene entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmol/l de sulfato, 10 mmol/l de fosfato, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen), pH 6,2. De forma alternativa, la composición puede contener entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, entre 10 y 100 mmol/l de NaCl, entre 10 y 50 mmol/l de fosfato pH entre 6,0 y 7,0, opcionalmente entre un 1 y un 5% (peso/volumen) de un poliol. Esta composición puede contener además metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de pluronic F68 (peso/volumen) y opcionalmente 7,5 µmol/l de

55

CaCl₂. En concreto, esta composición puede contener entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmol/l de NaCl, metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen) y 10 mmol/l de fosfato, pH 7,0.

5 La presente invención se refiere además a la composición anterior que contiene entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, entre 10 y 50 mmol/l de arginina, pH entre 6 y 6,5, entre 10 y 100 mmol/l de sulfato sódico. Además, la composición puede contener metionina hasta 20 mM, hasta un 0,1% de pluronic F68 (peso/volumen), opcionalmente hasta 1 mmol/l de CaCl₂ y opcionalmente entre un 1 y un 5% (peso/volumen) de un poliol. La
10 composición puede contener específicamente entre 10 y 10.000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmol/l de arginina, pH 6,2, 30 mmol/l de sulfato sódico, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen) y opcionalmente 1 mmol/l de CaCl₂.

Una realización preferente de la presente invención se refiere a composiciones que contienen entre 10 y 10.000 µg/ml de eritropoyetina, preferentemente entre 25 y 2.500 µg/ml de eritropoyetina y

15 a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 ó
b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 ó
20 c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), pH 6,2 ó
d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen), pH 6,2 ó
25 e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), pH 6,2 ó
f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen), pH 6,2.

30 En la realización más preferente, las composiciones contienen una cantidad de proteína eritropoyetina de 50, 100, 400, 800 ó 2.500 µg/ml. Las composiciones más preferentes contienen o bien fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen), pH 6,2, ó arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, un 3% de manitol (peso/volumen), metionina 10 mM, un 0,01% de pluronic F68 (peso/volumen), pH 6,2. Detalles adicionales de dichas composiciones se dan a conocer en WO 01/87329.

35 La presente invención se refiere a un medicamento para el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes mellitus no insulino dependiente caracterizado por contener una cantidad efectiva de proteína eritropoyetina.

40 En el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes, la EPO puede administrarse, por ejemplo, a una posología de 150 U/kg de peso corporal dos veces por semana. La posología puede variar según las necesidades de cada paciente y también puede estar entre, por ejemplo, 100 y 200 U/Kg. Dependiendo de la vida media del derivado de EPO utilizado, cada dosis puede administrarse, por ejemplo, entre 1 y 3 veces por semana. Dependiendo de las necesidades de cada paciente en concreto, el facultativo puede optar por una posología
45 diferente.

La actividad específica de la EPO o de los conjugados de EPO según la presente invención puede determinarse mediante diferentes ensayos conocidos en la técnica. La actividad biológica de las proteínas EPO purificadas de la presente invención es tal que la administración de la proteína EPO mediante inyección a pacientes humanos
50 provoca que se incremente la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea en comparación con los individuos de grupos control a los que no se administra la inyección. La actividad biológica de las proteínas EPO o de fragmentos de las mismas, obtenidas y purificadas según la presente invención puede analizarse mediante los métodos dados a conocer en Annable, y otros., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112 y Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997 (2). Otro ensayo biológico para determinar la actividad de
55 la proteína EPO, el ensayo del ratón normocitémico, está descrito en la técnica (por ejemplo, Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2), y la monografía de eritropoyetina de la Ph. Eur. BRP.).

La presente invención se comprenderá mejor mediante los ejemplos siguientes que ilustran pero no limitan la invención aquí descrita.

60 **EJEMPLO**

Se comprueban las alteraciones en la distribución del hierro en una mujer de mediana edad afectada de diabetes determinando los parámetros siguientes; PCR (proteína C reactiva), ferritina y receptor soluble de la transferrina, tal como se describe en P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf y R. Roeddiger, en el póster presentado en el

5 Congreso anual de la AACC/CSCC, celebrado entre el 29 de Julio y el 2 de Agosto de 2001, en Chicago Illinois. Los resultados muestran alteraciones en la distribución del hierro. Se trata la paciente mediante la administración subcutánea de 150 U/Kg de Recormon™ (proteína eritropoyetina disponible comercialmente) dos veces por semana durante un máximo de 12 semanas. Tras ello, la determinación de los parámetros descritos anteriormente muestra una mejoría del déficit de hierro.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 (1) INFORMACIÓN GENERAL:
(i) SOLICITANTE:
(A) NOMBRE: F.Hoffmann-La Roche AG
(B) CALLE: 124 Grenzacherstrasse
(C) CIUDAD: Basilea
(E) PAÍS: Suiza
15 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070
(G) TELÉFONO: (61) 688 11 11
(H) TELEFAX: (61) 688 13 95
(I) TELEX: 962 292 hlr ch
20 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nueva composición farmacéutica
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
(iv) FORMA COMPUTERIZADA:
(A) TIPO DE MEDIO: Floppy disk
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: WORD
25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release 2.0
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 165
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<400> 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

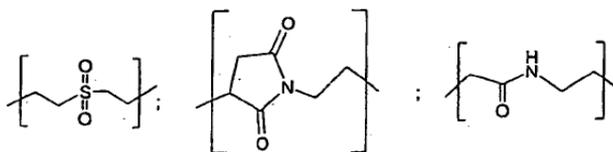
Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala
 145 150 155 160

Cys Arg Thr Gly Asp
 165

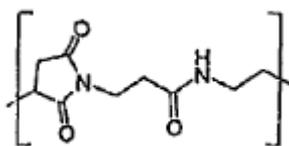
- <210> 2
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una proteína eritropoyetina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las alteraciones en la distribución del hierro en la diabetes mellitus no insulino dependiente.
2. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la proteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.
3. Utilización, según la reivindicación 2, en la que la proteína eritropoyetina es epoetina alfa o epoetina beta.
4. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína eritropoyetina se expresa mediante la activación de genes endógenos.
5. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la proteína eritropoyetina posee la secuencia de aminoácidos del nº de identificación de secuencia: 1 o del nº de identificación de secuencia: 2.
6. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la proteína eritropoyetina posee la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación.
7. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la proteína eritropoyetina es darbepoetina alfa.
8. Utilización, según la reivindicación 1, en la que la proteína eritropoyetina tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 está pegilada.
9. Utilización, según la reivindicación 8, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado que comprende una proteína eritropoyetina que posee al menos un grupo amino libre y la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea y seleccionada del grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que poseen la secuencia de eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación o mediante un reordenamiento de al menos un sitio de glicosilación; estando dicha proteína eritropoyetina unida covalentemente a n grupos polietilenglicol de fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ formando el $-\text{CO}$ de cada grupo polietilenglicol un enlace amida con uno de dichos grupos amino; siendo R un alquilo C_1-C_6 ; x 2 ó 3; m entre 450 y 900; n entre 1 y 3; y seleccionándose n y m de forma que el peso molecular del conjugado menos el de la proteína eritropoyetina está entre 20 kilodaltons y 100 kilodaltons.
10. Utilización, según la reivindicación 9, en la que x es 2, m está entre 650 y 750, n es 1 y R es metilo.
11. Utilización, según la reivindicación 8, en la que la proteína eritropoyetina es un conjugado que comprende una proteína eritropoyetina que posee al menos un grupo amino libre y la actividad biológica *in vivo* de incrementar la producción de reticulocitos y hematíes por parte de las células de la médula ósea y seleccionada del grupo formado por la eritropoyetina humana y análogos de la misma que poseen la estructura primaria de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación; estando dicha proteína eritropoyetina unida covalentemente a entre uno y tres grupos alcoxi inferior-polietilenglicol, estando cada grupo polietilenglicol unido covalentemente a la proteína eritropoyetina a través de un enlazador de fórmula $-\text{C}(\text{O})-\text{X}-\text{S}-\text{Y}-$, formando el $\text{C}(\text{O})$ del enlazador un enlace amida con uno de dichos grupos amino, siendo X $-(\text{CH}_2)_k-$ ó $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, estando k entre 1 y 10, siendo Y



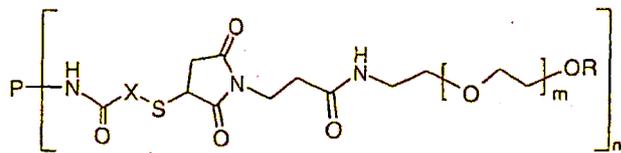
ó



estando el peso molecular medio de cada grupo poli(etilénico) entre 20 kDa y 40 kDa, y el peso molecular del conjugado entre 51 kDa y 175 kDa.

12. Utilización, según la reivindicación 11, con un conjugado de eritropoyetina de fórmula:

5



en la que n es un número entero entre 1 y 3; m es un número entero entre 450 y 900; R es un alquilo C₁-C₆; X es -(CH₂)_k- ó -CH₂(OCH₂-CH₂)_k-, k es entre 1 y 10 y P es el residuo de proteína eritropoyetina sin los n grupos amino que forman un enlace amida con X.

10

FIGURAS

Figura 1

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

Figura 2

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